



Manuel de formation en Laboratoire
sur la conservation et la reconstitution
des ressources génétiques avicoles
locales par cryoconservation des
cellules souches primordiales (CSPs)



BILL & MELINDA
GATES foundation



Foreign, Commonwealth
& Development Office



Manuel de formation en Laboratoire sur la conservation et la reconstitution des ressources génétiques avicoles locales par cryoconservation des cellules souches primordiales (CSPs)

Christian K. Tiambo¹, Pauline Kibui¹, Christine Kamidi³, Charity Muteti¹, Tuanjun Hu², Steve Kemp¹ and Mike McGrew²

1. Centre for Tropical Livestock Genetics and Health (CTLGH)–ILRI
2. Centre for Tropical Livestock Genetics and Health (CTLGH)–Roslin Institute
3. Kenya Agricultural and Livestock Research Organization, Poultry, Naivasha, Kenya

Janvier 2022

Le CGIAR est un partenariat mondial qui réunit des organisations engagées dans la recherche pour un avenir de sécurité alimentaire. Le programme de recherche du CGIAR sur l'élevage fournit des solutions basées sur la recherche pour aider les petits agriculteurs, les éleveurs et les agro-éleveurs à faire la transition vers des moyens de subsistance durables et résilients et vers des entreprises productives qui aideront à nourrir les générations futures. Il vise à augmenter la productivité et la rentabilité des systèmes agroalimentaires d'élevage de manière durable, en rendant la viande, le lait et les œufs plus disponibles et abordables dans les pays en développement. Le Programme remercie tous les donateurs et organisations qui ont globalement soutenu son travail par leurs contributions au Fonds d'affectation spéciale du CGIAR

©2022 International Livestock Research Institute (ILRI)

L'ILRI remercie tous les donateurs et organisations qui soutiennent globalement son travail par leurs contributions au [CGIAR Trust Fund](#).



Cette publication est protégée par les droits d'auteur de l'Institut international de recherche sur l'élevage (ILRI). Il est utilisé sous licence Creative Commons Attribution 4.0 International License. Pour voir cette licence, visitez <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

Sauf indication contraire, vous êtes libre de partager (copier et redistribuer le matériel sur n'importe quel support ou format), d'adapter (remixer, transformer et construire sur le matériel) à toutes fins, même commercialement, dans les conditions suivantes :

 **ATTRIBUTION.** Le travail doit être attribué, mais pas d'une manière qui suggère l'approbation par l'ILRI ou le(s) auteur(s).

REMARQUE :

Pour toute réutilisation ou distribution, les termes de la licence de cette œuvre doivent être clairs pour les autres. L'une des conditions ci-dessus peut être levée si l'autorisation est obtenue du détenteur des droits d'auteur. Rien dans cette licence n'altère ou ne restreint les droits moraux de l'auteur. L'utilisation équitable et les autres droits ne sont en aucun cas affectés par ce qui précède. Les parties utilisées ne doivent pas déformer le sens de la publication. ILRI apprécierait de recevoir une copie de tout matériel dans lequel le texte, les photos, etc. ont été utilisés.

Édition, conception et service de mise en page, de rédaction et de publication de ILRI, Addis-Abeba, Éthiopie.

Photo de couverture: ILRI/Christian K. Tiambo

ISBN : 92-9146-702-2

Citation : Tiambo, C.K., Pauline W. Kibui., Kamidi, C., Muteti, C., Hu, T., Kemp, S. et McGrew, M. 2022. *Manuel de formation en Laboratoire sur la conservation et la reconstitution des ressources génétiques avicoles locales par cryoconservation des cellules souches primordiales (CSPs)*. Manuel de formation ILRI 53. Nairobi, Kenya : ILRI.

Mécène : Professeur Peter C Doherty A.C, FAA, FRS

Spécialiste en recherche animale, lauréat du prix Nobel de physiologie ou médecine-1996

BP 30709, Nairobi 00100, Kenya
Tél. : +254 20 422 3000
Fax : +254 20 422 3001
Email : ilri-kenya@cgiar.org

ilri.org
vivre mieux grâce à l'élevage

ILRI est un centre de recherche du CGIAR

BP 5689, Addis Ababa, Ethiopie
Tél. : +251 11 617 2000
Fax : +251 11 667 6923
Email : ilri-ethiopia@cgiar.org

ILRI comprend d'autres bureaux en Afrique de l'est • Asie du sud • Asie de l'est et du sud-est • Afrique australe • Afrique de l'ouest

Sommaire

Tableaux	vi	
Remerciement	vii	
Acronymes	viii	
1	Le bien-fondé et la pertinence du manuel de formation	1
1.1	Le bien-fondé	1
1.2	La pertinence	2
2	Introduction à la cryobanque de matériel génétique	3
3	Races locales de poulets d’Afrique : leur description, utilisations et méthodes de conservation	4
3.1	Quelques définitions	4
3.2	Caractéristiques générales des poulets Africains	5
4	Cryopréservation des ressources génétiques de volaille	11
5	Collecte et traitement des œufs fécondés	13
5.1	La conformité légale	13
5.1.1	Phase de planification initiale	13
5.1.2	Le Protocole de Nagoya est-il applicable ?	13
5.1.3	Vérifications nécessaires	14
5.1.4	CPCC et CCCA négociés et accordés par l’ANC APA	15
5.1.5	Commencez vos recherches en respectant:	15
5.1.6	Partager les résultats avec les parties prenantes du pays fournisseur	15
5.1.7	Rechercher et conserver le certificat de conformité internationalement reconnu (CCIR) et la procédure de transfert	15
5.2	Métadonnées associées	16
5.3	Traitement, étiquetage, emballage et expédition	16
5.3.1	Traitement des œufs	16
5.3.2	Étiquetage	17
5.3.3	Emballage	17
5.3.4	Stockage des œufs	18
5.3.5	Stockage au froid des œufs	18
5.3.6	La sélection et le conditionnement des œufs pour le stockage	19
5.3.7	L’adaptation progressive des œufs à des températures plus élevées	19
5.3.8	Expédition d’œufs	19

6	Processus d'incubation des œufs	21
6.1	Exploitation du couvoir et assainissement	21
6.2	Température d'incubation et humidité relative	22
6.3	Aération et concentration en dioxyde de carbone/oxygène	23
6.4	Retournement des oeufs	23
6.5	Mirage des œufs incubés	23
7	Collection de tissus embryonnaires contenant des cellules souches primordiales (CSP) de lignées ou races cibles	34
7.1	Collecte de sang pour la culture de CSP	34
7.1.1	Équipement/réactifs	34
7.1.2	Sécurité	35
7.1.3	Procédure	36
7.2	Isolement des CSP du blastodisque de poulet	38
7.3	Timing approprié pour la collecte des CSP	41
8	Biobanque des tissus reproducteurs embryonnaires de poulet	42
8.1	Neuf jours d'incubations des œufs de poulet avant dissection des gonades	42
8.2	Dissection des gonades	42
8.3	Cryopreservation des gonades entières	44
9	Purification, enrichissement et culture à long terme des CSPs	46
10	Stockage et réutilisation des échantillons de CSPs	47
10.1	Conservation à ultra basse température des CSPs	47
10.2	Préparation d'une suspension unicellulaire à partir de tissu gonadique congelé	47
10.3	Enrichissement des CSP gonadiques femelles par MACS en utilisant la procédure d'anticorps SSEA-1	49
10.4	Injection de cellules dans des embryons hôtes : production de chimères germinales par transplantation de CSPs	53
11	Injection de CSP à des embryons hôtes stérilisés	53
12	Cryoconservation des CSP de volaille pour les programmes de repeuplement	54
13	Conclusions et perspectives des banques africaines de CSP avicole	55
13.1	Avantages potentiels de la biobanque de ressources génétiques avicoles	55
13.2	Résultats escomptés	55
14	Références	57

Tableaux

Tableau 1.	Une sélection de races de poulets indigènes trouvées en Afrique	6
Tableau 2.	Quelques paramètres de performance des coqs à 20 semaines	8
Tableau 3.	Quelques paramètres de performance des poules indigènes et adaptées localement	8
Tableau 4.	Quelques souches exotiques de poulets adaptées localement et utilisées pour la viande et/ou les œufs en Afrique	9
Tableau 5.	Considérations clés pour le respect du cadre APA du Protocole de Nagoya pour les ressources zoogénétiques	13
Tableau 6.	Métadonnées associées à la collecte des œufs	16
Tableau 7.	Facteurs de qualité des œufs et leurs spécifications	16
Tableau 8.	Catégories de taille des œufs en fonction du poids	17
Tableau 9.	Types d'emballage d'œufs	18
Tableau 10.	Températures recommandées pendant le chargement et le transport des œufs	20
Tableau 11.	Période d'incubation et plages de température et d'humidité recommandées pour diverses espèces de volaille	22
Tableau 12.	Causes possibles des problèmes d'éclosion	24
Tableau 13.	Stades chronologiques du développement de l'embryon de poulet (HH) de Hamburger et Hamilton (1951)	27

Remerciement

Ce manuel a été financé en partie par la Fondation Bill & Melinda Gates et avec UKaid du UK Foreign, Commonwealth and Development Office (Accord de subvention OPP1127286) sous les auspices du Centre for Tropical Livestock Genetics and Health (CTLGH), établi conjointement par le Université d'Édimbourg, SRUC (Scotland's Rural College) et International Livestock Research Institute. Les résultats et conclusions contenus dans ce document sont ceux des auteurs et ne reflètent pas nécessairement les positions ou les politiques de la Fondation Bill & Melinda Gates ni du gouvernement britannique.

Dans le cadre des conditions d'octroi de la Fondation, une licence générique Creative Commons Attribution 4.0 a déjà été attribuée à la version du manuscrit accepté par l'auteur qui pourrait découler de cette soumission.

Le manuel détaille le contenu de la recherche avancée et du transfert de technologie du CTLGH au personnel technique des États Africains et des banques de gènes régionales en collaboration avec le Bureau Interafricain des Ressources Animales de l'Union africaine (UA-BIRA)

CTLGH reçoit un financement de la Fondation Bill & Melinda Gates (BMGF), du Bureau britannique des affaires étrangères, du Commonwealth et du développement (FCDO), le Conseil de recherche en biotechnologie et sciences biologiques (BBSRC) et Jersey Overseas Aid (JOA).

Une mention spéciale est faite au programme de technologie de reproduction et d'élevage de précision du CTLGH.

L'équipe de recherche exprime sa gratitude aux programmes de recherche du CGIAR (CRP) sur l'élevage et au produit phare du CRP sur la génétique de l'élevage.

CTLGH / International Livestock Research Institute (ILRI), Nairobi-Kenya
Christian K. Tiambo, Steve Kemp, Yao-Jing Yue, Charity Muteti, Nakami Wilkister, Moses Ogugo, Pauline W. Kibui, Christine M. Kamidi (KALRO).

CTLGH / Roslin Institute, Université d'Edinburgh, UK
Bruce Whitelaw, Mike McGrew, Simon Lillico, Maeve Ballantyne, Tuan Jun Hu

Acronymes

ABS-CH	Access and benefit sharing clearing house / Centre d'échange sur l'accès et le partage des avantages
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANC	Autorité nationale compétente
AnGR-TAG	Animal genetic resources taxonomy advisory group
APA	Access et partage des Avantages
BRL	Buffalo rat liver
CCCA	Conditions convenues d'un commun accord
CCIR	Certificat de conformité internationalement reconnu
CPCC	Consentement préalable en connaissance de cause
CSP	Celluke souche primordiale
CTLGH	Centre for Tropical Livestock Genetics and Health
DMEM	Dulbecco s modified eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EMA	Embryonic mouse antigen
ES	Embryonic stem
ETOH	Ethanol
FACS	Fluorescent-activated cell sorting
FAOT	FGF2, Activin A, ovotransferrin
FBS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factor
FKBP	KK506 Binding protein
GFP	Green fluorescent protein
HH	Hamburger and Hamilton
ILRI	International Livestock Research Institute
IUCN	International Union for Conservation of Nature
NAPRI	National Animal Production Research Institute
PACL	Peuples autochtones et communautés locales
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
RGAn	Ressources Génétiques Animales
RPM	Revolutions per minute
SASSO	Sélection Avicole de la Sarthe et du Sud-Ouest
SNRA	Système national de recherche agricole
SSEA	Stage-specific embryonic antigen
STO	Sando inbred mouse derived thioguanine-resistant and oubain-resistant
TPZ	Tirapazamine
UA	Union Africaine
UA-BIRA	Union Africaine– Bureau interafricain des ressources animales
UK	United Kingdom

1 Le bien-fondé et la pertinence du manuel de formation

1.1 Le bien-fondé

La conservation des races ou lignées de volailles est un processus difficile, surtout si elle est effectuée par cryoconservation. Cela est dû à la structure unique de l'ovule aviaire par rapport à celle des mammifères et à la faible fertilité de la semence de volaille congelée. De plus, le clonage par transfert nucléaire de cellules somatiques n'est pas une option car le transfert d'embryons chez les espèces aviaires n'est pas possible. Cependant, des développements récents au Centre for Tropical Livestock Genetics and Health (CTLGH) (The Roslin Institute, Université de Edinburgh, Royaume-Uni), indiquent que l'isolement et la congélation des cellules souches primordiales (CSPs) peuvent fournir une approche alternative pour la biobanque du germoplasme de volailles.

Les cellules souches primordiales sont des cellules souches spécialisées qui finiront par se différencier en spermatozoïdes ou en ovules selon le sexe des embryons individuels. Les CSPs peuvent être isolées du blastodisque (4 à 6 heures après la fécondation), du sang (embryons au jour 2-3) et des gonades (embryons au jour 9). Après l'isolement, les CSPs peuvent être cultivées ou cryoconservées puis décongelées pour être transférées dans des embryons de poulet receveurs aux jours 2-3. Les CSPs transférées se développeront ensuite et se différencieront en gamètes (ovules ou spermatozoïdes) aux côtés des CSPs propres de la poule receveuse. Les gamètes résultants proviendront donc à la fois de la race donneuse et de la race receveuse, facilitant ainsi la régénération de la race (donneuse) qui a fourni les CSPs cryoconservées ou cultivées. Le poulet produit à partir de ce processus est appelé une chimère. En outre, la récupération des CSPs cryoconservées pourrait être améliorée en utilisant des poules stériles modifiées par édition du génome comme receveuses. L'utilisation d'une porteuse stérile résout le problème de la compétition entre les CSPs du donneur et du receveur, ce qui représente une étape importante dans les techniques de biobanque. Ces développements offrent des possibilités intéressantes pour la conservation des races avicoles.

Les recherches actuelles sur la cryoconservation des CSPs se sont largement concentrées sur le poulet. Par conséquent, il sera nécessaire d'établir comment et dans quelles conditions, cette approche peut être appliquée à d'autres espèces de volailles. Bien que la technologie soit inestimable dans la préservation des races de volailles à risque, elle peut également jouer un rôle important au sein des entreprises d'élevage de volailles. Par exemple, elle pourrait être utilisée pour maintenir d'importantes lignées parentales de races avicoles traditionnelles utilisées dans la production avicole commerciale sans qu'il soit nécessaire de conserver de grandes populations de poules vivantes.

Le transfert de ces technologies et pratiques vers les systèmes nationaux de recherche agricole (SNRA) en Afrique peut résoudre les problèmes rencontrés par le secteur avicole local. En effet, l'échange de connaissances nord-sud et sud-sud peut en partie relever les défis liés au manque d'informations et au renforcement des capacités des scientifiques et des professionnels tout en facilitant l'extension de solutions efficaces. Par conséquent, le programme de technologie de reproduction et d'élevage de précision du CTLGH-ILRI est conçu pour aider les pays africains

à améliorer la productivité du poulet tout en préservant les ressources génétiques. En collaboration avec l'Union Africaine – Bureau Interafricain des Ressources Animales (UA-BIRA), le programme se concentre sur le renforcement des capacités pour la cryoconservation des ressources génétiques avicoles africaines.

La maîtrise des méthodes de récolte et de conservation et propagation *in vitro* des CSPs de poulet est une étape précieuse dans la compréhension de la biologie de ces CSPs. La capacité des CSPs de poulet à former des gamètes fonctionnels après une culture à long terme peut être utilisée pour développer un système cellulaire pour l'amélioration génétique du génome du poulet. Les cellules souches ont été un outil clé dans la biotechnologie aviaire et sont actuellement considérées comme l'un des outils les plus prometteurs pour maintenir la biodiversité génétique aviaire à travers l'Afrique sans déplacer le matériel génétique hors de leurs régions d'origine.

Ce manuel a été conçu suite aux demandes des SNRA et des banques de gènes régionales établies dans le cadre des projets UA-BIRA. Il offre une opportunité aux experts en biotechnologie avicole, aux gestionnaires de banques de gènes animaux, aux points focaux régionaux et sous-régionaux pour les ressources zoogénétiques en Afrique et aux membres du Groupe consultatif sur la taxonomie des ressources zoogénétiques de l'UA (AnGR-TAG), d'améliorer leurs capacités et se familiariser avec les techniques de sélection et de conservation des ressources génétiques avicoles. Les utilisateurs de ce manuel seront familiarisés avec les différentes techniques utilisées dans la cryobanque et le transfert des CSPs de poulet. Ces techniques vont de l'isolement de ces CSPs à partir de divers matériels biologiques, la cryoconservation et la décongélation, l'évaluation de la viabilité des CSPs cultivées, la réinjection dans la circulation sanguine d'un embryon en développement et l'évaluation du taux d'intégration des cellules injectées dans les gonades.

1.2 La pertinence

La plupart des ressources génétiques avicoles sont conservées dans des populations vivantes (*in situ*). Cependant, la conservation des ressources génétiques *in situ* comporte toujours le risque de perte en raison d'épidémies d'agents pathogènes, de problèmes génétiques, d'arrêt de la reproduction et/ou de catastrophes naturelles. La cryobanque de matériel génétique chez les volailles s'est historiquement limitée à l'utilisation de sperme, empêchant ainsi la conservation du chromosome W femelle et de l'acide désoxyribonucléique (ADN) mitochondrial. Comme alternative, Les CSPs aviaires, la première population de cellules germinales établie au début du développement, sont incorporées dans les gonades (Yasuda et al. 1992) où elles peuvent se différencier en gamètes fonctionnels après transplantation sur des embryons receveurs (Tajima et al. 1993 ; Ono et al. 1998). Un autre défi est posé par la structure des œufs de volailles, qui restreint la cryoconservation des ovules et des embryons fécondés, une technique largement utilisée chez les espèces de mammifères. En utilisant une propriété biologique unique et l'accessibilité de ces cellules souches (cellules précurseurs des gamètes, qui circulent temporairement dans le système vasculaire au début du développement), une technique de transplantation de CSP aviaire a été mise en place. À ce jour, plusieurs techniques de manipulation des CSPs, notamment la purification, la cryoconservation, l'épuisement et la culture à long terme, ont été développées chez les poulets. La transplantation de cellules germinales primordiales combinée aux récentes techniques avancées de manipulation de CSP ont permis la conservation *ex situ* des ressources génétiques de la volaille sous leur forme complète. Dans ce manuel, les technologies mises à jour pour la manipulation des CSP aviaires sont présentées et le concept d'une banque de CSPs aviaire est proposé en considérant leurs propriétés biologiques.

2 Introduction à la cryobanque de matériel génétique

Un déclin rapide et constant des populations d'espèces animales a été signalé ces dernières années (UICN Species Survival Commission 2010). Si les stratégies de conservation in situ/in vivo sont encore très pertinentes dans la préservation de la biodiversité animale, d'autres stratégies telles que la cryoconservation du germoplasme (cellule reproductrice) sont essentielles. Le matériel génétique est une source d'informations en direct pour tous les gènes présents dans les espèces animales respectives, qui peuvent être conservés pendant de longues périodes et régénérés pour une utilisation future chaque fois que nécessaire. La cryobanque ou la cryoconservation de matériel génétique est la méthode la plus efficace pour conserver les traits génétiques d'espèces menacées et ayant une valeur commerciale. C'est un complément intéressant au maintien indispensable de la diversité génétique par l'élevage d'animaux vivants. Cependant, des recherches sont nécessaires pour appliquer efficacement ces techniques dans un programme multidisciplinaire visant à préserver les nombreuses sous-populations d'animaux qui existent au sein d'une espèce donnée.

La cryobanque de matériel génétique implique la récolte et la congélation de gamètes, d'embryons, de tissus gonadiques, de tissus somatiques ou de CSPs d'espèces menacées d'extinction. Il existe une diversité considérable des caractéristiques cryobiologiques parmi les types cellulaires et les tissus de chaque espèce. Les recherches effectuées par des scientifiques du Centre for Tropical Livestock Genetics et Health (CTLGH) se sont concentrées sur le développement de techniques pour la conservation et la récupération du matériel génétique du poulet. Ce manuel de formation décrira les techniques et l'utilisation potentielle des CSP cryoconservés pour la recherche, le développement et le repeuplement des populations de volailles.

3 Races locales de poulets d'Afrique : leur description, utilisations et méthodes de conservation

3.1 Quelques définitions

Race : Un groupe établi de volailles au sein d'une espèce apparentée par la reproduction, possédant une forme, une conformation, une couleur de plumage, un type de crête, un poids corporel général et des races distinctes. Les exemples incluent Shika Brown, Venda, Ovambo, FUNAAB Alpha Potchefstroom Koekoek, Tswana, Boschveld etc

Classe : Utilisé pour désigner un groupe de volailles développé dans certaines régions ou zones géographiques. Des exemples de classes sont américains, asiatiques, méditerranéens et anglais.

Cryobiologie : Etude des effets des basses températures et du gel sur les organismes (souvent à des fins de cryoconservation).

Cryogénique : Une discipline au sein de la physique. C'est l'étude de la production et du comportement des matériaux à des températures cryogéniques.

Cryopréservation : Le processus de préservation ou de conservation de matériels biologiques à des températures cryogéniques (généralement inférieures à -180 C).

Cryoconservation du matériel génétique : conservation du matériel génétique des cellules germinales, comme les semences, le sperme ou les ovules, etc., à des températures cryogéniques.

Lignées : Sous-classes d'une souche développées de telle sorte que le ou les gènes responsables d'un caractère particulier soient fixés pour être utilisés pour la production d'hybrides commerciaux.

Souche : Sous-classification d'une race. Normalement, une souche porte le nom de la personne qui l'a développée ou de l'institution où elle a été développée. Les souches sont développées en mettant l'accent sur des caractéristiques spécifiques telles que la production d'œufs, la maturité précoce, une meilleure efficacité alimentaire et le poids des œufs, etc. Les exemples sont les KALRO KIC1 et KIC2

Variété : Terme utilisé pour sous-classer les races. Il peut y avoir de nombreuses variétés au sein d'une race différenciées par la couleur du plumage, le motif et le type de peigne, par ex. Leghorn blanc, Leghorn noir, Leghorn brun et Plymouth Rock barré, etc.

Vitrification : La cryoconservation de matériaux biologiques à une vitesse de refroidissement extrêmement élevée sans formation de cristaux de glace.

3.2 Caractéristiques générales des poulets Africains

Dans le contexte africain, la volaille indigène fait référence aux races locales de volaille adaptées aux conditions environnementales difficiles. Ils sont souvent élevés dans des systèmes extensifs de petits villages, de plein air et de production biologique. On les appelle aussi volailles traditionnelles, de divagation, de basse-cour, de village, locales ou familiales. Ces races présentent les caractéristiques générales suivantes:

- Rusticité, montrant une adaptation aux conditions environnementales difficiles
- Autonome en système divagant, récupérant les déchets de cuisine, les insectes, les vers, les lézards, les graines et les feuilles des plantes, etc.
- Petit format avec des taux de croissance lents
- La viande et les œufs ont une pigmentation attrayante, une faible teneur en matières grasses et de bons attributs sensoriels
- Bonnes aptitudes à la couvaison
- L'âge à la maturité sexuelle se situe entre 133 et 169 jours dans les systèmes de production extensifs
- Faible production d'œufs (40–50 œufs/an sous un système de gestion extensif)
- Bons taux de fertilité et d'éclosabilité

Ces poulets sont génétiquement adaptés à des environnements difficiles caractérisés par des ressources alimentaires et hydriques limitées, des conditions météorologiques et climatiques défavorables et une exposition aux agents pathogènes et aux prédateurs. Les poulets sont également génétiquement diversifiés, nécessitant un minimum d'intrants pour produire de la viande et des œufs pour les marchés locaux et internationaux. Il existe également plusieurs races améliorées localement, qui peuvent soutenir les systèmes de production commerciale en Afrique. L'orientation du développement et/ou de la production pourrait être approximativement guidée en milieu rural par les caractéristiques morphologiques des animaux (Figure 1).

Figure 1. Morphological features of various types of chickens.



Type ponte

Type chair

Type mixte

Source: TECA-FAO, 2010. pour reference section TECA - Technologies and Practices for Small Agricultural Producers, FAO, 2010. Small-scale chicken production. <https://teca.apps.fao.org/teca/en/technologies/6949> . Consulté le 08/12/2021

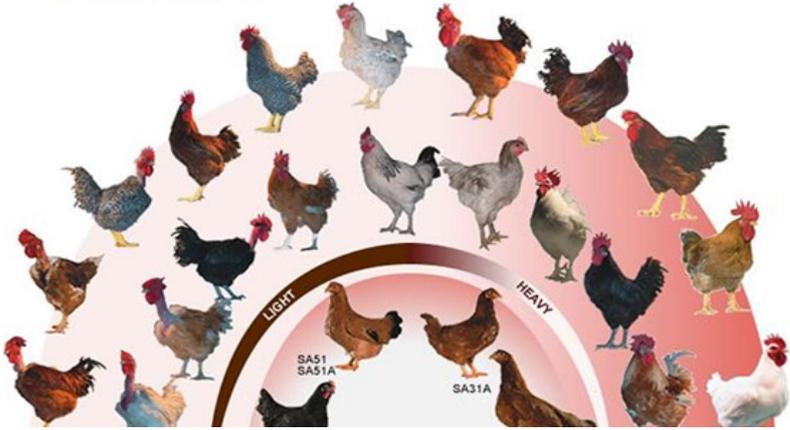
Vous trouverez ci-dessous quelques-unes des races de poulets indigènes et adaptées localement les plus prometteuses trouvées en Afrique (Figure 2 et Tableau 1).

Figure 2. Une famille de reproducteurs de poulets Kabir au Cameroun.



Source : Société Coopérative GreenGold AgroVenture, Cameroun.

Tableau 1. Une sélection de races de poulets indigènes trouvées en Afrique

<p>Famille de reproducteurs SASSO coqs et poules</p>	 <p>Les races de poulets de la Sélection Avicole de la Sarthe et du Sud-Ouest (SASSO) sont très appréciées en Afrique pour leur capacité à résister aux conditions locales d'élevage de volailles. Les lignées populaires de la race sont les SASSO Rainbow T (TR), SASSO Rainbow X (XR), SASSO Ruby C (C44), SASSO Ruby N (XL44N) et SASSO Ruby T (T44).. Source: Brigido LaGuardia, 2021. Pour référence section Brigido LaGuardia, 2021. What Is SASSO Chicken. in griculture and Livestock Guide. https://putakputak.com/poultry/chickens/what-is-sasso-chicken/. Consulté le 08/12/2021</p>
	 <p>Ces souches de poulet sont développées par SASSO, une société d'élevage de volailles en France. Ils deviennent de plus en plus populaires pour une utilisation dans les arrière-cours et les opérations de plein air à grande échelle en Afrique.</p>
<p>Kuroiler</p>	 <p>Le Kuroiler est une race composite dérivée du croisement de mâles de couleur avec des femelles Rhode Island Red ou de mâles White Leghorn avec des femelles Rhode Island Red. Développée par les fermes Kegg en Inde, cette race à double usage peut vivre d'un régime composé de déchets de cuisine et agricoles et produit environ 150 œufs par an. Le rendement en viande par oiseau de Kuroilers est également supérieur à 3,5 et 2,5 kg pour les mâles et les femelles, respectivement. Le Kuroiler est résistant aux maladies.¹</p> <p>Source: Kuroiler Chicken Farmers in KENYA. https://www.facebook.com/KuroilerKenya/</p>

1. <https://en.wikipedia.org/wiki/Kuroiler>

<p>Shika Brown</p>	 <p>La race de poulet Shika Brown est la souche de ponte préférée au Nigeria. Il a été créé par l'Institut national de recherche sur la production animale (NAPRI) de l'Université Ahmadu Bello de Shika, dans l'État de Zaria au Nigéria. Ses caractéristiques comprennent un taux de production élevé, une persistance, une vivabilité et une efficacité de conversion alimentaire. Le poulet produit des œufs de grande taille avec une excellente qualité de coquille. Le Shika Brown est bien adapté à l'environnement tropical rigoureux et est résistant à de nombreuses maladies d'importance économique².</p> <p>Source: African Chicken Genetic Gain (ACGG-ILRI)</p>
<p>FUNAAB Alpha</p>	 <p>Le FUNAAB Alpha est une race de poulet à double usage développée par l'Université fédérale d'agriculture d'Abeokuta, dans l'État d'Ogun au Nigeria.</p> <p>FUNAAB Alpha atteint des poids corporels de 2,6 et 1,8 kg à l'âge de 20 semaines pour les mâles et les femelles, respectivement. La couleur, le poids et le nombre des œufs sont passés du blanc au brun, respectivement de 39 à 55 g et de 120 à 250 par an.</p> <p>Source: African Chicken Genetic Gain (ACGG-ILRI)</p>
<p>Noiler</p>	 <p>Le Noiler est une race de poulet à double usage développée par Amo Farm Sieberer Hatchery Limited, Awe, dans l'État d'Oyo au Nigeria. Le Noiler est un hybride de poulet de chair et de coq, par conséquent, possède les caractéristiques souhaitées à la fois d'un poulet de chair et d'un coq. Contrairement aux poulets à griller, les poulets Noiler sont disponibles en différentes couleurs, notamment des taches noires, blanches, jaunes, brunes et grises.</p> <p>Source: African Chicken Genetic Gain (ACGG-ILRI)</p>

Fulani	 <p>Élevés à l'origine par le peuple Peul (Fulani), les poulets écotypes Fulani ont été rassemblés et multipliés par l'Université Obafemi Awolowo, Ile-Ife, à partir d'une population de base commune dans la région nord du Nigéria. Ce sont de bonnes pondeuses d'œufs avec une viande de haute qualité. Ces poulets sont tolérants aux maladies et ont tendance à vivre longtemps.</p> <p>Source: African Chicken Genetic Gain (ACGG-ILRI)</p>
--------	--

Différentes races de poulets africains peuvent avoir des performances variables comme le montrent les tableaux 2 et 3 ci-dessous. Certains écotypes de races de poulets en Afrique ont un potentiel génétique élevé qui, malheureusement, n'est pas pleinement ou efficacement utilisé.

Tableau 2. Quelques paramètres de performance des coqs à 20 semaines

	Fulani	FUNAAB Alpha	ShikaBrown	Kuroiler	Sasso	Noiler
						
Poids vif (Kg)	1.3	2.1	1.7	2.9	3.0	2.6
Kg d'aliment /Kg de poids corporel	8.5	5.2	7.0	4.6	5.4	5.7
Protein (g/Kg de viande)	114	269	158	320	348	213
Gras (g/Kg de viande)	11	29	15	35	42	15

African Chicken Genetic Gain (ACGG-ILRI)

Tableau 3. Quelques paramètres de performance des poules indigènes et adaptées localement

	Fulani	FUNAAB Alpha	ShikaBrown	Kuroiler	Sasso	Noiler
						
Age au 1er Oeuf (semaines)	18	17	17	18	19	17
Poids de l'Oeufs (g)	42	51	54	55	55	39 <small>(at 1st month of lay)</small>
No d'œufs /semaine (3 mois de ponte)	3	4	5	4	3	2 <small>(2nd month of lay)</small>
Poussins éclos/100 oeufs	60	55	74	81	85	84

African Chicken Genetic Gain (ACGG-ILRI)

Certaines races composites à double usage comme le Kabir (figure 2) ont beaucoup attiré l'attention de nombreux agriculteurs dans certaines régions d'Afrique, grâce à leur rusticité et leur productivité en divagation et en systèmes semi-intensifs.

Figure 2. Poulet Kabir de la ferme GreenGold Agroventure au Cameroun.



Les agriculteurs africains gardent également des souches exotiques de poulets adaptées localement pour produire de la viande et/ou des œufs. Il s’agit notamment de Vedette, Rhode Island Red, Plymouth Rock, New Hampshire, Orpington, Brahma, Cornish, Livourne, Sussex et Flaveroles, entre autres. Vous trouverez ci-dessous quelques races de poulets exotiques adaptées localement et utilisées pour la production villageoise et commerciale en Afrique (tableau 4).

Tableau 4. Quelques souches exotiques de poulets adaptées localement et utilisées pour la viande et/ou les œufs en Afrique

<p>Sussex</p> <p>Les poulets Sussex sont des oiseaux à double usage qui produisent environ 250 œufs de différentes nuances de brun clair chaque année. Leur plumage se décline en huit couleurs différentes, la plus courante étant le corps blanc pur avec un cou et des plumes de la queue noirs. Ils sont très calmes et sont à l’aise dans les systèmes en divagation.</p>	
<p>Rhode Island Red</p> <p>Les Rhode Island Red sont des poulets à double usage, ce qui signifie qu’ils peuvent être élevés pour leurs œufs ou leur viande. Ils sont l’une des races de poulets de basse-cour et commerciales les plus populaires, car ils sont robustes et produisent de nombreux œufs. Cette race peut produire environ 250 œufs bruns de taille moyenne par an. Ils ont des plumes brunes et noires leur donnant un aspect sombre.</p>	
<p>Plymouth/Barred Rock</p> <p>Ils sont principalement gris avec des rayures blanches autour de leur corps. Barré, frisé noir, bleu, perdrix, chamois, colombien, crayon d’argent, noir et blanc sont des couleurs courantes dans cette race. Ils sont mieux adaptés au système de plein air et sont très amicaux et robustes. La poule produit environ 280 œufs brun clair par an.</p>	
<p>Australorp</p> <p>La race Australorp est l’une des races de poulets les plus productives et est originaire d’Australie. Il est élevé à la fois pour les œufs et la viande car c’est une très bonne couche et est également rustique. Australorp produit environ 250 œufs bruns par an. Ils se nourrissent très bien et se déclinent en noir, blanc ou bleu.</p>	
<p>Wyandotte</p> <p>La Wyandotte est une race à double usage et produit environ 200 œufs bruns par an. Ils ont un tempérament docile. Ils ont un plumage attrayant avec des variations de couleur or, bleu et argent.</p>	

<p>Jersey Giant</p> <p>La race de poulet Jersey Giant est à double usage et la poule produit environ 260 œufs bruns par an. Les poulets Jersey Giant sont de grande taille. Ces poulets bleus, noirs et blancs sont les plus gros des races pures. Ils ont un tempérament docile et sont excellents pour les troupeaux débutants.</p>	
<p>Leghorn</p> <p>Les poulets Leghorn sont des pondeuses productives. La poule produit environ 280 œufs blancs par an. Ils ne sont pas d'un tempérament docile. Cependant, ce sont des pondeuses très productives. Ils prospèrent particulièrement bien dans les climats plus chauds.</p>	
<p>Orpington</p> <p>L'Orpington est une race à double usage attrayante et amicale. Ce sont de bonnes couches et sont robustes. Les oiseaux Orpington sont duveteux et ont plusieurs couleurs, comme le bleu, le chamois, le noir, le blanc et la lavande.</p>	
<p>Barnevelder</p> <p>Le Barnevelder est originaire de Hollande, et c'est un croisement entre la race hollandaise Landrace et la volaille de la jungle asiatique. Une poule Barnevelder produit environ 200 œufs par an. Les œufs sont de taille petite à moyenne et de couleur brun clair moucheté. Cette race est principalement noire avec des plumes à pointe brune. Il est mieux adapté pour l'arrière-cour. Il a une mauvaise aptitude au vol, par conséquent, il n'est pas nécessaire de lui couper les plumes.</p>	
<p>Marans</p> <p>Les marans ressemblent à Plymouth Rocks et sont principalement gris foncé avec des flottements blancs. Les marans sont des oiseaux de taille moyenne à double usage qui produisent environ 200 œufs par an. Ils sont réputés pour leurs œufs brun foncé vibrants et savoureux. Leurs œufs sont généralement de taille moyenne. Les Marans sont douces et ne nécessitent pas beaucoup d'espace pour se déplacer. Cependant, ils ne sont pas d'un tempérament docile et, par conséquent, ne font pas de bons animaux de compagnie.</p>	

4 Cryopréservation des ressources génétiques de volaille

En général, les races aviaires africaines sont en péril. La perte progressive de cette diversité génétique est causée par la consolidation industrielle de races exotiques, l'utilisation combinée de technologies de sélection génétique et de reproduction hautement efficaces et l'évolution des conditions économiques. De plus, une sélection intense pour des caractères économiquement souhaitables entraîne des anomalies génétiques ou des combinaisons génétiques qui réduisent la viabilité et la rentabilité. Faire face à cette perte de diversité génétique nécessite des stocks génétiques alternatifs. Les épidémies successives de grippe aviaire ont démontré à quel point les ressources génétiques peuvent être facilement perdues et entraîner des pertes économiques à long et à court terme. Diverses ressources génétiques sont nécessaires pour développer des lignées résistantes aux maladies émergentes et résilientes au changement climatique. La biobanque des ressources génétiques avicoles africaines permettra aux chercheurs/éleveurs d'atténuer rapidement les menaces pesant sur les systèmes de production locaux. Les réserves de matériel génétique avicole offrent une protection aux producteurs et consommateurs africains. La conservation des ressources génétiques avicoles fournit également aux éleveurs les ressources nécessaires pour structurer les populations locales afin de répondre à la demande mondiale croissante de viande et d'œufs de volaille. L'efficacité des systèmes de production et la capacité de produire de nouveaux produits avicoles dépendent de la diversité génétique disponible parmi et entre les races.

La conservation des volailles vivantes, à la fois in situ et ex situ, est très coûteuse et comporte un risque de mortalité due à des maladies, telles que la grippe aviaire. La cryoconservation des CSPs, qui sont des progéniteurs d'ovules et de spermatozoïdes, offre un moyen alternatif de préserver le matériel génétique mâle et femelle chez les volailles. Les cellules germinales primordiales de la volaille peuvent être récoltées à partir du blastoderme, du sang de l'embryon ou de gonades âgées de neuf jours et conservées dans l'azote liquide comme le sperme, l'ovule et l'embryon chez les mammifères. Une procédure généralisée illustrant les principaux points du processus de cryoconservation est présentée ci-dessous (Tiersch 2011b):

- Collecte d'échantillons et contrôle qualité
La collecte d'échantillons de matériel génétique (œufs fertiles dans ce cas) doit être effectuée par du personnel formé capable d'identifier les œufs frais et fertiles. Après le prélèvement, des échantillons frais sont examinés, nettoyés et étiquetés. Seuls les échantillons qui répondent à des critères de qualité spécifiques doivent être utilisés. Le statut biosanitaire (maladie) du troupeau doit être noté.
- Emballage, scellage et étiquetage d'échantillons
Le choix de l'emballage des œufs doit être éclairé par plusieurs facteurs, notamment un choc réduit, un transfert de chaleur efficace, un traitement manuel ou automatisé, un scellage et un étiquetage et la durée de stockage, etc.
- Refroidissement des échantillons
La vitesse de refroidissement est un facteur critique pour la survie des cellules et doit généralement être déterminée expérimentalement. Le refroidissement peut être réalisé à l'aide de congélateurs programmables, de vapeur d'azote liquide, de CO₂ solide (glace sèche) ou d'autres méthodes où les vitesses de refroidissement sont contrôlables.

- Stockage des échantillons dans l'azote liquide

Les échantillons sont généralement stockés dans de l'azote liquide (-196 C) ou de l'azote vapeur (-140 et -180 C) dans des équipements de stockage spécialement conçus (par exemple, des flacons à vide pour cryogènes). Théoriquement, les échantillons congelés pourraient être conservés à ces températures indéfiniment.

- Décongélation pour utilisation

Comme pour le processus de refroidissement, le réchauffement des échantillons congelés est essentiel pour la survie des cellules. Idéalement, des taux de réchauffement rapides sont préférés mais pas nécessaires. Le processus de réchauffement peut généralement être réalisé en utilisant un bain-marie à 40-60 C, un micro-ondes (Ewert 1988) ou des impulsions laser infrarouges (Jin et Mazur 2015; Daly et al. 2018). Les échantillons sont généralement utilisés pour la fertilisation immédiatement après la décongélation.

Le développement de protocoles de cryoconservation efficaces, robustes et standardisés est essentiel pour assurer la survie des cellules et constitue la voie principale pour l'application de la technologie de cryoconservation (Tiersch 2011). En plus d'une voie de cryoconservation robuste, des procédures sont nécessaires pour assurer une acquisition appropriée du matériel génétique (y compris le fond génétique, le nombre et la qualité des échantillons, l'état de la maladie), l'utilisation des échantillons après décongélation et la gestion de la qualité des produits (Hu et al. 2013 ; Hu et al. 2014). En outre, des bases de données, un inventaire d'échantillons, des protocoles de maintenance quotidienne des niveaux d'azote liquide et des stratégies de commercialisation doivent être développés pour la gestion des dépôts de matériel génétique destinés à un usage commercial ou à long terme (Torres et Tiersch 2018).

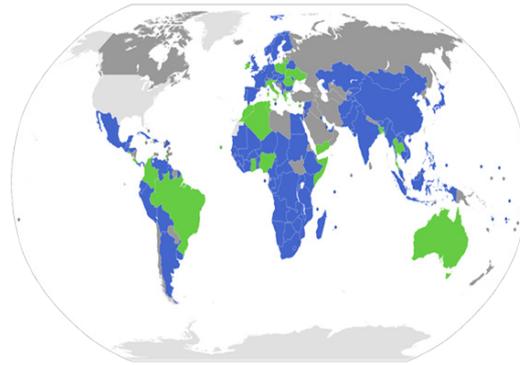
5 Collecte et traitement des œufs fécondés

5.1 La conformité légale

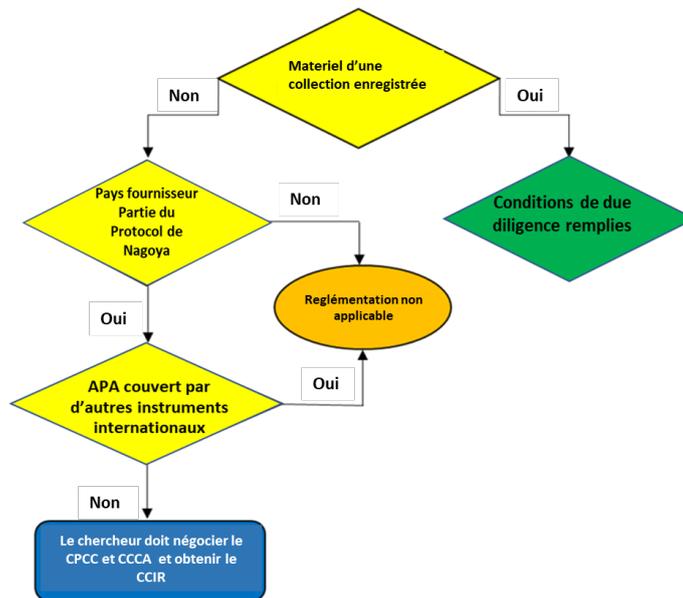
Le respect du cadre d'accès et de partage des avantages (APA) du Protocole de Nagoya devrait être une priorité lors de la collecte de toutes les ressources zoogénétiques (RGA), y compris celles provenant de la volaille. Vous trouverez ci-dessous quelques considérations clés pour la conformité avec le cadre APA du Protocole de Nagoya de la RGA (tableau 5) :

Tableau 5. Considérations clés pour le respect du cadre APA du Protocole de Nagoya pour les ressources zoogénétiques

<h4>5.1.1 Phase de planification initiale</h4> <ul style="list-style-type: none">• Le chercheur reçoit un financement pour la recherche• La ressource génétique (ou son dérivé) est identifiée par le chercheur• Le chercheur vérifie les exigences et les conditions d'APA du pays fournisseur• Le chercheur demande conseil au point focal et à l'autorité nationale compétente sur le consentement préalable en connaissance de cause (CPC) et les conditions convenues d'un commun accord (CCCA)• Le chercheur consulte Centre d'échange sur l'accès et le partage des avantages (ABS-CH) et s'inscrit sur le site Internet (méthode privilégiée)	 <p><i>In situ</i></p>  <p><i>Ex situ</i></p>
<h4>5.1.2 Le Protocole de Nagoya est-il applicable ?</h4> <ul style="list-style-type: none">• Si les ressources zoogénétiques sont obtenues à partir d'une collection enregistrée établie conformément aux réglementations nationales ou régionales, les exigences relatives à la diligence raisonnable sont alors remplies.• Vérifiez si le pays est partie au Protocole de Nagoya.• Certains pays ont proposé de mettre en œuvre des cadres juridiques englobant les dispositions APA du protocole de Nagoya, en partant du principe qu'elles seront acceptées comme une alternative à l'APA.	



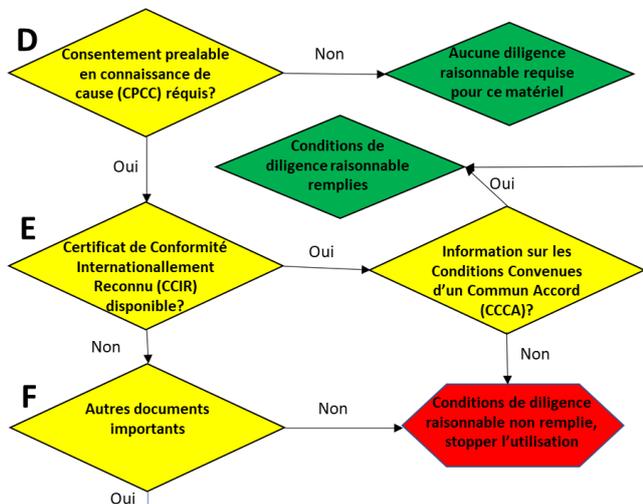
- Parties
- Uniquement signataire, mais non ratifié
- Non signataire, mais Partie de la Convention sur la Diversité Biologique
- Non signataire, non Partie de la Convention sur la Diversité Biologique



Faites une demande de CPCC le plus tôt possible à partir de :

- Autorités nationales compétentes
- Parties prenantes concernées
- Différents niveaux de gouvernement

5.1.3 Vérifications nécessaires



<p>D Les Parties peuvent mettre en œuvre des accords internationaux, qui suppriment la nécessité d’obtenir le CPCC (à condition que les accords ne soient pas contraires aux objectifs du Protocole).</p> <p>E Un certificat de conformité internationalement reconnu (CCIR) comprenant des informations sur le CPCC et les CCCA peut être utilisé comme preuve que la RGA n’a été acquise conformément au Protocole. Ces informations peuvent être utilisées dans le cadre de la procédure de recherche, de conservation et de transfert et doivent être conservées pendant plus de 20 ans après l’utilisation de la RGA n.</p> <p>F Si un CCIR n’est pas encore disponible, le chercheur doit rechercher, conserver et transférer d’autres documents pertinents liés à la RGA n.</p>	<p>Vérifications de la documentation nécessaire</p> <p>S’assurer que les ressources zoogénétiques existantes sont suffisamment documentées comme ayant été acquises avant la date d’entrée en vigueur du Protocole de Nagoya.</p> <p>Le Protocole de Nagoya n’aura pas d’effet rétroactif. Par conséquent, toute RGA n accessible avant le Protocole de Nagoya ne sera pas tenue de se conformer aux réglementations de l’UA</p>
--	--

Préparations Administrative
S’assurer que les systèmes administratifs sont en place afin que toute nouvelle RGA n soit documentée conformément au Protocole de Nagoya.

Procédures Internes
Organiser une formation interne pour sensibiliser le personnel au Protocole de Nagoya et aux obligations des utilisateurs de toute RGA n. Assurez-vous que le personnel comprend que la possession légale des ressources zoogénétiques n’accorde pas nécessairement au détenteur le droit d’effectuer un travail sur ou avec cette ressource.

Origines
Soyez conscient de l’origine de toute ressource zoogénétique à utiliser à des fins de recherche et de développement

Que faire de plus

- Documenter la RGA n obtenue
- Soyez prêt à répondre aux questions sur le statut juridique des ressources zoogénétiques acquises
- Considérez vos options pour accéder aux RGA n

5.1.4 CPCC et CCCA négociés et accordés par l’ANC APA

Stockez toutes les données documentant les étapes CPCC et CCCA même s’il n’y a pas d’obligation de vérifications nécessaires (due diligence)

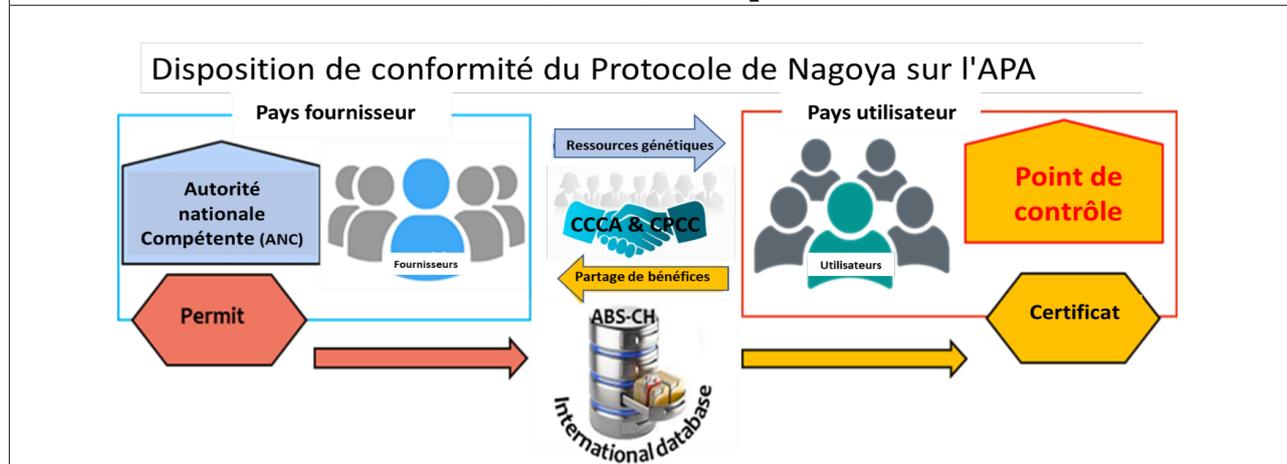
5.1.5 Commencez vos recherches en respectant:

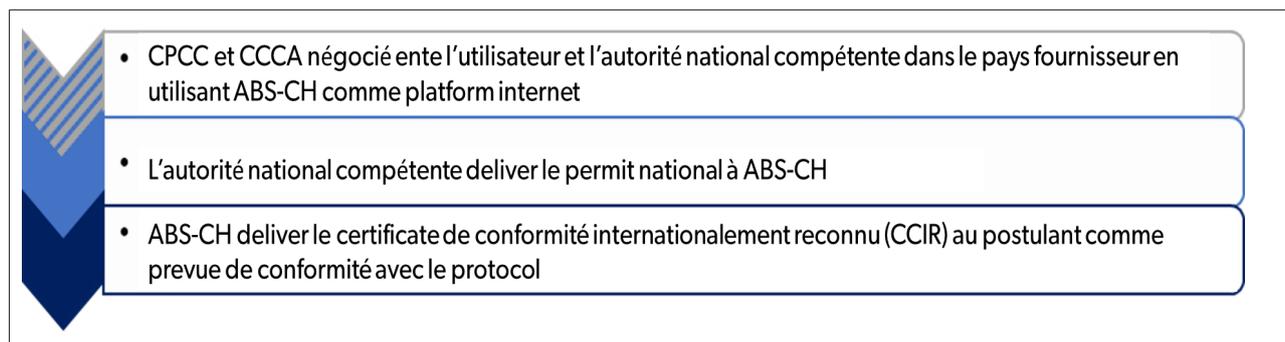
- Lois et réglementations locales et nationales ;
- Coutumes, traditions, valeurs et pratiques coutumières des peuples autochtones et communautés locales (PACL) ;
- Principes de conservation et d’utilisation durable des ressources biologiques ;
- Coopération avec les chercheurs et les institutions locales.

5.1.6 Partager les résultats avec les parties prenantes du pays fournisseur

- Partager des informations avec les populations, les communautés et les institutions locales ;
- Mettre les résultats de la recherche à la disposition de l’autorité APA du pays fournisseur ;
- Fournissez à vos partenaires de recherche l’accès aux résultats.

5.1.7 Rechercher et conserver le certificat de conformité internationalement reconnu (CCIR) et la procédure de transfert





5.2 Métadonnées associées

Aucun matériel génétique ne devrait avoir accès au biodépôt ou banque de gènes sans une documentation appropriée.

Tableau 6. Métadonnées associées à la collecte des œufs

<ul style="list-style-type: none"> • Date et lieu d'accès. • Description de la ressource génétique utilisée. • Source directe de la RGA/connaissances traditionnelles et de tout utilisateur ultérieur. • Accords APA, permis d'accès, CCCA et tous droits ou obligations liés à l'APA. 	
---	--

5.3 Traitement, étiquetage, emballage et expédition

5.3.1 Traitement des œufs

Les œufs doivent être traités au site de production ou de collecte. Ils doivent être nettoyés pour éliminer l'excès d'humidité avant l'emballage. Le nettoyage élimine les contaminants empêchant ainsi la détérioration des œufs. Les œufs collectés doivent être regroupés selon des caractéristiques similaires, telles que la qualité et le poids. Cela nécessite l'examen des facteurs de qualité internes, par ex. l'état du blanc et du jaune d'œuf et la taille des alvéoles par le mirage ou des facteurs de qualité externes, tels que la forme, la texture, la propreté et la solidité de la coquille.

Tableau 7. Facteurs de qualité des œufs et leurs spécifications

Spécifications de qualité			
Facteur de qualité	AA	A	B
Coquille	Propre, non cassé et pratiquement normal	Propre, non cassé et pratiquement normal	Propre à légèrement taché*, non cassé et anormal
Chambre à air	3 mm ou moins de profondeur, mouvement illimité et libre ou pétillant	6 mm ou moins de profondeur, mouvement illimité et libre ou pétillant	Plus de 6 mm de profondeur, mouvement illimité et libre ou pétillant
Blanc d'œuf	Clair et ferme	Clair et raisonnablement ferme	Présence de petites taches de sang et de chair**
Jaune d'œuf	Contour légèrement défini, pratiquement exempt de défauts.	Contour assez bien défini, pratiquement exempt de défauts	Contour clairement visible, agrandi et aplati avec un développement de germe clairement visible mais pas de sang ou d'autres défauts graves

Pour les œufs dont la coquille est sale ou cassée, les normes de qualité apportent deux qualités supplémentaires:	
Sale	Autre élément de contrôle de qualité
Non cassé avec de la saleté adhérente ou des matières étrangères. Taches proéminentes ou zones modérément tachées de qualité au-delà de B	Coquille cassée ou fissurée mais membranes intactes et ne suinte pas ***
<p>* Zones modérément colorées autorisées (0,75 mm de surface si localisée ou 1,5 mm si dispersée) ** Petit (regroupant pas plus de 3 mm de diamètre) *** L'œuf a des membranes de coquille cassées ou fissurées et le contenu suinte ou peut suinter</p>	

Source: United States Department of Agriculture

La taille des œufs est déterminée par le poids. Par conséquent, il existe six catégories de poids différentes, comme indiqué dans le tableau 8.

Tableau 8. Catégories de taille des œufs en fonction du poids

Catégories	Poids (grammes)
Peewee	35–42
Petit	42–49
Moyen	49–56
Large	56–65
Extra large	65–70
Jumbo	70 et +

5.3.2 Étiquetage

L'étiquette contient des faits/informations importants sur les œufs, tels que la taille, le poids et la description de la qualité/catégorie. Les étiquettes peuvent également indiquer l'exploitation ou la ferme d'origine (localisation géographique), la date de ponte des œufs, des informations sur les poules pondeuses et le troupeau reproducteur, si possible.

5.3.3 Emballage

Malgré sa force relative, un œuf est un produit extrêmement fragile et même avec les meilleures méthodes de manipulation, de graves pertes peuvent résulter des dommages à la coquille. L'emballage est un élément important dans la livraison d'œufs de qualité au laboratoire. Elle englobe à la fois l'art de préparer les produits pour le stockage et le transport. L'emballage protège les œufs des micro-organismes, des prédateurs naturels, de la perte d'humidité, de l'altération, de la détérioration due aux températures sous-optimales et de l'écrasement possible pendant la manipulation, le stockage et le transport.

Une manipulation et un stockage appropriés aident également à contrôler la perte d'humidité des œufs. Les œufs ont également besoin de respirer, c'est pourquoi le matériau d'emballage utilisé doit laisser entrer l'air. Le matériau utilisé doit être propre et inodore pour éviter une éventuelle contamination et altération. Les matériaux d'emballage d'œufs authentiques peuvent être réutilisés. L'emballage doit être conçu pour résister à la manipulation, au stockage et divers modes de transport. Il doit également protéger les œufs contre les températures et l'humidité qui peuvent entraîner une détérioration. De nombreux facteurs doivent être pris en considération lors de l'emballage des œufs. Il s'agit notamment de l'entretien de la qualité, des installations de stockage, du type de transport, des distances de déplacement, des conditions climatiques, du temps, etc.

Comme décrit dans le tableau 9 ci-dessous, il existe de nombreux types différents d'emballages d'œufs, qui varient à la fois en termes de conception et de matériau d'emballage utilisé.

Tableau 9. Types d'emballage d'œufs

Type	Description de l'emballage	Avantages
1	Œufs emballés avec des balles de riz propres et inodores, de la paille de blé ou de la paille hachée dans un panier à parois fermes, une caisse ou un simple panier avec un matériau de rembourrage Bac de remplissage placé dans des boîtes ou des caisses	Réduit le risque de dommages à la coquille
2	Les plateaux de remplissage sont faits de pâte de bois moulée pour accueillir les œufs Construits de manière à pouvoir être empilés et placés dans des boîtes prêtes pour le transport	Les plateaux de remplissage offrent une méthode pratique pour compter les œufs dans chaque boîte, sans avoir à compter chaque œuf
3	Emballages plus petits en carton ou pâte de bois moulée/plastique Ou des caisses en carton recouvertes de film plastique, polystyrène etc.	Le polystyrène offre un meilleur amorti et une protection contre les odeurs et l'humidité en plus d'une résistance à la croissance des champignons et des moisissures

5.3.4 Stockage des œufs

Pour un stockage réussi des œufs, les conditions suivantes doivent être remplies :

- Les œufs doivent être propres ; ils ne doivent pas être lavés ni mouillés.
- Les matériaux d'emballage doivent être propres et inodores.
- La perte d'eau due à l'évaporation doit être minimisée.
- La salle de stockage doit être exempte de produits ou de matériaux altérants et doit être nettoyée régulièrement avec des désinfectants détergents inodores.
- Le local de stockage doit être maintenu à une température constante et à une humidité appropriée.
- Il doit y avoir une circulation d'air dans la salle de stockage.
- Les œufs devraient pouvoir respirer pendant l'entreposage.
- Dans la mesure du possible, la qualité intérieure doit être surveillée ; il doit y avoir une bonne proportion de blanc d'œuf épais et le jaune doit bien tenir.

5.3.5 Stockage au froid des œufs

Sous les tropiques, les œufs peuvent se détériorer très rapidement s'ils ne sont pas conservés à basse température. La température idéale pour le stockage dans de tels climats est de 13 °C ou moins (généralement entre 11 et 15 °C). Le paramètre le plus important est la durée de conservation des œufs. 7 à 10 jours à 14C.

Les facteurs les plus importants pour un stockage à froid réussi sont :

- La sélection et le conditionnement des œufs
- L'équipement et la préparation de la chambre froide
- Température, humidité et circulation d'air appropriées
- Tests périodiques de qualité
- L'ajustement progressif des œufs à des températures plus élevées lorsqu'ils sont retirés du stockage

5.3.6 La sélection et le conditionnement des œufs pour le stockage

Les œufs destinés à la conservation doivent avoir une coquille saine et propre avec des paramètres de qualité interne satisfaisants. Les œufs destinés à l'incubation ne doivent pas être conservés plus de sept jours, car l'éclosabilité commence à diminuer par la suite. Les œufs doivent être conservés au frais pendant le stockage. Lorsque le matériel d'emballage est réutilisé, il est extrêmement important qu'il soit propre, sans tache et qu'il permette aux œufs de respirer. Il doit également être solide si les caisses doivent être empilées.

Pour le stockage de grandes quantités d'œufs d'incubation, la salle de stockage doit avoir des sols, des murs et des plafonds en béton lavable. Les constructions en bois se sont avérées satisfaisantes, à condition qu'elles ne transmettent pas d'odeurs ou de saveurs étrangères aux œufs. La pièce doit être soigneusement nettoyée avec de l'eau chaude et du savon ou un détergent désinfectant inodore avant utilisation. Un dernier rinçage avec une solution d'hypochlorite aide grandement à désodoriser le local de stockage. Une application généreuse de chaux fraîchement éteinte sur des surfaces de plâtre non peintes est également utile. Après le nettoyage, la salle de stockage doit être aérée et complètement séchée avant que les portes ne soient fermées et la réfrigération allumée. Il est préférable de laisser la température et l'humidité se stabiliser pendant plusieurs jours avant d'introduire les œufs.

Un contrôle minutieux et précis de la climatisation est essentiel car les œufs gèleront à une température de $-2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. La pièce doit être bien construite et isolée. La réfrigération doit être capable de maintenir une température uniforme adéquate dans toutes les zones. Les caisses à œufs doivent être séparées par des bandes de bois et éloignées des murs pour éviter toute obstruction de la circulation de l'air. Les allées laissées pour faciliter la manipulation de caisses d'œufs spécifiques contribuent également à la circulation de l'air. Une ventilation périodique du local de stockage est conseillée pour favoriser les échanges d'air.

A des températures de stockage froides d'environ $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, l'humidité relative doit être maintenue à 75-80%. Dans de tels cas, la perte de poids des œufs ne doit pas dépasser 0,5% en moyenne. Au cours des premières étapes du stockage, lorsque le matériau d'emballage absorbe l'humidité à un taux élevé, les sols doivent être arrosés d'eau propre plusieurs fois par jour. Si la circulation d'air pulsé est possible, un laveur d'air par pulvérisation d'eau à température contrôlée peut être utilisé. Si l'humidité devient excessive, une partie de l'air peut être recyclée dans une unité contenant du chlorure de calcium. Lorsque les œufs ont été huilés, moins d'attention peut être accordée au niveau d'humidité.

5.3.7 L'adaptation progressive des œufs à des températures plus élevées

Des précautions doivent être prises lors du retrait des œufs de la chambre froide pour éviter la condensation d'humidité sur les coquilles. Ceci est minimisé en augmentant lentement la température ou en déplaçant les œufs dans des pièces à températures intermédiaires. En cas de condensation, les œufs doivent être conservés dans des conditions permettant à l'humidité de s'évaporer en une journée.

L'aménagement de l'installation d'emballage et de stockage est d'une grande importance pour une gestion efficace et efficiente. Les différentes pièces doivent être maintenues propres, bien ventilées et, si nécessaire, une réfrigération doit être prévue. Tout le personnel travaillant dans l'établissement doit porter des blouses propres, utiliser des casquettes ou des bandeaux et se laver les mains lors de la manipulation des œufs et de l'équipement. Tout le matériel utilisé doit être propre.

5.3.8 Expédition d'œufs

Pour réussir le transport des œufs, trois exigences essentielles doivent être remplies :

- a. Les conteneurs et les matériaux d'emballage doivent être tels que les œufs soient bien protégés contre les dommages mécaniques.
- b. Des précautions doivent être prises à toutes les étapes de la manipulation et du transport. Le personnel qui manipule les œufs doit le faire avec précaution.
- c. Les œufs doivent toujours être protégés des températures extrêmes ainsi que des contaminations pouvant affecter les embryons.

La plage de températures admissible pendant le transport dépend des conditions climatiques locales et de la durée du trajet. Le tableau 10 indique les températures recommandées pendant le chargement et le transport des œufs.

Tableau 10. Températures recommandées pendant le chargement et le transport des œufs

	Transport sur 2 à 3 jours	Transport sur 5 à 6 jours
Température maximale au chargement (°C)	+6	+3
Température recommandée pendant le transport (°C)	-1 to +3	-1 to +1
Température acceptable pendant le transport (°C)	1 to +6	1 to +3

Des précautions sont nécessaires pour éviter les secousses excessives, en particulier là où les routes sont mauvaises. Les contenants d'œufs doivent être empilés étroitement et attachés solidement pour minimiser les mouvements. Des housses doivent être utilisées pour protéger les œufs du soleil, de la pluie et du froid extrême, le cas échéant. Lorsque des vélos sont utilisés, un dispositif tel qu'un support spécial suspendu à des ressorts peut être utile. Une condition de base pour tout transport longue distance est que des dispositions doivent être prises pour une réception, une manutention et un stockage appropriés à la fin du voyage afin d'éviter une détérioration substantielle de la qualité

Les exigences pour le bon fonctionnement des équipements de transport réfrigérés sont strictes, notamment en ce qui concerne les facteurs suivants :

- Efficacité et durabilité de l'isolation
- Adéquation et fiabilité du mécanisme de refroidissement et
- Circulation adéquate de l'air à l'intérieur du véhicule ou du conteneur pour minimiser les variations de température.

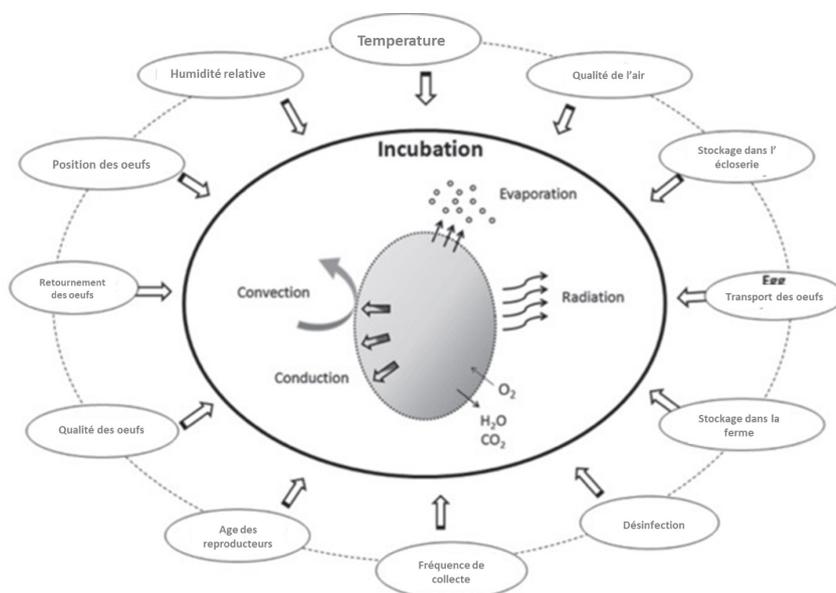
6 Processus d'incubation des œufs

6.1 Exploitation du couvoir et assainissement

- La salle d'incubation et d'écloserie (laboratoire sale) doit être séparée de la salle de prélèvement cellulaire et d'injection (laboratoire propre).
- Le moment de la mise en place des œufs dans l'incubateur doit tenir compte du temps et du type d'expérience, ainsi que de la capacité de l'opérateur ou de l'équipe à travailler avec ce nombre d'œufs pendant la période requise de développement des œufs.
- Évitez d'utiliser des œufs de qualité inférieure (pesant moins de 32 grammes, fêlés ou sales).

Plusieurs facteurs (Figure 11) peuvent affecter les résultats de l'incubation.

Figure 11. Facteurs affectant les résultats de l'incubation.



Source : Boleli et al., 2016

Les échanges physiques entre les œufs et l'environnement pendant l'incubation (transfert de chaleur, perte d'eau et échanges gazeux) dépendent des caractéristiques de l'œuf (taille, composition, forme et épaisseur de la coquille, porosité, conductance de la chaleur et de la vapeur d'eau), du taux de métabolisme de l'embryon, des conditions physiques d'incubation et les conditions de pré-incubation.

Les quatre exigences principales pour l'incubation d'œufs fertiles de bonne qualité sont :

- Température correcte et uniforme surveillée par un thermomètre ou un thermocouple

- Humidité correcte contrôlée par le taux de ventilation et l'application d'eau
- Corriger les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone contrôlées par la ventilation
- Retourner (environ 90°) les œufs fécondés plusieurs fois par jour par des moyens manuels ou automatiques

Ces paramètres peuvent être facilement atteints et maintenus si les instructions d'utilisation de l'incubateur sont scrupuleusement respectées.

6.2 Température d'incubation et humidité relative

Les exigences de température pour l'incubation sont décrites dans le tableau 11 ci-dessous. La plupart des incubateurs ont une variation de température de 0,2 à 0,4 °C pour une incubation efficace et un taux d'éclosion élevé.

Les embryons ont une faible tolérance aux variations de température de plus de 1 °C au-dessus ou en dessous du niveau recommandé. Des températures en dehors de la plage recommandée entraîneront une mortalité embryonnaire importante. Les embryons sont particulièrement sensibles aux variations de température au cours des phases précoce et tardive de l'incubation.

Tableau 11. Période d'incubation et plages de température et d'humidité recommandées pour diverses espèces de volaille

	Poule	Dinde	Canard	Canard de barbarie	Oie	Faisant	Pintade	Caille
Durée d'incubation (jours)	21	28	28	35	28	23-28	28	23-24
Température d'incubation (°C)	37.6	37.4	37.5	37.5	37.4	37.6	37.6	37.6
Température de bulbe humide (°C)	29.4-30.5	28.3-29.4	28.8-30	28.8-30	30-31.1	30-31.1	28.3-29.4	28.8-30
humidité Relative (%)	56-62	51-56	53-60	53-60	60-65	60-65	51-56	53-60
Nombre de retournement quotidiens	18	25	25	31	25	21	25	21
Incubation température (°C) des 3 derniers jours	37.4	37.2	37.3	37.3	37.2	37.4	37.4	37.4
Température humides (°C) des 3 derniers jours	32.2-34.4	32.2-34.4	32.2-34.4	32.2-34.4	32.2-34.4	33.3-35	32.2-34.4	32.2-34.4
Humidité relative des 3 derniers jours (%)	70-83	70-83	70-83	70-83	70-83	76-90	70-83	70-83

Source: Poultry Hub Australia, 2021

Pour les incubateurs à air immobile, ajoutez environ 1°C aux températures de fonctionnement recommandées dans le tableau 1. Ceci est dû au fait que le thermomètre dans les incubateurs à air immobile est normalement situé au sommet de l'incubateur et il y a un gradient de température marqué du haut de l'incubateur à le fond.

Le maintien d'une humidité relative constante est plus difficile pendant l'incubation et ne peut être constamment maintenu que par le taux de ventilation, en utilisant des ouvertures de ventilation réglables et par l'eau de surface et les pulvérisations d'eau pendant l'incubation. La tolérance de l'embryon à différentes plages d'humidité est supérieure à la température, mais des conséquences négatives sont observées avec une humidité inférieure à 40% et supérieure à 90%. Une bonne éclosabilité est obtenue lorsque l'humidité relative est maintenue à environ 50-65% jusqu'aux 3 derniers jours d'incubation, moment auquel elle doit être augmentée entre 70-90%.

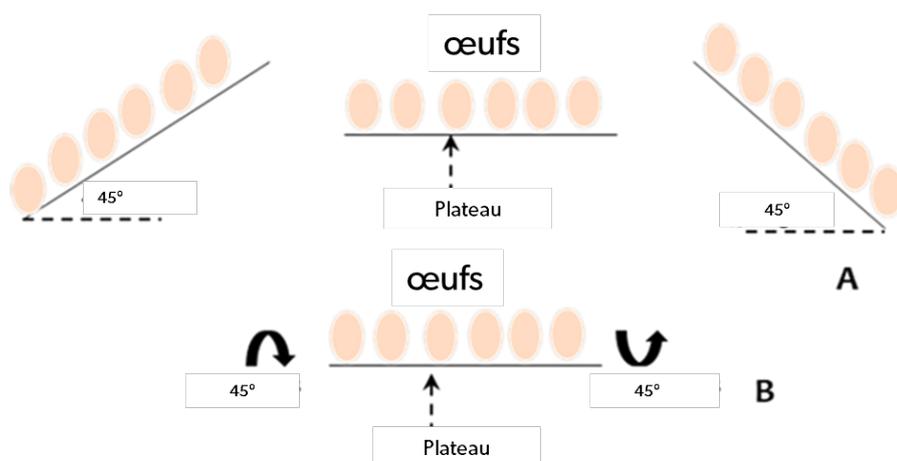
6.3 Aération et concentration en dioxyde de carbone/oxygène

La croissance embryonnaire est optimisée à une concentration en dioxyde de carbone de 0,4 %. Inversement, la croissance embryonnaire est réduite et la mortalité augmentée lorsque les concentrations de dioxyde de carbone dépassent 1 %. L'atmosphère normale contient 21 % d'oxygène et 0,04 % de dioxyde de carbone. Le poussin éclos est le plus sensible à la déviation de l'oxygène (par rapport au poussin piqué et à l'embryon dans l'œuf intact), ce qui implique que le taux de ventilation et la concentration de dioxyde de carbone sont les plus critiques à la fin de la phase d'incubation.

6.4 Retournement des œufs

La rotation ou le retournement des œufs est nécessaire pour s'assurer que l'embryon qui se développe sur le jaune n'adhère pas à la membrane de la coquille. Ce phénomène d'adhérence à la membrane de la coquille se produit couramment pendant le stockage et l'incubation précoce (généralement la première semaine) des œufs fertiles. Le processus de retournement permet à l'embryon de tourner et de glisser dans le blanc intérieur et lui donne accès à des nutriments supplémentaires pour le développement embryonnaire. Le retournement des œufs doit être effectué trois à six fois par jour et un nombre impair de rotations est préférable afin que les œufs ne soient pas dans la même position pendant de longues périodes. La plupart des incubateurs font automatiquement pivoter les œufs d'environ 90°.

Figure 12. Retournement des œufs dans des incubateurs verticaux (A) et horizontaux (B). Adaptée de Boleli et al., (2016)

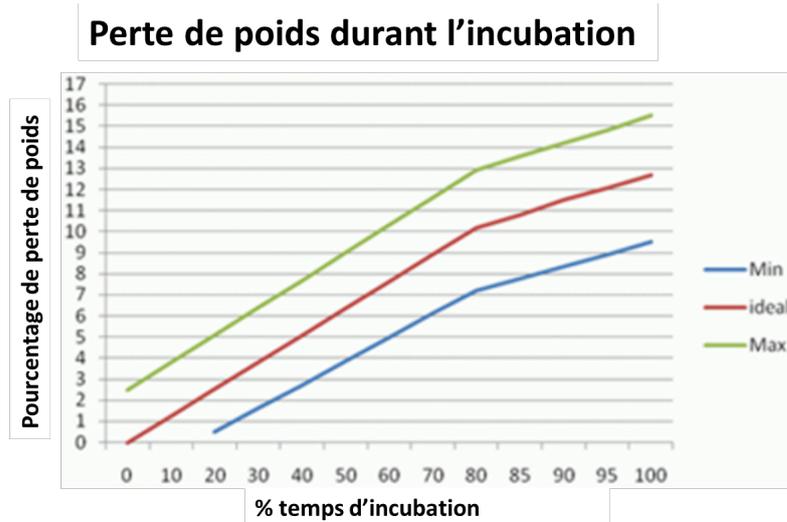


6.5 Mirage des œufs incubés

Les œufs doivent être examinés à des moments appropriés à l'aide d'un mire-œuf pour évaluer le développement des vaisseaux sanguins de l'embryon (en forme de toile d'araignée) et une tache sombre. Les œufs non fécondés sont manifestement clairs sans trace de sang et la mort embryonnaire précoce est notée par la présence d'un anneau sanguin entourant le jaune. Les œufs infertiles et les embryons morts sont retirés à ce stade. Le mirage peut également être entrepris à 18 jours d'incubation, où l'embryon est clairement visible avec une ligne de démarcation distincte entre l'embryon et la chambre à air.

Les œufs avec un embryon en croissance se dessèchent progressivement tout au long de l'incubation. Il en résulte une perte de poids globale de l'œuf. Cette perte de poids progressive peut être surveillée objectivement pour assurer le succès de l'incubation. La figure 13 ci-dessous est un guide pour surveiller la perte de poids des œufs pendant l'incubation. La perte de poids totale idéale est de 13 %.

Figure 13. Pourcentage idéal, minimum et maximum de perte de poids des œufs pendant l'incubation.



Source: Poultry Hub Australia, 2021

Lorsque toutes les mesures sont correctement prises, l'opérateur aura des poussins sains et actifs au jour 21. Le non-respect des procédures normales entraînera divers problèmes d'incubation et d'éclosion. Le tableau 12 présente certains des problèmes d'incubation et les causes possibles, tandis que la figure 14 illustre le processus de développement de l'embryon.

Tableau 12. Causes possibles des problèmes d'éclosion

Observation	Causes Possibles
Oeufs qui explosent	<ul style="list-style-type: none"> • Oeufs sales • Oeufs mal nettoyés • Incubateur sale
Pas de développement embryonnaire	<ul style="list-style-type: none"> • Oeuf non fertile • Manipulation brutale des œufs • Température d'incubation trop élevée • Température d'incubation trop basse • Oeufs conservés trop longtemps • Oeufs mal conservés • Éleveurs stressés • Trop de poules par coq • Poules ou mâles âgés ou en mauvaise santé • La consanguinité • Maladie
Anneau de sang	<ul style="list-style-type: none"> • Mortalité précoce • Vieux œufs • Température d'incubation trop élevée • Température d'incubation trop basse • Panne de courant électrique • Oeufs non retournés • La consanguinité • Infection • Mauvaise nutrition des reproducteurs
Chambre à air trop petite	<ul style="list-style-type: none"> • Humidité trop élevée

Observation	Causes Possible
Chambre à air trop large	<ul style="list-style-type: none"> • Humidité trop faible
Les poussins éclosent tôt, poussins secs, nombril sanglant, poussins trop petits	<ul style="list-style-type: none"> • Petits oeufs • Température trop élevée • Humidité trop faible
Les poussins éclosent tard	<ul style="list-style-type: none"> • Gros oeufs • De vieux œufs • Température trop basse • Humidité trop élevée
Chick morts après bêchage	<ul style="list-style-type: none"> • Oeufs non tournés les 2 premières semaines • Oeufs à coquille mince • Température trop basse pendant l'incubation • Température trop élevée pendant l'incubation • Humidité trop faible pendant l'incubation • Humidité trop élevée pendant l'incubation • Maladie infectieuse
Nombril non cicatrisé, Poussins humide	<ul style="list-style-type: none"> • Température trop basse pendant l'incubation • Grande variation de température dans l'incubateur • Humidité trop élevée pendant l'incubation • Mauvaise aération
Pattes et orteils malformés	<ul style="list-style-type: none"> • Température incorrecte pendant l'incubation • Mauvaise humidité pendant l'incubation • Les pattes peuvent également être blessées par l'éclosion ou la manutention de poussins
Poussins faibles	<ul style="list-style-type: none"> • Température trop élevée ou trop basse • De vieux œufs • Mauvaise aération
Poussins haletants	<ul style="list-style-type: none"> • Maladie : bronchite ou maladie de Newcastle
Malpositions	<ul style="list-style-type: none"> • Température trop élevée ou trop basse • Retournement inadéquat • Le gros bout de l'œuf n'est pas relevé lors de l'incubation • Œufs vieux ou mal manipulés • Mauvaise nutrition des reproducteurs

Figure 14. Développement de l'embryon de poulet



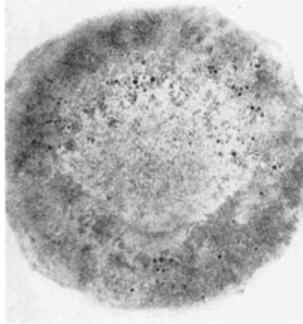
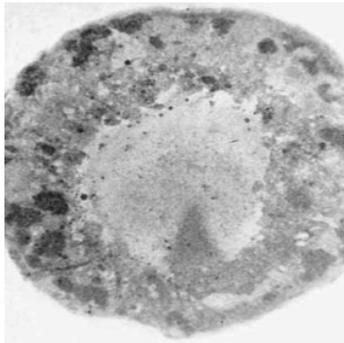
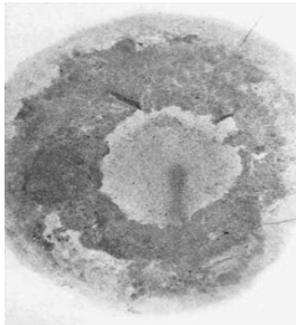
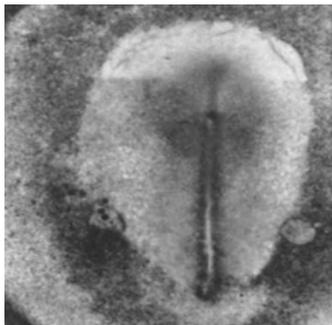
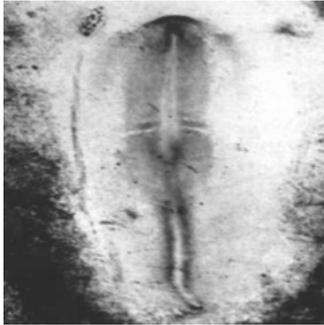
DÉVELOPPEMENT DE L'EMBRYON DE POULET

<p>Non FERTILE Pas de développement</p>	<p>JOUR 1 Début du développement des tissus</p>	<p>JOUR 2 Développement des tissus très visible Apparition des vaisseaux</p>	<p>JOUR 3 Battements du Cœur Vaisseaux très visibles</p>	<p>JOUR 4 Œil pigmenté</p>	<p>JOUR 5 Apparition du coude et du genou</p>	<p>JOUR 6 Apparition du bec Début de mouvements volontaires</p>
<p>JOUR 7 Croissance de la crête Apparition du bec</p>	<p>JOUR 8 Ebauche de plumes Mandibules sup. et inf. d'égale longueur</p>	<p>JOUR 9 L'embryon commence à ressembler à un oiseau L'ouverture buccale apparait</p>	<p>JOUR 10 Bec proéminent Ongles des ortells</p>	<p>JOUR 11 Crête dentelée Plumes caudales apparaissent</p>	<p>JOUR 12 Ortells entièrement forme Quelques plumes visibles</p>	<p>JOUR 13 Apparition des écailles Corps légèrement couvert de plumes</p>
<p>JOUR 14 L'embryon tourne la tête vers le bout large de l'oeuf</p>	<p>JOUR 15 L'intestin est aspiré dans la cavité abdominale</p>	<p>JOUR 16 Les plumes couvrent tout le corps L'albume a presque disparu</p>	<p>JOUR 17 Le liquide amniotique diminue La tête est entre les pattes</p>	<p>JOUR 18 Croissance de l'embryon Presque complète Le sac embryonnaire reste hors de l'embryon Tête sous l'aile droite</p>	<p>JOUR 19 Sac embryonnaire aspiré dans la cavité abdominale Liquide amniotique disparu L'embryon occupe la majeure parties de l'espace dans l'oeuf (saur chambre a air)</p>	<p>JOUR 20 sac embryonnaire total absorbé L'embryon devant le poussin</p>

COBB-VANTRESS, INC. • P.O. Box 1030 • Siloam Springs, AR 72761 • USA • Tel: 479.524.3166 • Fax: 479.524.3043 • info@cobb-vantress.com
 COBB EUROPE LTD • Oyster House, Severalls Lane, Colchester, Essex, UK • Tel: +44 1206 835835 • Fax: +44 1206 756864 • info@cobb-europe.com
 COBB-VANTRESS BRASIL, LTDA. • Rodovia Assis Chateaubriand, KM 10 • CEP: 15110-000/Caixa Postal 2 • Guapiacu-SP-Brasil • Tel: +55 (17) 3267 9999 • Fax: +55 (17) 3267 9992 • cobb.info@cobb-vantress.com.br
 COBB-VANTRESS PHILIPPINES INC. • 5/F 8101 Pearl Plaza, Pearl Drive • Ortigas Center, Pasig City Philippines • Tel: +63 2 634 3590 • Fax: +63 2 634 3598
www.cobb-vantress.com

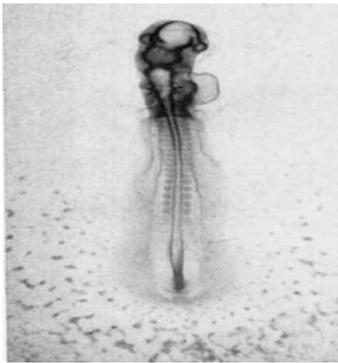
L-7030-02

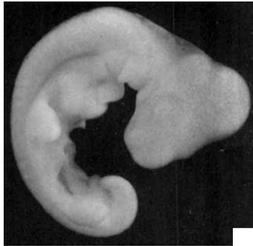
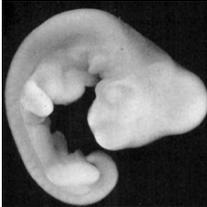
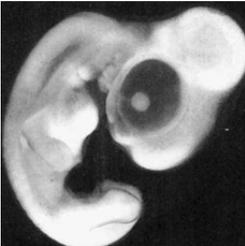
Tableau 13. Stades chronologiques du développement de l'embryon de poulet (HH) de Hamburger et Hamilton (1951)

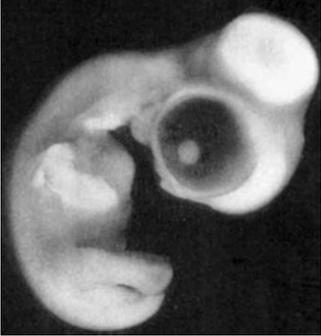
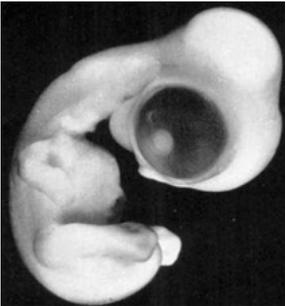
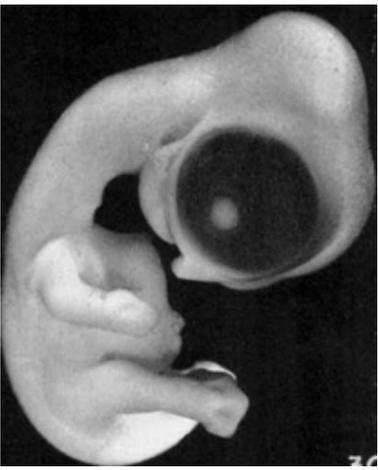
Stades	Temps/jours d'incubation		Événement embryonnaire principal
HH 1	Premières heures d'incubation		Pré-strie, bouclier embryonnaire
HH 2	6-7 heures		Strie initiale, Pré-gastrulation
HH 3	12-13 heures		Strie intermédiaire. Début de gastrulation,
HH 4-5	18-22 heures		Strie définitive à la tête processus, Gastrulation. La notocorde est visible sous la forme d'un bâtonnet de mésoderme à plaque latérale condensée
HH 6-7	23-26 heures		Pli supérieur, 3 somites, neurulation

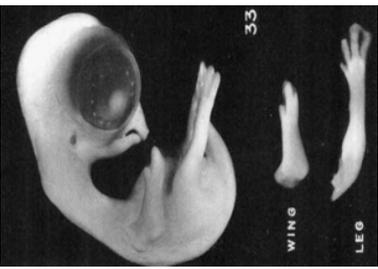
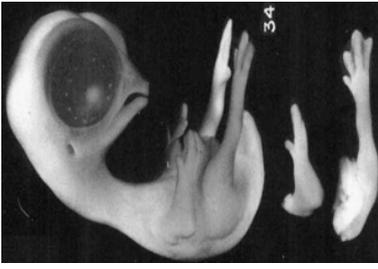
References des photos: Hamburger and Hamilton (1951)

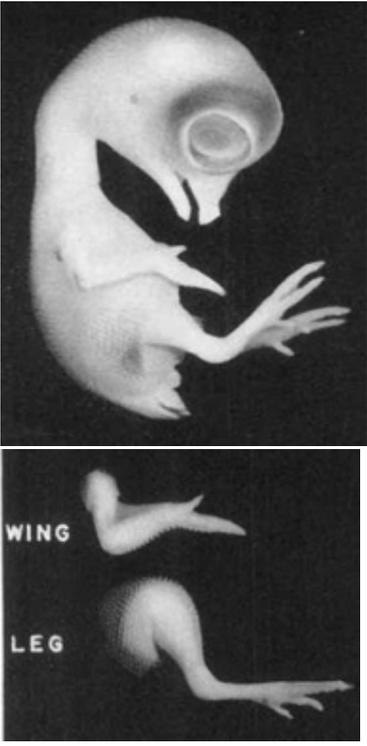
* Hutterstock, Royalty-free stock photo ID: 84408997

Stades	Temps/jours d'incubation		Événement embryonnaire principal
HH 8	26–29 heures		4 à 6 somites. Les plis neuraux se rencontrent au niveau du mésencéphale. Des îlots de sang sont présents dans la moitié postérieure du blastoderme
HH 9	29–33 heures		7 à 9 somites. Des vésicules optiques primaires sont présentes. Les primordia appariés du cœur commencent à fusionner.
HH 10–11	33–45 heures		10–15 somites. Trois vésicules cérébrales primaires sont clairement visibles. Vésicules optiques non rétrécies à la base. Légère flexion crânienne. Cinq neuromères du cerveau postérieur sont distincts. Le neuropore antérieur se ferme. Les vésicules optiques sont rétrécies à la base. Cœur penché à droite.
HH 12–13-	45–49 heures		16–19 somites. La tête tourne sur le côté gauche est légèrement en forme de S. Neuropore antérieur fermé. Télencéphale indiqué. Vésicules optiques primaires et pédoncule optique bien établis. La fosse auditive est profonde, mais grande ouverte. Le repli cardiaque de l'amnios creuse toute la région du cerveau antérieur.
HH 13+	50–52 heures		20 à 21 somites. La tête est partiellement à complètement tournée vers la gauche. Les flexions crâniennes et cervicales font de larges courbes. Élargissement distinct du télencéphale. Légère rétrécissement de l'ouverture à la fosse auditive profonde. Pas d'indication d'hypophyse. Canal auriculo-ventriculaire indiqué par une constriction. Le repli de l'amnios recouvre le cerveau antérieur, le mésencéphale et la partie antérieure du cerveau postérieur

Stades	Temps/jours d'incubation		Événement embryonnaire principal
HH 14-15	50-55 heures		22-27 somites. Flexions et iotation. Flexion crânienne : les axes du cerveau antérieur et du cerveau postérieur forment un angle droit
HH 16	51-56 heures (2.1 jours)		26-28 somites. Les plis latéraux du corps s'étendent jusqu'aux somites 17-20, entre les niveaux des ailes et des pattes. L'aile est décollée du blastoderme par repliement du pli latéral du corps. Il est représenté par une crête épaissie. Le primordium de la jambe est encore plat; représenté par une condensation de mésoderme.
HH 17-18	52-69 heures (2.5 jours)		29-36 somites. Les plis latéraux du corps s'étendent sur toute la circonférence du corps. Les bourgeons des ailes et des pattes ont décollé du blastoderme par repliement des plis du corps. Les deux sont des gonflements distincts de taille approximativement égale. Les bourgeons des membres agrandis ; stade 18 mangé des bourgeons des pattes légèrement plus gros que les bourgeons des ailes, la rotation s'étend maintenant à la partie postérieure du corps; par conséquent, les bourgeons de jambe ne sont plus dans le plan horizontal, le bourgeon de queue est tourné vers la droite, à environ un angle de 90° par rapport à l'axe du tronc postérieur.
HH 19-20	68-72 heures (3.0 jours)		37-43 somites. Les bourgeons des membres sont agrandis, symétriques. Bourgeons à pattes légèrement plus gros et plus volumineux que les bourgeons alaires. Bourgeon caudal courbé, son extrémité pointée vers l'avant. Les yeux non encore pigmentés au stade 19 ont une légère teinte grisâtre au stade 20.
HH 21-23	3.5-4 jours		43-44 somites. Au stade 21, membres : agrandis ; les bourgeons des ailes et des pattes sont légèrement asymétriques ; leurs axes de Proximo-distale sont dirigées en direction caudale. Les contours postérieurs des bourgeons des ailes et des pattes sont plus raides que les contours antérieurs ; ils rencontrent la ligne de base à un angle d'environ 90°.
HH 24	4.0 jours		Tous les somites se sont formés. Bourgeons alaires et pattes nettement plus longs que larges. Plaque numérique dans l'aile non encore délimitée. Plaque d'orteil dans le bourgeon de jambe distincte. Les orteils ne sont pas encore délimités.
HH 25-26	4.5-5 jours		Coude et genoux distincts (en vue dorsale ou ventrale). Plaque digitale en aile distincte, mais pas de démarcation des chiffres. Indication de légères rainures délimitant le troisième orteil sur la jambe. Au stade 26, Indication d'un léger sillon entre le deuxième et le troisième chiffre. La délimitation des trois premiers orteils est distinctes.

Stades	Temps/jours d'incubation		Événement embryonnaire principal
HH 27			Contour de la plaque digitale angulaire dans la région du premier doigt. Rainures entre les premiers, deuxièmes et troisièmes doigts indiqués. Les rainures entre les orteils sont distinctes sur les surfaces externes et internes de la plaque des orteils. Le premier orteil dépasse du tibia à un angle obtus. Le bout du troisième orteil n'est pas encore pointé
HH 28	5.5 jours		Contour de la plaque digitale angulaire dans la région du premier doigt. Rainures entre les premiers, deuxièmes et troisièmes doigts indiqués. Les rainures entre les orteils sont distinctes sur les surfaces externes et internes de la plaque des orteils. Le premier orteil dépasse du tibia à un angle obtus. Le bout du troisième orteil n'est pas encore pointé.
HH 29	6.0 jours		Aile pliée au coude. Deuxième doigt nettement plus long que les autres. Rainures peu profondes entre le 1er, 2nd et 3ième doigts. Les deuxièmes aux quatrièmes orteils se distinguent par des crêtes séparées par des rainures distinctes et des indications de toiles entre elles. Les contours distaux sont des lignes droites, parfois avec indication de convexité. Rudiment du 5e orteil visible. Le battement est plus prononcé.
HH 30	6.5 jours		Les trois principaux segments de l'aile et de la jambe sont clairement délimités. Aile pliée dans l'articulation du coude. Jambe pliée dans l'articulation du genou. Rainures distinctes entre le premier et le deuxième chiffre. Les contours des toiles entre les deux premiers doigts et entre tous les orteils sont des lignes concaves légèrement incurvées. Le processus mandibulaire se rapproche du bec, mais l'écart entre les deux est toujours visible. L'allongement du cou entre le « collier » et la mandibule est très visible. Le "Collier" commence à s'aplatir. Deux rangées dorsales de chaque côté de la moelle épinière au niveau brachial. Trois rangs au niveau des jambes ; elles sont assez floues au niveau thoracique. Aucun sur la cuisse. Bec plus prononcé qu'au stade précédent.
HH 31	7.0 jours		Indication d'une bande entre le premier et le deuxième doigt. Rudiment du 5e orteil encore distinct. L'écart entre la mandibule et le bec s'est réduit à un petit cran. Le "Collier" discret ou absent. Environ 7 rangs au niveau lombo-sacré. Papilles de plumes distinctes sur la cuisse. Une rangée indistincte sur chaque bord latéral de la queue.

Stades	Temps/jours d'incubation		Événement embryonnaire principal
HH 32-33			<p>Tous les doigts et 4 orteils se sont allongés de manière visible. Le rudiment du 5e orteil a disparu. Les toiles entre les doigts et les orteils sont minces et leurs contours sont concaves. Les différences de taille des doigts et des orteils individuels deviennent évidentes.</p> <p>L'extrémité antérieure de la mandibule a atteint le bec. « Collier » a disparu ou est à peine reconnaissable. Onze rangées ou plus sur la face dorsale au niveau des pattes. Une rangée sur la queue distincte, la deuxième rangée indistincte. Germes des rémiges scapulaires et de vol à peine perceptible à un éclairage optimal ou absents.</p> <p>Pour la queue, trois rangées distinctes, la rangée du milieu considérablement plus large que les autres.</p> <p>Les papilles sclérales sont au nombre de treize, formant un cercle presque complet, avec un espace pour une papille manquante à un point ventral près du milieu de la mâchoire.</p>
HH 34	8.0 jours		<p>Croissance différentielle du deuxième doigt et du troisième orteil bien visible. Les contours des toiles entre les doigts et les orteils sont concaves et arqués.</p> <p>L'allongement de la mandibule et du cou se poursuit</p> <p>Les germes de plumes sur l'omoplate, sur la face ventrale du cou, sur le pro-coracoïde et le bord postérieur (de vol) de l'aile sont visibles sous un bon éclairage. Les germes de plumes à côté de la ligne médiane dorsale, en particulier au niveau lombo-sacré, s'étendent légèrement sur la surface lorsqu'ils sont vus de profil. Des germes de plumes sur la cuisse dépassent de manière visible. Une rangée à l'intérieur de chaque œil. Aucun autour du cordon ombilical.</p> <p>La membrane nictitante s'étend à mi-chemin entre le bord externe de l'œil (paupière) et les papilles sclérales.</p>
HH 35	8-9 jours		<p>Les toiles entre les doigts et les orteils deviennent discrètes. Une protubérance transitoire sur le côté ulnaire du deuxième doigt est probablement un vestige de la toile. Les phalanges des orteils sont distinctes.</p> <p>L'allongement du bec se poursuit. Comparez la distance entre l'œil et le bout du bec, à ce stade et aux stades précédents.</p> <p>Les germes de plumes sont tous plus visibles. La ligne médio-dorsale ressort nettement en vue de profil. Au moins 4 rangées à l'intérieur de chaque œil. Nouvelle apparition de germes de plumes près de la ligne médiane ventrale, près du sternum, et s'étendant des deux côtés du cordon ombilical.</p> <p>La membrane nictitante s'est développée de manière visible et s'approche des papilles sclérales externes. Les paupières (externes à la membrane nictitante) se sont étendues vers le bec et ont commencé à envahir le globe oculaire. La circonférence des paupières est devenue ellipsoïdale.</p>

Stades	Temps/jours d'incubation		Événement embryonnaire principal
HH 36	10 jours		<p>Les segments distaux de l'aile et de la patte sont proportionnellement beaucoup plus longs. Longueur du troisième orteil, de sa pointe au milieu de son articulation métatarsienne = 5,4 0,3 mm. Les ébauches effilées des griffes sont juste visibles sur les extrémités des orteils et sur le premier doigt de l'aile. La protubérance sur la face postérieure du chiffre 2 de l'aile est manquante.</p> <p>Le primordium de la crête apparaît comme une crête proéminente avec un bord légèrement dentelé le long de la ligne médiane dorsale du bec. Un sillon horizontal (le « sillon labial ») est bien visible à l'extrémité de la mâchoire supérieure, mais est à peine indiqué sur l'extrémité de la mandibule. La narine s'est rétrécie en une fente. Longueur du bec de l'angle antérieur de la narine au bout du bec = 2,5 mm.</p> <p>Les plumes de vol sont bien visibles; les couvertures sont à peine visibles dans la toile de l'aile. Des germes de plumes recouvrent désormais la partie tibio-fibulaire de la jambe. Au moins 9 à 10 rangées de germes de plumes entre chaque paupière supérieure et la ligne médiane dorsale. Travées sternales proéminentes, avec 34 rangées de chaque côté de la ligne médiane ventrale lorsqu'elles sont comptées dans la partie antérieure du sternum, fusionnant en plusieurs rangées autour de l'ombilic.</p> <p>La membrane nictitante recouvre les papilles sclérales les plus antérieures et se rapproche de la cornée. La paupière inférieure s'est développée jusqu'au niveau de la cornée. La circonférence des paupières est une ellipse rétrécie avec son bord ventral aplati.</p>
HH 38	12 jours		<p>Les primordiums des écailles sont marqués sur toute la surface de la jambe; les crêtes ne se sont pas encore développées pour chevaucher la surface. Les pointes des orteils présentent un centre de cornification ventral ainsi qu'un centre dorsal plus étendu. Le coussinet plantaire principal est strié lorsqu'il est vu de profil. Longueur du troisième orteil = 8,4 et 0,3 mm.</p> <p>Rainure labiale délimitée par un sillon profond à l'extrémité de chaque mâchoire. Longueur du bec de l'angle antérieur de la narine au bout du bec = 3,1 mm.</p> <p>Les couvertures de la toile de l'aile deviennent coniques. Le méat auditif externe est entouré de germes de plumes. Le sternum est recouvert de germes de plumes, sauf le long de la ligne médiane. la paupière supérieure est couverte de germes de plumes nouvellement formés; la paupière inférieure est nue à l'exception de 2-3 rangées à son bord.</p> <p>La paupière inférieure couvre les deux tiers aux trois quarts de la cornée. L'ouverture entre les paupières est très réduite.</p>
HH 40-44	14 jours		<p>Longueur du bec du bord antérieur de la narine au bout du bec = 4,0 mm. Le canal principal du méat auditif n'est pas visible en vue strictement latérale de sa chambre externe</p> <p>Longueur du troisième orteil = 12,7 k 0,5 mm. Écailles se chevauchant sur les surfaces inférieures et supérieures de la jambe. Les loci de cornification dorsaux et ventraux s'étendent jusqu'à la base de la partie exposée de l'ongle. Toute la surface plantaire des phalanges est recouverte de papilles bien développées.</p> <p>Longueur du bec de l'angle antérieur de la narine à l'extrémité du bec supérieur = 5,7 mm. Le revêtement péridermique translucide du bec commence à se décoller proximale-ment. Troisième orteil : Longueur = 20,4 r + 0,8 mm.</p>

Stades	Temps/jours d'incubation		Événement embryonnaire principal
HH 46	20-21 jours		Poussin nouvellement éclos

References des photos: Hamburger and Hamilton (1951)

* Hutterstock, Royalty-free stock photo ID: 84408997

7 Collection de tissus embryonnaires contenant des cellules souches primordiales (CSP) de lignées ou races cibles

7.1 Collecte de sang pour la culture de CSP

Il s'agit de la collecte de CSP à partir de sang embryonnaire frais par aspiration. L'objectif est d'isoler des cellules germinales aviaires à partir de sang embryonnaire précoce d'œufs aviaires fertiles et de les propager en culture.

7.1.1 Equipement/réactifs

1. Incubateur 37C humidifié
2. Salle de culture tissulaire de catégorie 2
3. Incubateur d'œufs
4. Hotte a flux laminaire
5. Milieu de culture de cellules germinales (DMEM contenant du sérum de poulet et des facteurs de croissance recombinants)
6. Oeufs fécondés de poule
7. Ciseaux/pincettes stérilisés à l'éthanol 70%
8. 70% d'éthanol
9. Tubes microcapillaires tirés
10. Tube d'aspiration Sigma (Sigma A5177) composé d'un embout buccal en plastique, d'un tube en latex (15 pouces) et d'un embout nasal en caoutchouc de silicone
11. Tubes Eppendorf, boîtes de Pétri en rouleau bleu
12. Sac poubelle jaune
13. Pipette et embouts 10ul

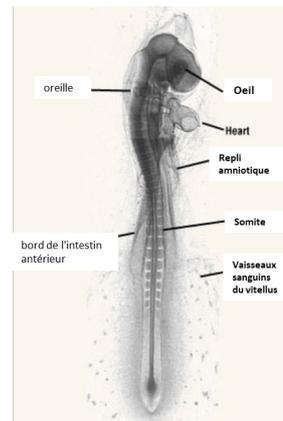
7.1.2 Sécurité

- Les embryons de poulet ne contiennent pas de matériel infectieux et ne constituent donc pas un risque biologique, mais des précautions appropriées doivent être prises et une protection individuelle appropriée doit être portée pendant la procédure (gants en nitrile bleu, blouse de laboratoire).
- L'aspirateur doit être rincé (robinet H2O), aspergé d'éthanol à 70 % et séché à l'air avant utilisation sur kimwipes ou serviette bleue. Le même protocole doit être utilisé une fois terminé pour éliminer la possibilité de contamination bactérienne des ovoproduits.
- Les microcapillaires en verre doivent être jetés dans une poubelle pour objets tranchants pour incinération immédiatement après utilisation. Il faut veiller à ne pas laisser de microcapillaires usagés sur la paillasse.
- Les déchets d'œufs sont jetés dans des sacs poubelles jaunes pour incinération.
- Des précautions doivent être prises pour ne pas mettre l'embout buccal en contact avec des surfaces de laboratoire - même une serviette bleue pourrait poser un problème après une courte période sur une paillasse de laboratoire. Il est recommandé de draper l'appareil sur la tête du microscope afin qu'aucune des extrémités ne touche une surface de laboratoire.
- L'aspiration de sang n'est autorisée qu'en salle d'embryologie du poulet ou dans le laboratoire dédié à cet effet.
- Il faut veiller à ne pas toucher le contenu des œufs avec des gants puis sur l'embout buccal. Les produits à base d'œufs crus doivent être traités avec soin. Changer souvent de gants.

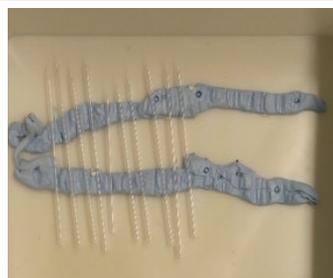
7.1.3 Procédure

7.1.3.1 Les œufs sont placés dans l'incubateur tôt le jour 1 (par exemple, mardi matin, 9h00) avec ou sans rotation. Ils sont retirés et laissés à température ambiante deux jours plus tard (jeudi) à 17h alors qu'ils ont 56 heures. Les embryons peuvent alors être prélevés, ou les œufs laissés une nuit à température ambiante et réincubés. Ils sont incubés tôt le vendredi pour les réchauffer pendant quelques heures. À ce stade, les embryons devraient être autour du stade 16 (voir le tableau 13) mais pas plus vieux que le stade 17.

<http://chickscope.beckman.illinois.edu/explore/embryology/day02/33hour.html>



7.1.3.2 Au microscope, cassez l'extrémité d'un capillaire à l'aide d'une pince stérilisée à l'éthanol, puis insérez la grande extrémité ouverte dans un tube d'aspiration. Drapé l'appareil d'aspiration sur le microscope en s'assurant que les deux extrémités n'entrent pas en contact avec les surfaces de laboratoire. Maintenez cette position tout au long de la procédure.

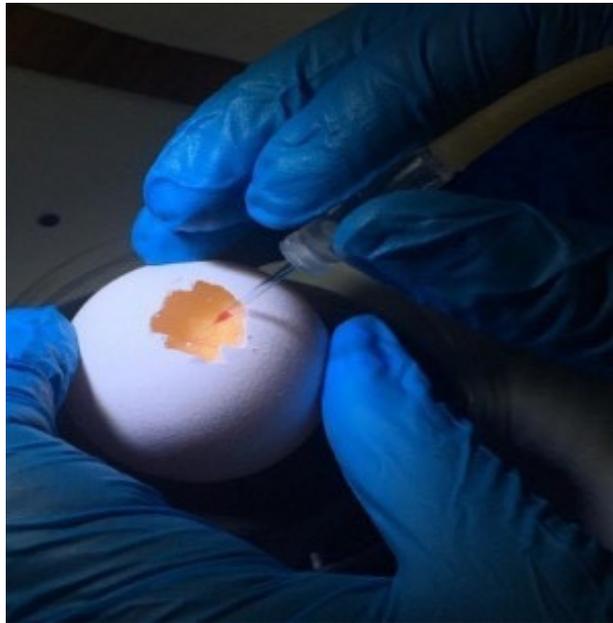


7.1.3.3 Prenez un œuf de l'incubateur. Vaporisez légèrement l'œuf d'éthanol et faites une petite fenêtre à l'aide d'une pince. Le cœur de l'embryon doit battre visiblement.

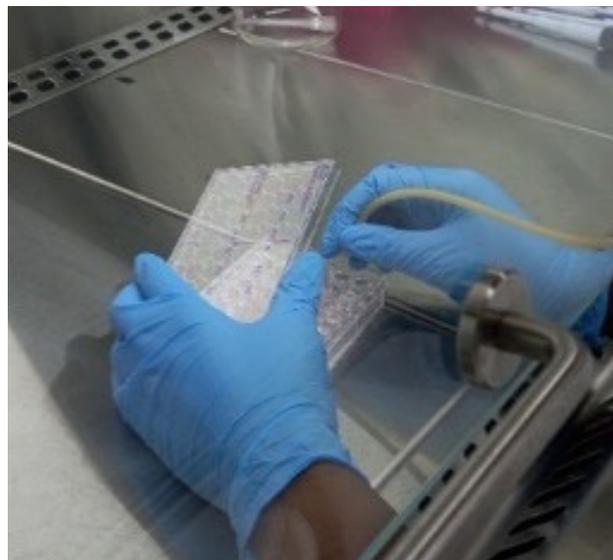
Si l'œuf est au bon stade, comme HH15-16, le reste des œufs doit être sorti de l'incubateur et refroidi sur une paille à température ambiante.



7.1.3.4 Soufflez une bulle sur la surface de l'œuf à l'aide d'un capillaire pour démontrer que l'aiguille est ouverte. Insérez capillaire dans l'aorte dorsale à un angle faible. Aspirer 1-2 µl de sang embryonnaire dans le capillaire.



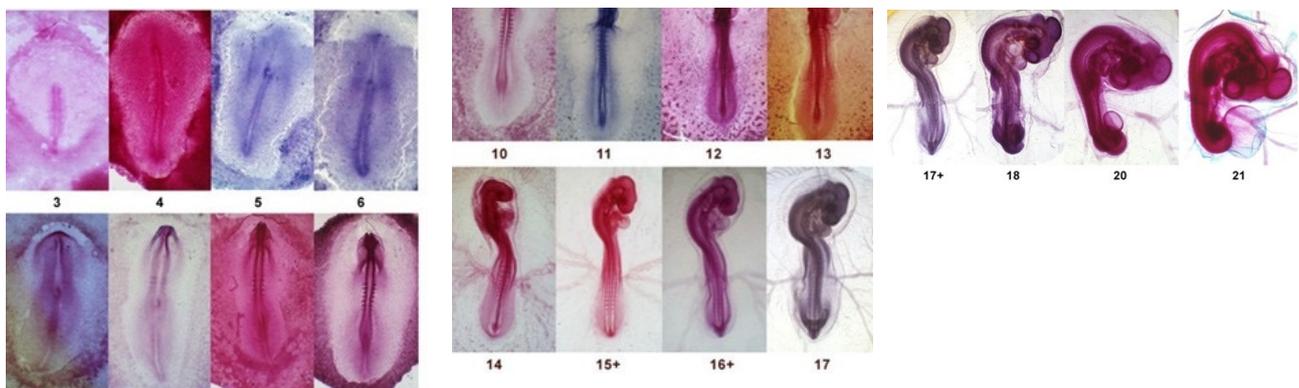
7.1.3.5 Allez à la hotte de culture tissulaire dans le laboratoire. Draper l'appareil d'aspiration sur le microscope afin que les deux extrémités ne touchent pas les surfaces du laboratoire pendant que la plaque est positionnée. Souffler un échantillon de sang dans un ou deux puits (contenant chacun 300 µl de milieu) d'une plaque de culture tissulaire à 48 puits. Répétez jusqu'à 20 embryons.



<p>7.1.3.6 Récoltez l'embryon pour l'ADN génomique pour le sexage. Tenir l'embryon avec une pince à épiler, utiliser une fine paire de ciseaux pour couper l'embryon de la membrane vitelline. Placer l'embryon dans un tube Eppendorf à conserver à -20 C pour la réaction en chaîne par polymérase sexuelle (PCR). Le reste de l'embryon et de l'œuf peut être jeté dans le sac jaune. Des ciseaux et des pincettes sont essuyés entre les échantillons à l'aide d'un rouleau bleu avec de l'éthanol à 70 %.</p>	
<p>7.1.3.7 Retirez soigneusement l'aiguille et jetez-la dans le bac prévu à cet effet.</p>	
<p>7.1.3.8 Les déchets et tous les œufs non expérimentaux et expérimentaux sont emballés dans des sacs jaunes doubles, étiquetés et placés dans le bac jaune de la chambre froide pour incinération ou éliminés conformément aux normes sanitaires locales.</p>	
<p>7.1.3.9 Le tube d'aspiration est lavé à l'eau du robinet, pulvérisé avec de l'éthanol à 70 %, laissé sécher à l'air libre puis stocké dans le kit de dissection personnel.</p>	

Un ensemble d'embryons fixés et colorés mis en scène selon Hamburger et Hamilton (1951) est présenté ci-dessous.

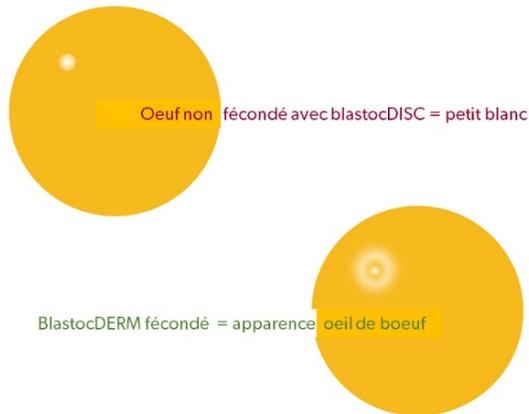
Figure 15. Un ensemble d'embryons fixés et colorés par Hamburger et Hamilton (1951).



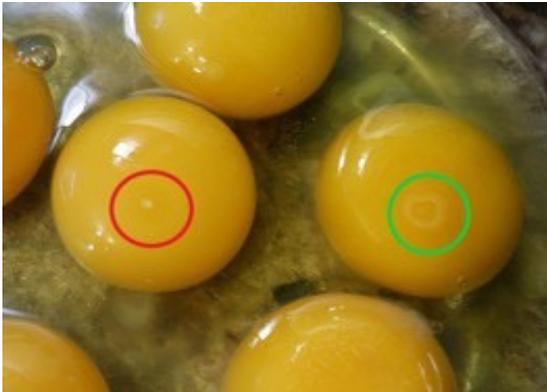
7.2 Isolement des CSP du blastodisque de poulet

L'objectif ici est de retirer le blastodisque des embryons du jour 1 après 4 à 6 heures d'incubation pour la dérivation de cultures de CSPs avec ou sans cryoconservation des tissus. La première partie du processus consiste à retirer le blastodisque

Figure 16. Évaluation de la fertilité des œufs.

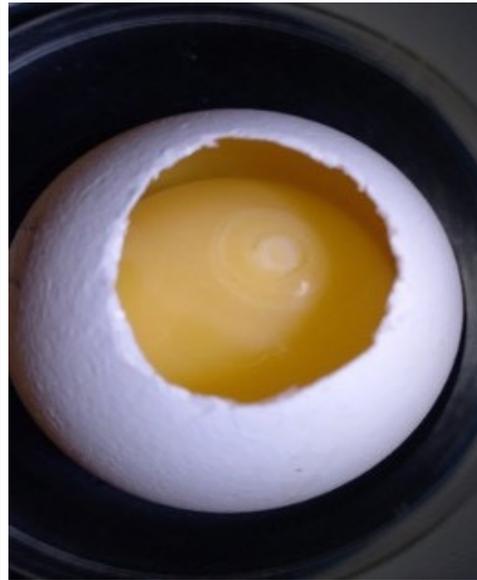


Vert = fertile, Rouge = infertile. Le petit point blanc s'appelle le blastodisque. Un blastodisque deviendrait un blastoderme s'il était fécondé³.

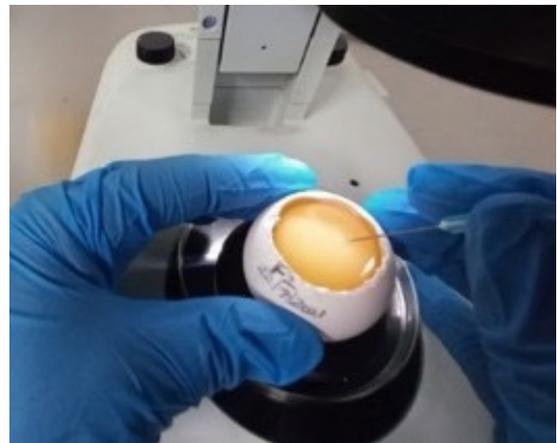
<p>7.2.1 Incuber les œufs fertiles pendant 4 à 6 heures à 38 °C.</p>	
<p>7.2.2 Prenez un œuf de l'incubateur. Vaporisez légèrement l'œuf avec de l'éthanol et créez une fenêtre. Le blastodisque doit être visible au-dessus du jaune ou bien casser la coquille en deux moitiés, passer l'œuf d'avant en arrière pour briser l'albumine. Déposez l'albumine dans une nacelle de pesée en plastique.</p>	

3. <https://steemit.com/homesteadersonline/@squishysquid/are-my-eggs-fertile-is-the-rooster-doing-his-job-how-to-tell>

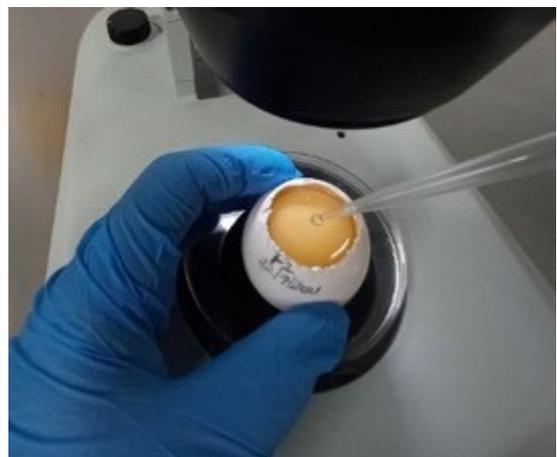
7.2.3 Caressez la surface du jaune avec une cuillère ou une pince émoussée pour amener le blastoderme vers le haut.



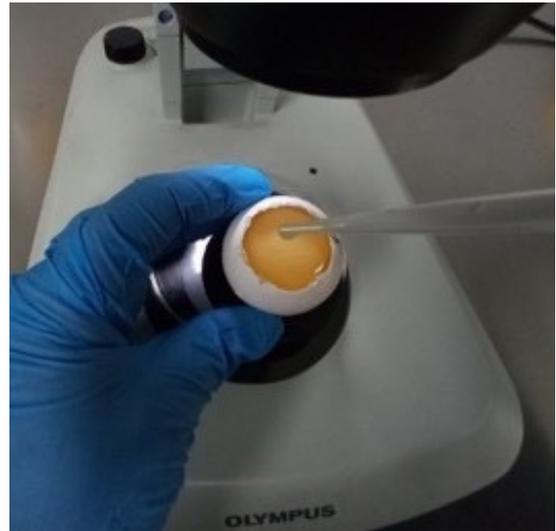
7.2.4 Percez le périmètre du blastoderme avec une aiguille stérile pour faire un cercle.



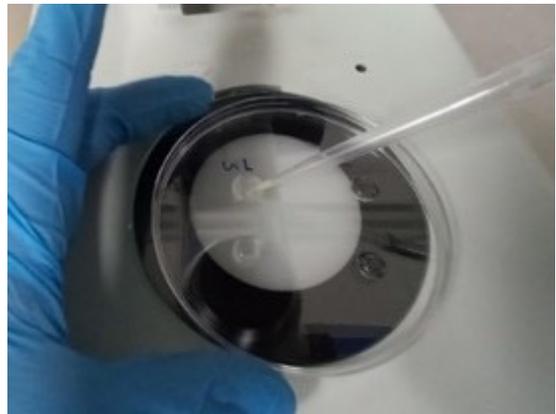
7.2.5 Ajouter des gouttes de solution Tampon phosphate saline (PBS) sur la surface pour aider à isoler le blastoderme des membranes environnantes.



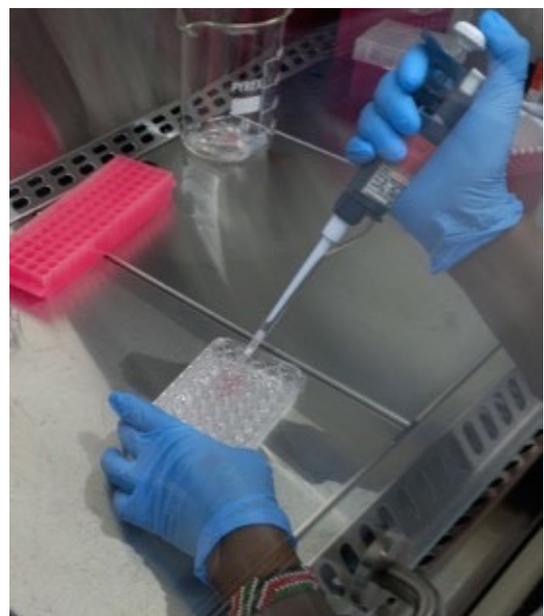
7.2.6 Aspirez délicatement le blastoderme dans l'embout d'une pipette de 1 ml.



7.2.7 Laver brièvement le blastoderme dans du PBS, puis transférer dans 20 μ l de PBS dans un tube à centrifuger stérile de 1,5 ml.



7.2.8 Laisser le tissu s'équilibrer puis briser le blastoderme dans 300 μ l de FAOT (FGF2, Activin A, ovotransferrine) et initier la culture dans une plaque de 48 puits.



7.2.9 Vous pouvez également congeler directement dans Stemcellbanker à -80 C pendant 24h, puis conserver dans de l'azote liquide (-196 C).



7.3 Timing approprié pour la collecte des CSP

L'entrée des CSPs de la partie antérieure de la région extra-embryonnaire dans le réseau vasculaire commence au stade 10 (Hamburger et Hamilton) et se termine au stade 13. Les CSPs mâles et femelles prélevés sur des embryons de poulet âgés de 5 à 9 jours (stades 27-31) peuvent se différencier en gamètes fonctionnels après transplantation. Les cellules germinales mâles obtenues à partir de testicules de poulet adultes conservent leur compétence germinale après transplantation sur des embryons de substitution, mais leur compétence semble inférieure à celle des CSPs. Contrairement aux mâles, la compétence de la lignée germinale des cellules germinales femelles est facilement perdue à partir de 15,5 jours après l'incubation en raison du début de la méiose. Compte tenu de ces facteurs, les moments appropriés pour la collecte et la transplantation des CSPs de poulet sont les stades 13-14 (48-53 heures) ainsi que 27-31 (5-9 jours) et les stades 13-16 (48-56 heures), respectivement.

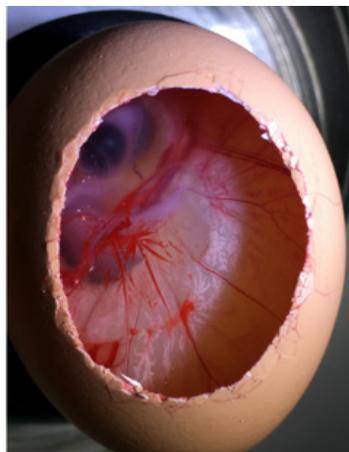
8 Biobanque des tissus reproducteurs embryonnaires de poulet

8.1 Neuf jours d'incubations des œufs de poulet avant dissection des gonades

Si la dissection du tissu gonadique est prévue le matin, les œufs doivent être mis en place le matin du jour de l'incubation afin qu'ils soient au stade de développement attendu.

8.2 Dissection des gonades

8.2.1 Ouvrez la coquille de l'œuf à l'extrémité émoussée à l'aide d'une pince et cassez la membrane de la coquille jusqu'à ce que le corps de l'embryon soit visible. L'image de droite montre la position de l'embryon dans l'œuf.



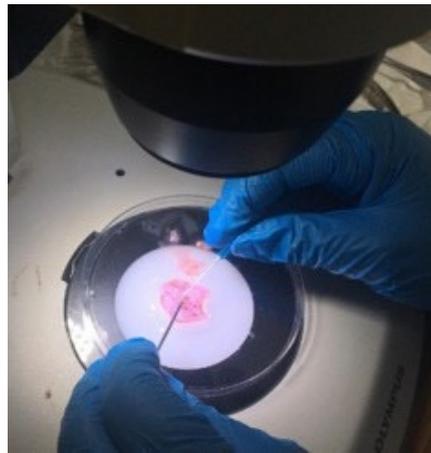
8.2.2 Retirez l'embryon et mettez-le dans une boîte de Pétri. Tuez l'embryon en utilisant la méthode de l'annexe 1 en déconnectant le cou à l'aide de pinces ou de ciseaux



8.2.3 Sous un microscope à dissection, positionnez le corps de l'embryon de sorte que son estomac soit tourné vers le haut. Couper l'embryon ouvert à l'aide de ciseaux pour exposer les organes internes. Pousser les organes vers la direction crânienne pour exposer les gonades et le mésonéphros.

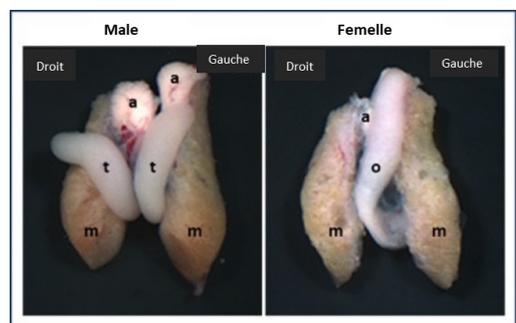


8.2.4 Disséquer doucement les deux gonades du mésonéphros à l'aide d'une aiguille hypodermique de 23 G (3,2 cm de longueur). Ramassez les gonades à l'aide d'une aiguille et transférez-les dans un milieu DMEM qui a été préalablement déposé dans la zone marginale de la même boîte de Pétri pour éliminer le sang supplémentaire.



Images de microscopie optique de gonades d'embryons de poulets mâles et femelles E19 (14 jours). Chez l'embryon mâle, les deux testicules ont une morphologie tubulaire et sont de taille similaire. Chez la femelle, l'ovaire gauche est une structure plus large avec une morphologie en forme de ruban (l'ovaire droit régresse)⁴.

Légende de l'image : [t = testicule ; o = ovaire ; m = mésonéphros ; a = surrénale].



8.2.5 Transférer les tissus gonadiques dans un tube Eppendorf de 1,5 ml (bouchon à vis) contenant 500 µl de milieu DMEM froid et conserver sur la glace jusqu'à ce que toutes les paires de gonades soient collectées.



4. <https://www.ed.ac.uk/roslin/chicken-embryology/images>

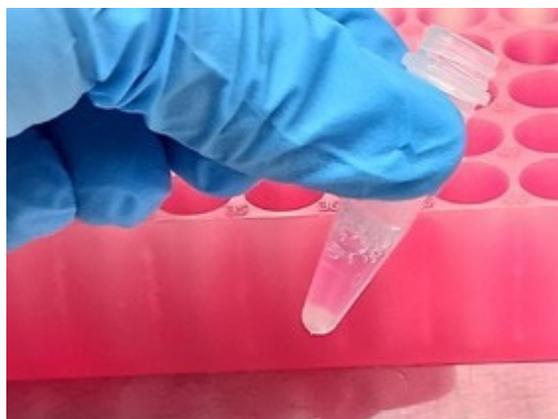
8.3 Cryopreservation des gonades entières

La découverte et l'élucidation de la fonction des cryoprotecteurs, tels que le glycérol, le propylène glycol et le méthanol, ont ouvert la voie au développement ultérieur de la technologie de cryoconservation du matériel génétique.

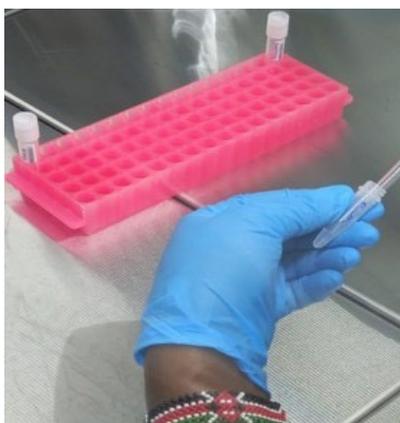
Généralement, les matériaux à refroidir sont composés de cellules biologiques, de tampons intracellulaires (à l'intérieur de la cellule) et de cryoprotecteurs dissous dans un tampon extracellulaire (à l'extérieur de la cellule). Les études sur la technologie de cryoconservation cherchent à quantifier les changements biologiques, chimiques et biophysiques qui se produisent au cours des processus de refroidissement et de réchauffement (dégel). Plus précisément, ces études examinent:

1. L'échange d'eau, de cryoprotecteur et d'ions à travers la membrane cellulaire (une membrane semi-perméable qui ne laisse passer que certaines substances tout en gardant d'autres à l'intérieur ou à l'extérieur)
2. Modifications de la taille et de la structure des cellules
3. Modifications intercellulaires ou extracellulaires avec ajout ou retrait de cryoprotecteur
4. Formation de glace extracellulaire ou intracellulaire et transfert de chaleur et
5. Effets des vitesses de refroidissement et de réchauffement.
6. Des études sur un large éventail de cellules individuelles, telles que les spermatozoïdes et les cellules sanguines (y compris les érythrocytes, les lymphocytes et les cellules hématopoïétiques), ont découvert les mécanismes responsables des lésions cellulaires pendant la cryoconservation (Pegg 2002). La procédure de cryoconservation des tissus gonadiques embryonnaires est décrite ci-dessous.

8.3.1 Placer le tube Eppendorf dans une centrifugeuse et le faire tourner pendant quatre secondes pour séparer les tissus gonadiques du milieu DMEM.



8.3.2 Retirez délicatement le surnageant du milieu DMEM sans perturber les tissus gonadiques au fond. Ajouter 100 µl de stemcellbanker au tube pour un échange moyen et faire tourner le tube conformément à la section 8.3.1 pour collecter le tissu au fond du tube.



8.3.3 Retirez délicatement le surnageant et ajoutez 200 μ l de stemcellbanker au tissu. Transférer tout le contenu dans un cryotube bien étiqueté.



8.3.4 Laisser le tissu gonadique dans le stemcellbanker à température ambiante pendant 15 min pour s'équilibrer. Placer les tubes dans un récipient de congélation Mr. Frosty™ pré-équilibré à -20 °C et placer dans un congélateur à -80 °C pendant une nuit.



8.3.5 Le lendemain, transférez les tubes dans de l'azote liquide à -196 °C et notez les positions de stockage.



9 Purification, enrichissement et culture à long terme des CSPs

Des études récentes sur plusieurs antigènes de surface cellulaire, tels que l'antigène embryonnaire spécifique au stade-1 (SSEA-1) et l'antigène embryonnaire de souris-1 (EMA-1) (Karagen et al. 1996), ont permis d'enrichir les CSPs de poulet par activation magnétique, tri cellulaire (MACS) ou tri cellulaire activé par fluorescence (FACS) (Mozdziak et al. 2005; Kim et al. 2004). Le système basé sur la réaction antigène-anticorps permet d'isoler les CSPs du sang et des gonades. Une méthode unique d'enrichissement de CSPs à partir de tissus gonadiques a été développée chez le poulet en utilisant la propriété biologique que les CSPs sont déchargées lorsque les gonades embryonnaires sont incubées dans une solution de tampon phosphate salin de Dulbecco (D-PBS) sans Ca^{2+} et Mg^{2+} (Nakajima et al. 2001). Il s'agit de la méthode la plus simple actuellement disponible pour récolter les CSPs de poulet et elle est potentiellement applicable à diverses espèces aviaires. À l'avenir, une nouvelle amélioration du taux de récupération des CSPs instables est attendue.

Les CSPs de poulet peuvent être propagées *in vitro* à long terme tout en maintenant la spécificité de la lignée et la compétence de transmission de la lignée germinale (van de Lavoie et al. 2006). Les CSPs de poulet isolées du sang embryonnaire peuvent être multipliées dans un milieu complexe contenant du sérum de poulet, du sérum fœtal de veau (FBS), du facteur de croissance des fibroblastes 2 (FGF2) et du milieu conditionné par des cellules de foie de buffle (BRL) sur un dispositif d'alimentation de cellules BRL ou Fibroblastes résistants à la thioguanine et à l'ouabaïne (STO) dérivés de souris consanguines Sandoz.

Plus récemment, McGrew et ses collègues de l'institut Roslin ont défini des conditions de culture sans sérum, sans cellules nourricières et physiochimiquement permissives pour les CSPs de poulet, s'assurant que le FGF2, l'insuline et l'activine sont suffisants pour la propagation des CSPs de poulet (Whyte et al. 2015). De plus, une condition d'osmolalité inférieure (250 mOsm/kg), l'une des caractéristiques du système de culture défini, a également permis une dérivation et une propagation efficaces des CSPs de poulet mâle et femelle. L'établissement de systèmes de culture à long terme de CSPs de poulet offre la possibilité d'amplifier de manière significative les CSPs de donneurs avant la cryoconservation (Nandi et al. 2016) ainsi que de manipuler le génome avec un clonage ultérieur (Schusser et al. 2013; Park et al. 2014; Oishi et al. 2016) d'une manière similaire aux cellules souches embryonnaires (ES) de souris chez le poulet. D'autres recherches sur les conditions de culture des CSPs aviaires autres que le poulet pourraient aider à la conservation des ressources génétiques du poulet.

10 Stockage et réutilisation des échantillons de CSPs

10.1 Conservation à ultra basse température des CSPs

La conservation à ultra-basse température des CSPs de poulet est effectuée à l'aide d'une méthode de congélation lente. Le protocole de congélation le plus largement utilisé est la cryoconservation des CSPs de poulet dans un milieu contenant du sérum additionné de 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) comme cryoprotecteur à une vitesse de refroidissement de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à ce que le milieu atteigne -80°C . Ce protocole de congélation donne environ 50 % de taux de récupération et plus de 85 % de viabilité des CSPs de poulet après décongélation. Cependant, l'utilisation d'un milieu contenant plus de 10 % de sérum et 5 à 10 % de DMSO ou 10 % d'éthylène glycol comme cryoprotecteurs et une vitesse de refroidissement de $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, entraîne des taux de récupération et une viabilité plus élevée de CSPs de poulet après décongélation par rapport aux protocoles de congélation classiques. Le sérum disponible dans le commerce et le cryomédium à base de DMSO entraînent également une récupération et une viabilité plus élevées des CSPs de poulet après décongélation que les protocoles de congélation habituels. En raison de sa plus grande disponibilité et de ses performances supérieures, le cryomédium commercial CELLBANKER1 (Nippon Zenyaku Kogyo, Koriyama, Japon) a été utilisé pour cryoconserver les CSPs de poulet

Contrairement à la méthode de congélation lente, une méthode de vitrification peut être utilisée pour congeler les cellules à des températures cryogéniques en l'absence de glace. Malgré une étude précédente faisant état de taux de récupération et de viabilité des CSP vitrifiés inférieurs à ceux des CSPs congelés-décongelés, la méthode de vitrification pourrait améliorer la récupération et la viabilité des CSPs de poulet si les protocoles sont optimisés.

10.2 Préparation d'une suspension unicellulaire à partir de tissu gonadique congelé

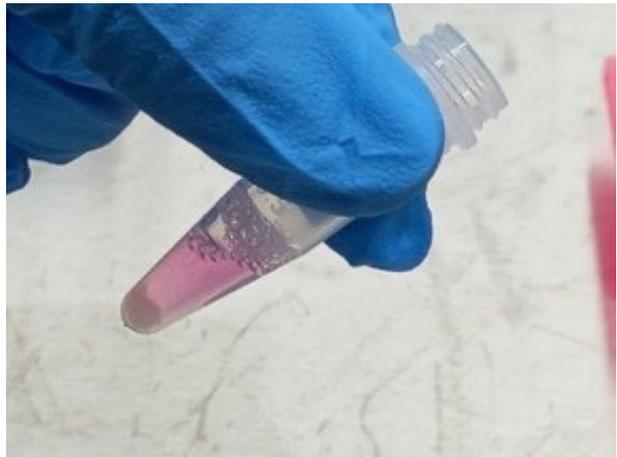
10.2.1 Récupérez les tissus gonadiques de l'azote liquide et placez-les dans un bain d'eau tiède (37°C).



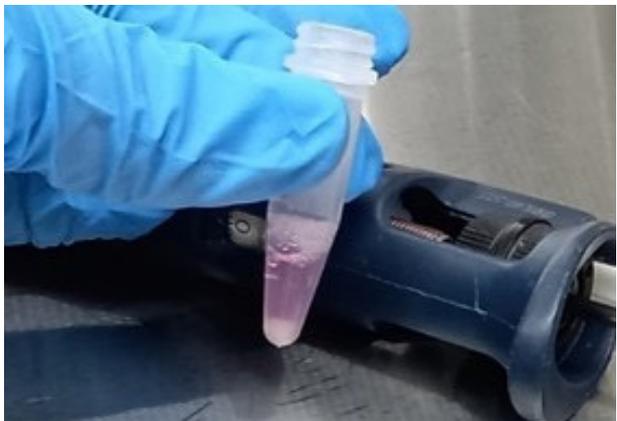
10.2.2 Décongeler les tissus à 37 °C pendant 30 secondes.



10.2.3 Sous une hotte de biosécurité, retirer délicatement le milieu de congélation en évitant l'aspiration des tissus et ajouter lentement 500 µl de DMEM (une goutte à la fois) pour laver et équilibrer les tissus.



10.2.4 Centrifugez brièvement les tubes pour que les tissus puissent se déposer au fond. Retirer le milieu de lavage et ajouter 200 µl de solution de dispase/collagénase.



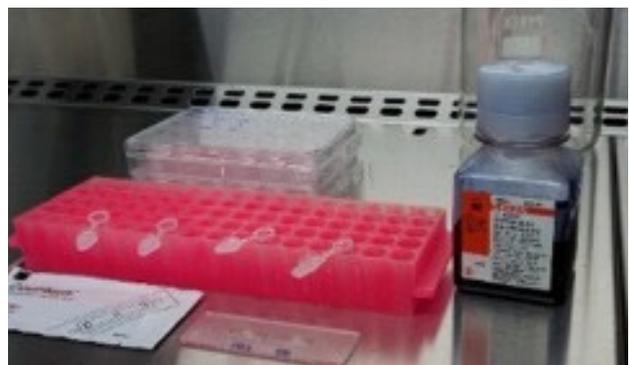
10.2.5 Incuber le tube à 37 °C pendant 10 min pour dissocier les tissus. Retournez le tube trois fois pendant l'incubation pour suspendre les tissus dans la solution dispase/collagénase.



10.2.6 Pipetez les tissus et remettez-les dans le tube à plusieurs reprises pour libérer des cellules individuelles à l'aide de la pipette P200 jusqu'à ce que les amas de tissus disparaissent. Centrifuger à 2 000 tr/min pendant 4 min pour sédimenter les cellules.

10.2.7 Retirer le surnageant et remettre en suspension toutes les cellules dans 500 µl de milieu B27. Pellet cellules par centrifugation à 2000 rpm pendant 4 min.

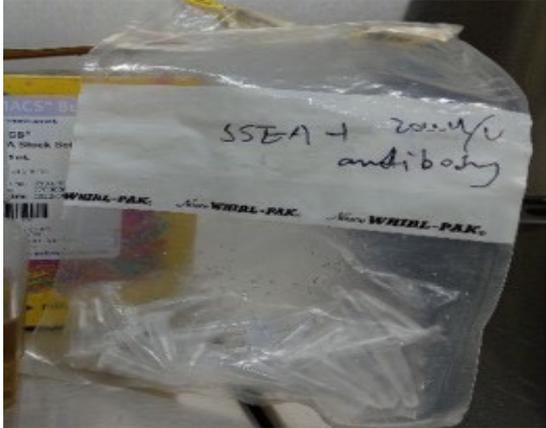
10.2.8 Laver les cellules deux fois avec 500 µl de milieu B27 les deux fois et compter les cellules. Remettre les cellules en suspension dans le milieu B27. La densité cellulaire attendue est de 10 000 à 15 000 cellules/µl.

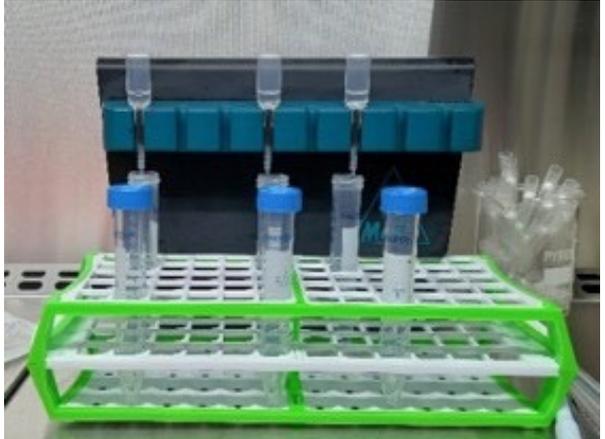
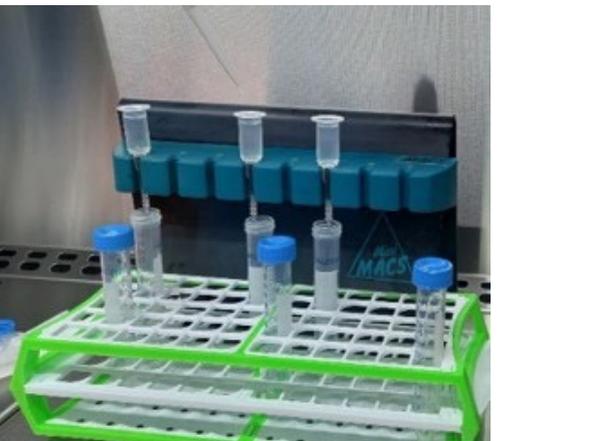


10.3 Enrichissement des CSP gonadiques femelles par MACS en utilisant la procédure d'anticorps SSEA-1

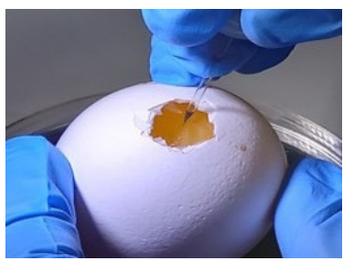
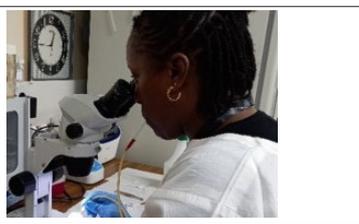
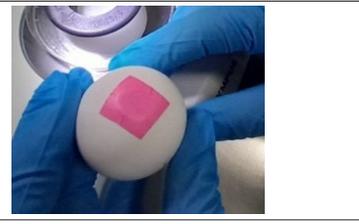
10.3.1 Remettre en suspension les cellules obtenues en 10.2.8 ci-dessus dans un volume approprié de tampon MACS pour obtenir une densité cellulaire de 2×10^7 cellules/ml.



<p>10.3.2 Ajouter des anticorps SSEA1 à la suspension cellulaire à 1 µg/107 cellules. Incuber à 4 C sur rouleau pendant 20 min.</p>	
<p>10.3.3 Centrifuger à 2000 rpm pendant 4 min pour les faire sédimenter. Laver deux fois avec 200 µl de tampon MACS.</p>	
<p>10.3.4 Resuspension dans un volume approprié de tampon MACS pour obtenir une densité cellulaire de 1 x 10⁸ cellules/ml.</p>	
<p>10.3.5 Ajouter des billes MACS conjuguées à des IgM anti-souris en utilisant un rapport de 20 µl pour 107 cellules. Incuber à 4 C sur rouleau pendant 20 min.</p>	
<p>10.3.6 Ajouter jusqu'à 1 ml de tampon MACS aux cellules et centrifuger à 2 000 tr/min pendant 4 min pour séparer les cellules et les microbilles.</p>	

<p>10.3.7 Montez la colonne LS sur la station magnétique et réglez un tube Falcon de 15 ml pour recueillir l'écoulement.</p>	
<p>10.3.8 Équilibrer la colonne LS avec 3 ml de tampon MACS et charger la suspension cellulaire dans la colonne. Mettez un nouveau tube Falcon de 15 ml pour recueillir l'écoulement.</p>	
<p>10.3.9 Laver la colonne avec 3 ml de tampon MACS deux fois. Retirez la colonne de la station magnétique et ajoutez 3 ml de tampon MACS à la colonne. Insérer un bouchon et éluer les cellules dans un tube Falcon de 15 ml.</p>	
<p>10.3.10 Aliquoter l'élution dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml et centrifuger à 2 000 tr/min pendant 4 min pour sédimenter les cellules.</p>	
<p>10.3.11 Remettre en suspension et combiner toutes les cellules dans 200ul de milieu B27, compter les cellules et sédimenter les cellules par centrifugation à 2 000 tr/min pendant 4 min.</p>	
<p>10.3.12 Laver les cellules deux fois avec 200ul de milieu B27 par lavage, remettre en suspension les cellules dans un milieu B27 à une densité cellulaire de 1 000 cellules/ul.</p>	

10.4 Injection de cellules dans des embryons hôtes : production de chimères germinales par transplantation de CSPs

<p>10.4.1 Les œufs de l'hôte doivent être placés dans un incubateur avec retournement (60 % d'humidité), 2,5 jours avant l'injection pour permettre aux embryons de se développer jusqu'au stade HH 15-16.</p>	
<p>10.4.2 Le jour de l'injection, ajouter la solution Fast green à la suspension cellulaire en utilisant un rapport de 1 µl de Fast green pour 50 µl de suspension cellulaire.</p>	
<p>10.4.3 Ajouter 25 mM de médicament B/B⁵ en utilisant un rapport de 1 µl de médicament pour 50 µl de suspension cellulaire (lorsque des hôtes transgéniques iCaspase 9 sont utilisés).</p>	
<p>10.4.4 Aspirer 1 µl de la suspension cellulaire à l'aide d'une pipette buccale et injecter dans l'hôte par l'aorte centrale.</p>	
<p>10.4.5 Sceller la fenêtre sur la coquille d'œuf à l'aide de papier ou de rubans soyeux et remettre les embryons dans un incubateur pour la suite de son développement.</p>	
<p>10.4.6 Ouvrir l'embryon hôte 11 jours après l'injection (embryons à 14 jours d'incubation). Exposez les gonades et la région du mésonephros.</p>	
<p>10.4.7 Si des CSP fluorescentes sont utilisées, examinez les CSP GFP⁶ et TPZ⁷ dans la gonade hôte au microscope à fluorescence pour évaluer la re-migration des cellules donneuses.</p>	

5. Le médicament B/B est un homodimérisant, un médicament inductible pour tuer les CSPs endogènes. Il s'agit d'un ligand perméable aux cellules utilisé pour dimériser les protéines de fusion de la protéine de liaison FK506 (FKBP) et initier des cascades de signalisation biologique et l'expression génique ou perturber les interactions protéine-protéine

6. Les embryons marqués à la protéine fluorescente verte (GFP) sont des embryons transgéniques avec une expression omniprésente de la GFP, y compris les CSPs

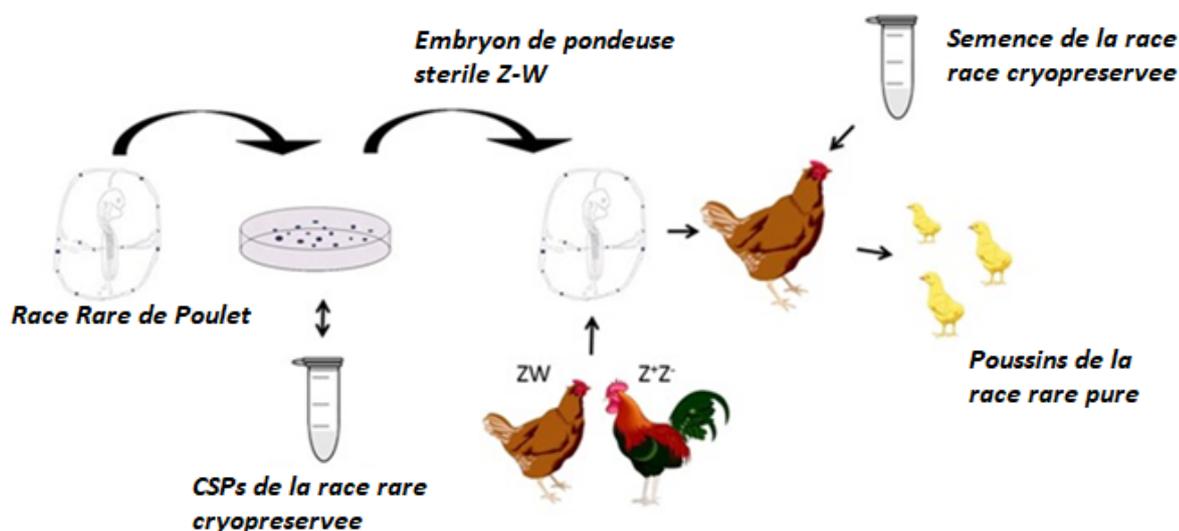
7. TPZ sont des embryons transgéniques à fluorescence rouge, identiques aux oiseaux GFP

11 Injection de CSP à des embryons hôtes stérilisés

L'objectif est de micro-injecter des CSPs aviaires dans des embryons à un stade précoce. Les embryons sont alors appelés chimères de lignée germinale et peuvent être incubés/éclos pour observer le développement des cellules germinales ou élevés pour générer une progéniture dérivée des cellules germinales injectées.

Woodcock et al. (2019) ont démontré la capacité d'utiliser des poules porteuses stériles pour reconstituer des races de poulet à partir de matériel congelé. Lorsque des CSPs cryoconservées d'une femelle de race rare sont introduites dans une poule porteuse stérile, qui est ensuite inséminée avec de la semence congelée de race rare, une progéniture de race rare pure est produite comme le montre la figure 17.

Figure 17. Schéma montrant la reconstitution d'une race de volaille à l'aide de cellules cryoconservées.



Cette approche démontre les avantages de l'utilisation de la technologie d'édition du génome pour générer des poulets de substitution qui pourraient être utilisés pour préserver la diversité génétique des races de poulets africains. Étant donné que la cryoconservation du sperme de volaille a des taux de réussite variables selon les races de poulet, les chercheurs de l'institut Roslin ont développé des substituts mâles et femelles stériles (père et mère) et ont simultanément généré une progéniture homozygote pour toute variante génomique introduite dans les CSPs par édition du génome.

12 Cryoconservation des CSP de volaille pour les programmes de repeuplement

Par rapport aux méthodes de conservation qui visent à stocker les gamètes, la cryoconservation des CSP est avantageuse en ce que chaque cellule individuelle a le potentiel, lorsqu'elle est transplantée dans un substitut, de générer des gamètes pour la vie de cet individu. Le cheptel reproducteur de ces substituts peut être utilisé pour établir des programmes d'élevage d'espèces de volailles rares et potentiellement produire suffisamment de poussins pour les programmes de repeuplement. Dans le cadre de la conservation et de la diffusion de races élites ou adaptées localement, l'utilisation des mères porteuses de CSPs est la mieux adaptée pour produire un grand nombre de descendants car en sélectionnant des mères porteuses très prolifiques, le nombre de poussins produits peut être considérablement augmenté par rapport aux faibles capacités de reproduction des races donatrices locales. L'application de la technique des mères porteuses est la mieux adaptée pour soutenir la production avicole à grande échelle en Afrique.

13 Conclusions et perspectives des banques africaines de CSP avicole

Les stratégies de conservation in situ et ex situ peuvent bénéficier des technologies de reproduction, telles que l'insémination artificielle, la micromanipulation des gamètes, la cryoconservation des cellules et des tissus, la culture in vitro et la greffe. De plus, ces techniques peuvent également être utilisées pour obtenir des données sur la physiologie de la reproduction des espèces de volailles. Les banques de matériel génétique avicole peuvent être complétées par la conservation du sang et d'autres matériels biologiques pouvant être utilisés pour l'application d'autres biotechniques afin de préserver les espèces.

13.1 Avantages potentiels de la biobanque de ressources génétiques avicoles

Une réserve de matériel génétique de volaille cryoconservé sera disponible pour les éleveurs publics et privés et d'autres chercheurs afin d'améliorer la gestion et la productivité de la volaille africaine et de garantir une diversité génétique suffisante pour reconstituer les populations perdues. Une collection de biodépôt fournira une source prête de matériel de recherche pour améliorer

Connaissances sur la résistance aux maladies, la biologie de la reproduction, la croissance et d'autres caractères pouvant être utilisés pour améliorer la productivité et les outils de gestion. Les informations de métadonnées recueillies lors de la collecte d'échantillons de matériel génétique seront utilisées pour localiser les races et quantifier les ressources et la productivité des races dans un pays spécifique. Ces informations seront accessibles via Internet pour orienter les décisions. Par conséquent, les divers bénéficiaires de l'effort de biobanque du CTLGH comprennent les éleveurs de bétail, les chercheurs reconstituant des populations et réalisant divers types d'études moléculaires et tous les Africains qui ont besoin d'un approvisionnement alimentaire sain et sûr.

13.2 Résultats escomptés

Les produits attendus comprennent :

- Un approvisionnement en matériel génétique préservé pour toutes les principales races de volaille dans les pays africains contributeurs.
- Un système d'information fournissant un inventaire du matériel génétique préservé (et d'autres tissus), des paramètres phénotypiques et des données de recensement sur les populations vivantes.
- Un système national composé de systèmes de recherche agricole, d'universités et de collaborateurs de l'industrie avicole qui hiérarchisent, facilitent et orientent la collecte d'informations sur la volaille.

- Une compréhension plus complète de la diversité génétique au sein des races africaines de poulet.
- Des protocoles de cryoconservation améliorés qui étendent les capacités du CTLGH à collecter, stocker et restaurer le matériel génétique de la volaille.

14 Références

- Daly, E.J., Singh, J.B., Fedgchin, M., Cooper, K., Lim, P., Shelton, R.C., Thase, M.E., Winokur, A., Van Nueten, L., Manji, H. and Drevets, W.C. 2018. Efficacy and safety of intranasal esketamine adjunctive to oral antidepressant therapy in treatment-resistant depression: A randomized clinical trial. *JAMA Psychiatry*. 75(2):139–148. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2017.3739. PMID: 29282469; PMCID: PMC5838571.
- Dessie, T. and Getachew, F. 2016. Shika brown breed. African Chicken Genetic Gains Factsheet 1. Nairobi, Kenya: ILRI. <https://hdl.handle.net/10568/72966>.
- Ewert, L. 1988. *Experiments on preparation of boar spermatozoa for cryoconservation in straws and biological-physical aspects of thawing by microwaves*. p. 91. University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany.
- Hamburger, V. and Hamilton, H.I. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*. 1951 Jan;88(1):49–92. PMID: 24539719.
- Hu, E., Bosworth, B., Baxter, J. and Tiersch, T. 2014. On-site evaluation of commercial-scale hybrid catfish production using cryopreserved blue catfish sperm. *Aquaculture* 426–427: 88–95.
- Hu, E., Liao, T. W. and Tiersch., T. R. 2013. A quality assurance initiative for commercial-scale production in high-throughput cryopreservation of blue catfish sperm. *Cryobiology* 67: 214–24.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature) species survival commission. 2010. *IUCN Red list categories and criteria* (Version 3.1). Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN.
- Jin, B. and Mazur, P. 2015. High survival of mouse oocytes/embryos after vitrification without permeating cryoprotectants followed by ultra-rapid warming with an IR laser pulse. *Sci Rep*. Mar 19;5:9271. doi: 10.1038/srep09271. PMID: 25786677; PMCID: PMC4365397.
- Tagami, T., Kagami, H., Matsubara, Y., Harumi, T., Naito, M., Takeda, K., et al. 2007. Differentiation of female primordial germ cells in the male testes of chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Mol. Reprod. Dev.* 74, 68–75. doi: 10.1002/mrd.20499.
- Karagenc, L., Cinnamon, Y., Ginsburg, M. and Petite, J. N. 1996. Origin of primordial germ cells in the prestreak chick embryo. *Developmental genetics* 19(4), 290–301.
- Kim, E.Y., Park, S.Y., Yoon, J.Y., Ghil, G.S., Lee, C.H., Lee, G.S., Tae, J.C., Kim, N.H., Lee, W.D., Chung, K.S. et al. 2004. A new efficient cryopreservation of human embryonic stem cells by a minimum volume cooling method. *Kor J Fertil Steril* 31 41–50.
- Mozdziak, P.E., Angerman-Stewart, J., Rushton, B., Pardue, S.L. and Petite, J.N. 2005. Isolation of chicken primordial germ cells using fluorescence-activated cell sorting. *Poultry Science* 84 (4): 594–600. ISSN 0032-5791, <https://doi.org/10.1093/ps/84.4.594>. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119445707>.
- Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T. and Benfey, P.N. 2001. Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature*. 413(6853):307–11. doi: 10.1038/35095061. PMID: 11565032.
- Nandi, S., Whyte, J., Taylor, L., et al. 2016. Cryopreservation of Specialized Chicken Lines Using Cultured Primordial Germ Cells. *Poultry Science* 95: 1905–1911.
- Oishi, I., Yoshii, K., Miyahara, D., Kagami, H. and Tagami, T. 2016. Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* 6 (23980): 10.1038/srep23980.

- Park, T. S., Lee, H. J., Kim, K. H., Kim, J.-S. and Han, J. Y. 2014. Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 12716-12721. 10.1073/pnas.1410555111.
- Pegg, D. E. 2002. The history and principles of cryopreservation. *Seminars in Reproductive Medicine* 20: 5–13.
- Schusser, B., Collarini, E. J., Yi, H., Mettler Izquierdo, S., Fesler, J., Pedersen, D., Klasing, K. C., Kaspers, B., Harriman, W. D., van de Lavoie, M.-C. et al. 2013. Immunoglobulin knockout chickens via efficient homologous recombination in primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (20170-20175): 10.1073/pnas.1317106110.
- Tajima, A., Naito, M., Yasuda, Y., Kuwana, T. 1993. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Theriogenology* 40(3): 509–519. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90404-S](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90404-S).
- Tiersch, T. R. 2011a. Introduction to the second edition. In: *Cryopreservation in Aquatic Species*, edited by T. R. Tiersch and C. C. Green, pp. 134–44. World Aquaculture Society, Baton Rouge.
- Tiersch, T. R. 2011b. *Process pathways for cryopreservation research, application and commercialization*. In: *Cryopreservation in Aquatic Species*, edited by T. R. Tiersch and C. C. Green, pp. 646–71. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Torres, L and Tiersch, T.R. 2018. Addressing reproducibility in cryopreservation, and considerations necessary for commercialization and community development in support of genetic resources of aquatic species. *Journal of the World Aquaculture Society* 49, 644–663.
- van de Lavoie, M.C., Diamond, J.H., Leighton, P.A., Mather-Love, C., Heyer, B.S., Bradshaw, R., et al. 2006. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 441, 766–769. doi: 10.1038/nature04831.
- Whyte, J., Glover, J.D., Woodcock, M., Brzezczynska, J., Taylor, L., Sherman, A., et al. 2015. FGF, insulin, and SMAD signaling cooperate for avian primordial germ cell self-renewal. *Stem Cell Rep.* 5, 1171–1182. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.10.008.
- Woodcock, M.E., Gheyas, A.A., Mason, A.S., Nandi, S., Taylor, L., Sherman, A., et al. 2019. Reviving rare chicken breeds using genetically engineered sterility in surrogate host birds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116 (20930–20937). doi: 10.1073/pnas.1906316116.
- Cobb-Vantress. 2021. Cobb breeder management guide (Available from www.cobb-vantress.com) (Accessed 9 November 2021).
- Yasuda, Y.A., Tajima, A., Fujimoto, T., Kuwana, T. 1992. Method to obtain avian germ-line chimeras using isolated primordial germ-cells. *J. Reprod. Fertil.* 96 (521–528).
- Boleli, I.C., Morita, V.S., Matos, J.B., Thimotheo, Jr.M., Almeida, V.R. 2016. Poultry Egg Incubation: Integrating and Optimizing Production Efficiency. Review • Rev. Bras. Cienc. Avic. 18 (spe 2) • Oct-Dec 2016 <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2016-0292>
- Chickscope. Chickscope Embryology. The heart of the matters. <http://chickscope.beckman.illinois.edu/explore/embryology/day02/33hour.html>. accessed on 09/12/2021
- Poultry Hub Australia, 2021. Incubation. <https://www.poultryhub.org/anatomy-and-physiology/incubation>. Accessed on 09/12/2021

Procédures d'utilisation normalisées / Protocoles

Préparation des milieux de cultures et réactifs

CaCl ₂ (100 mM)	
CaCl ₂ ×2H ₂ O (Mw=147.02)	0.147 g
ddH ₂ O	10 ml

Filtrer et aliquoter 100 µl/tube, conserver à -20°C.

Pyruvate de Sodium (100 mM)	
Pyruvate de Sodium (PM=110.04)	0.11 g
ddH ₂ O	10 ml

Filtrer et aliquoter 500 µl/tube, conserver à -20°C.

20% Ovalbumin (100×, 5 ml)	
Albumine de blanc d'œuf de poule (Ovalbumin, Sigma A5503)	1 g
AKODMEM	5 ml

Mettez le rouleau pendant environ 20 minutes. Si l'albumine n'est pas complètement dissoute, remettez-la sur le rouleau pendant 15 minutes supplémentaires.

Filtrer et aliquoter 550 µl/tube, conserver à 4°C.

Stock Na Héparine (50 mg/ml, 500×)	
Na Heparin (Sigma H3149)	0.25 g
AKODMEM	5 ml

Filtrer et aliquoter 110 µl/tube, conserver à 4°C.

β-mercapotethanol (50mM, 500×)	
β-mercapotethanol (Sigma M-7522, 14.3M)	25 µl
ddH ₂ O	7.15 ml

Filtrer et aliquoter 110 µl/tube, conserver à -20°C. Les aliquotes sont décongelées et utilisées immédiatement, ne pas réutiliser.

h-Activin A (25 µg/ml)	
solution d'Ovalbumin 20%	50 µl (final conc. 0.1%)
eau de qualité TC	10 ml

Filtrer à travers une unité de filtre de 0,2 µm

Centrifuger le verre Human Activin-A (à partir de cellules d'insectes Hi-5, Peprotech 120-14 5 µg), désinfectez le

flacon par essuyage à l'éthanol.

Sous hotte, ajoutez 200 µl d'ovalbumine à 0,1% dans le flacon d'Activin. Laissez reposer quelques minutes.

Mélanger par pipetage.

Aliquoter 25 µl/tube, conserver à -80°C.

h-FGF2 (25 µg/ml)

FGF humain recombinant 100 µl (25 µg)

(Systèmes de R&D, 234-FSE-025 25 µg)

Eau de qualité TC (sterile) 900 µl

Pas de filtration. Aliquoter 20 µl/tube. Conserver à -80°C.

Remarque : Le produit est expédié sur de la glace sèche sous forme de solution de 100 µl contenant du Tris-NaCl et du BSA comme support. Il doit être dilué et congelé directement. La concentration finale de BSA dans les aliquotes congelées diluées sera de 0,25%, avec 100 mM de NaCl. Cela devrait être une protéine porteuse suffisante pour le stockage stable à long terme de ces aliquotes.

Ovotransferin (10 mg/ml)

Conalbumine de blanc d'œuf de poule 0,05 g

(Ovotransférine, Sigma C7786)

AKODMEM 5 ml

Filtrer et aliquoter 25 µl/tube. Conserver à 4°C.

hBMP4 (25 µg/ml)

hBMP4 (Peprotech 120-05) 25 µg

Acide citrique (10mM, sterile) 1 ml

Pas de filtration, aliquoter et conserver à -80°C.

DMEM modifié (50 ml)

DMEM (Gibco, Cat No. 21068-028) 50 ml

Pyruvate de Sodium (100×, 100mM) 700 µl (final conc. 1.4×, après dilution dans AKODMEM, c'est 1×)

(Ou Gibco 11360-039)

AKODMEM (Avian KO DMEM, pour remplacer le DMEM commandé sur le marché, 50 ml)

DMEM modifié (ci-dessus) 38 ml

Eau de qualité pour culture tissulaire 11,6 ml

Solution de vitamines MEM 500 µl

(100×, Gibco 11120052)

L'osmolarité doit être de 255 mOsm/kg. Stocker à 4°C.

Option 1 (doit être testé):

DMEM (Gibco, Cat No. 21068-028) 38 ml

Eau de qualité pour culture tissulaire 11.6 ml

Pyruvate de Sodium (100×, 100mM) 500 µl (532 µl)

(or Gibco 11360-039)

Solution de vitamines MEM 500 µl

(100×, Gibco 11120052)

La solution de vitamines MEM doit être aliquotée et conservée à -80°C.

Stock de AKODMEM-B27 (50 ml)

AKODMEM 47 ml

Supplément B27 1 ml

(50×, Gibco 17504-044)

GlutaMAX-I (100×, 200mM) 0.5 ml

MEM NEAA (100×) 0.5 ml

EmbryoMax® ES Cell 0.5 ml

Nucléosides qualifiés (100X, ES-008-D)	
Pyruvate de Sodium (100mM)	0.2 ml
β -mercapotethanol (50mM, 500 \times)	0.1 ml
CaCl ₂ (100 mM)	75 μ l
20% Ovalbumin (100 \times)	0.5 ml
Na Heparin (50 mg/ml, 500 \times)	0.1 ml
Pen/Strep (100 \times) (optional)	0.1 ml

Filtrer pour stériliser et conserver à 4°C pour <5 semaines, protection contre la lumière.

Remarques :

1. Les nucléosides doivent être aliquotés à 510 μ l/tube, conserver à -80C. Lors de l'utilisation, assurez-vous de bien mélanger et jetez tout ce qui reste dans le tube pour éviter le gel-dégel.
2. Aucun antibiotique n'est préféré.
3. B27 est sensible à la lumière.
4. Pas besoin de filtrer.

FAOT (pour toutes les cultures de CSP de poulet, Sans sérum)

Stock de AVODMEM-B27	5 ml
h-ActivinA(25 μ g/ml)	5 μ l
h-FGF2 (25 μ g/ml)	0.8 μ l
Ovotransferin (10 mg/ml)	5 μ l

Conserver à 4°C pendant <1 semaine, à l'abri de la lumière. Ne pas filtrer sinon les facteurs de croissance dans le milieu seraient compromis.

Solution de congélation (2 \times)

AKODMEM	4.1 ml
DMSO	400 μ l (final conc. 8%)
Sérum de Poulet (γ -irradiated)	500 μ l (final conc. 10%)
CaCl ₂ (100mM)	7.5 μ l

Préparez fraîchement et filtrez pour stériliser.

Note pour la préparation des milieux de culture :

Tous les stocks doivent être utilisés dans les 6 mois.

Tous les stocks congelés doivent être conservés à 4 ° C après utilisation. Ils devraient être bien <1 mois.

Derivation de csps du sang

Préparation des oeufs

Remarques:

- Après la ponte, les œufs doivent être conservés à 15°C pendant 10 jours maximum. Mais les œufs peuvent être conservés à température ambiante pendant une semaine. Les œufs ne se développeront pas correctement s'ils sont conservés trop longtemps.
- Pour la dérivation de CSP, les œufs sont censés être au stade 16-17 (56 heures d'incubation). Un stade plus précoce peut également être utilisé tant que le cœur bat. Cependant, un stade plus âgé de plus de 17 ans n'est pas recommandé car en pratique, le taux de réussite est faible avec les embryons âgés.
- The blood could be sucked from leaked blood or peripheral blood vessels.
- L'aiguille peut être utilisée pour plusieurs œufs et changée pour éviter la contamination.
- Le CSP est bien avec la température ambiante et un pH élevé (environ 8). Ils sont donc très bien s'ils sont laissés longtemps à température ambiante, en particulier pendant la dérivation.

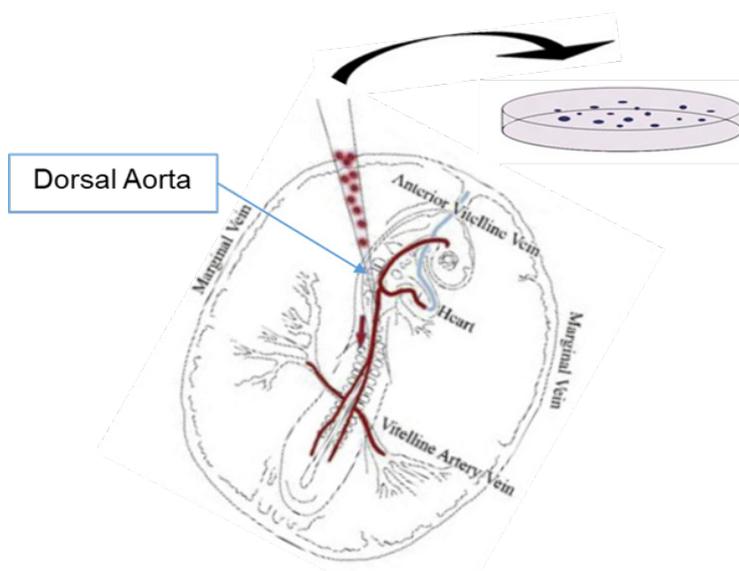
Procédure

1. Lundi matin, 9h00, mettez les œufs dans l'incubateur, sans rotation.
2. Mercredi après-midi, 17h00 (56h), sortir les œufs de l'incubateur et les laisser à température ambiante toute la nuit.
3. Jeudi matin, mettez les œufs dans l'incubateur pendant 2 heures pour se réchauffer avant la dérivation CSP. Les embryons doivent être autour du stade 16 mais pas plus vieux que le stade 17.
4. Préparer une plaque de 48 puits en ajoutant du dH₂O stérile dans les puits des rangées et des colonnes environnantes pour aider à maintenir l'humidité dans la plaque pendant la culture. Si ce n'est pas le cas, les CSP ne se développeront pas bien.
5. Ajouter 300 ul de FAOT dans chaque puits et laisser la plaque sous hotte.
6. Au microscope, cassez l'extrémité du capillaire à l'aide d'une pince stérilisée à l'éthanol. Insérer dans le tube d'aspiration. Draper l'appareil d'aspiration sur le microscope afin que les deux extrémités ne touchent pas les surfaces du laboratoire. Utilisez ce positionnement pendant toute l'expérience.
7. Prenez un œuf de l'incubateur. Oeuf à l'éthanol légèrement et fenêtrer. Le cœur de l'embryon doit battre visiblement.

8. Souffler une bulle sur la surface de l'œuf à l'aide d'un capillaire pour démontrer que l'aiguille est ouverte. Insérez le capillaire dans l'aorte dorsale à un angle faible. Aspirer 1-2 ul de sang embryonnaire dans le capillaire.
9. Sous la hotte, souffler l'échantillon de sang dans un ou deux puits (souffler le sang dans 20 µl de stock AKODMEM-B27 dans un tube EP et le diviser en 2 puits) d'une plaque de culture tissulaire à 48 puits. Répétez l'opération pour un maximum de 20 embryons.
10. Récolter l'embryon pour l'ADN génomique pour le sexage : tenir l'embryon avec une pince à épiler, à l'aide d'un jeu de ciseaux fins, couper l'embryon de la membrane vitelline. Placer dans un tube Eppendorf à conserver à -20C pour la PCR sexuelle. Le reste de l'embryon et de l'œuf peut être jeté dans un sac biohazard. Les ciseaux et les pincettes sont essuyés à l'aide d'un rouleau bleu avec de l'éthanol à 70 % entre les échantillons.
11. Retirez soigneusement l'aiguille et jetez-la dans une poubelle pour objets tranchants.
12. Le tube d'aspiration est lavé dans du robinet H2O, aspergé d'ETOH à 70 %, laissé sécher à l'air libre, puis stocké dans un kit de dissection personnel.
13. Nourrir les cellules tous les deux jours en retirant 90 ul de milieu du côté du puits et en ajoutant 100 ul de nouveau milieu dans chaque puits.
14. Lorsque le puits est confluent, transférez les cellules dans un 24 puits (500 µl) par centrifugation.
15. Ensuite, nourrissez les cellules tous les deux jours en retirant 300 ul de milieu du côté du puits et en ajoutant 350 ul de nouveau milieu
16. Lorsque les cellules sont confluentes, divisez-les en 2 puits (1:2) puis nourrissez-les comme standard.
17. Lorsque les cellules sont confluentes, congelez-les dans 4 tubes. Normalement, il y a environ 400 000 cellules lorsqu'une plaque de 24 puits est confluite. Les cellules pourraient être congelées aussi peu que 50 000 cellules par tube.

	Lundi	Mercredi	Vendredi
48-puits	Retirer 90 ul, ajouter 100 ul de nouveau milieu		
24-puits	Retirer 300 ul, ajouter 350 ul nouveau milieu		

Figure 18. Dissection (prélèvement ou injection) de l'aorte dorsale.



Derivation de csp a partir de blastodisc embryonnaire

Remarque : Parfois, les œufs ne sont pas de bonne qualité et ne peuvent pas se développer correctement jusqu'au stade 16–17. Pour éviter la perte d'œufs, la CSP pourrait être dérivée du disque embryonnaire à un stade très précoce (1–3).

Préparation des oeufs

- Incuber les œufs comme de routine pendant 4 à 6 heures.

Procédure

Remarque : il est préférable de le faire sous une hotte.

1. Préparez du PBS stérile.
2. Préparer une plaque 96 puits avec 100 µl de FAOT par puits selon le nombre d'œufs.
3. Préparer une plaque à 6 puits avec 3 ml de PBS dans chaque puits.
4. Désinfectez les œufs avec 70% d'éthanol
5. Ouvrez l'œuf pour exposer l'embryon
6. Au microscope, utilisez une aiguille (Gauge 15, Sigma HSWNH15112-100EA) pour couper le disque d'embryon en pénétrant la membrane autour du disque d'embryon.
7. Utilisez une pipette Pasteur en plastique pour ajouter quelques gouttes de PBS stérile sur le disque d'embryon. Laissez agir 1 min. Le disque d'embryon flottera vers le haut au-dessus du jaune.
8. Utilisez une pipette Pasteur en plastique découpé pour aspirer le disque d'embryon et transférer dans la plaque à 6 puits (chaque puits peut contenir 3-4 disques d'embryon).
9. Répétez la même chose jusqu'à ce que 3-4 disques d'embryons soient collectés.
10. Sous le microscope, utilisez des pinces fines pour retirer soigneusement les disques d'embryon du jaune.
11. Transférer le disque d'embryon sur une plaque à 96 puits préparée.
12. Une fois tous les disques d'embryon transférés dans une plaque à 96 puits, utilisez P100 ou P200 pour dissocier le disque d'embryon par pipetage.
13. Culture des cellules à 37°C, 5% CO₂.

14. Remarque : Il existe de nombreux autres types de cellules dans le disque embryonnaire et de nombreuses cellules s'attachent au fond. Après un certain temps, nous devons transférer plusieurs fois les cellules en suspension dans un nouveau puits pour éliminer les autres types de cellules.
15. Étant donné que la CSP se dépose toujours au fond, nous devons laver le fond doucement et transférer le surnageant dans un tube EP, centrifuger, remettre en suspension dans un nouveau milieu et plaquer dans un nouveau puits.
16. Les autres étapes sont les mêmes que la dérivation du sang décrites plus haut.

Congelation des csps

Remarque : le DMSO est très toxique pour les CSP, alors travaillez rapidement. Le choc osmotique de l'ajout de DMSO provoquera également l'éclatement des CSP, alors ajoutez lentement les solutions de DMSO. Normalement, un puits pourrait être congelé dans 4 tubes. Chaque tube doit contenir $\geq 50\,000$ cellules et récupérer sur une plaque à 24 puits.

Procédure

1. Préparez le milieu de congélation
2. Pré-étiquetez quatre cryotubes Nunc 1,8 ml et placez-les sous hotte.
3. Placer la boîte de congélation au réfrigérateur à 4°C pendant 30 min.
4. Mettre le milieu de culture des CSP à température ambiante et le milieu du CSP contenant du DMSO à température ambiante
5. Pour la congélation d'un puits d'une plaque à 24 puits, les CSP confluents (~ 200 000 cellules)
6. Retirez toutes les cellules du puit
7. Centrifuger à 1600 tr/min, 4min
8. Remettre les cellules en suspension dans 500µl de stock CSP AKODMEM-B27 (ou AKODMEM).
9. Ajouter un volume égal de solution de congélation (500 µl) aux eppendorfs contenant des cellules.
10. Remarque : La solution de congélation doit être ajoutée lentement goutte à goutte et mélanger en agitant le tube.
11. Mélanger et aliquoter 250 ul de mélange CSP dans les cryotubes étiquetés vides.
12. Placer les cryotubes dans une boîte de congélation pré-refroidie (4 °C) et passer la boîte au congélateur à -80 °C.
13. Transférer la boîte de congélation à -150°C après 24 heures.

Récupérer les csps de la congelation

Procédure

1. Préparez une plaque de 24 puits en ajoutant du dH₂O stérile dans les puits des rangées et des colonnes environnantes pour aider à maintenir l'humidité dans la plaque pendant la culture. Si ce n'est pas le cas, les CSP ne se développeront pas bien.
2. Retirez le flacon de CSP du congélateur.
3. Décongeler dans la paume de la main ou dans un bécher d'eau à température ambiante. Ne pas utiliser de bain-marie car les cellules ne peuvent pas être chauffées à 37°C dans une solution de DMSO.
4. Ajoutez goutte à goutte 2 ou 4 fois le volume d'origine d'AKODMEM-B27 (ou AKODMEM) dans le cryotube (si le volume est de 250 µl, ajoutez 0,5 ou 1,0 ml). Le milieu pourrait être ajouté aux flacons pour aider les cellules à dégivrer complètement.
5. Transférer la suspension cellulaire diluée dans un eppendorf de 1,5 ml.
6. Spin à 2000–2500 rpm, 10min (Remarque : la force de la centrifugeuse est plus élevée et le temps est plus long que de travailler avec des cellules non congelées, car les cellules congelées sont en quelque sorte un peu difficiles à culotter. La centrifugeuse normale pour la CSP fraîche est 1600-2000 tr/min, 4 minutes)
7. Retirer avec précaution le surnageant de pipetage de la paroi intérieure de l'eppendorf. Le pellet, s'il est visible, sera extrêmement petit. Jeter le surnageant.
8. Remettre soigneusement les cellules en suspension dans un milieu CSP (FAOT) contenant le facteur de croissance, laver les surfaces internes d'eppendorf et transférer dans un puits (500 µl de milieu pour une plaque à 24 puits ; 300 µl pour une plaque à 48 puits).
9. Laissez la plaque reposer dans une hotte à température ambiante pendant 5 à 10 minutes pour équilibrer les cellules
10. Placer la plaque dans l'incubateur.
11. (Facultatif) Vérifiez les cellules le lendemain, remplacez le milieu par un nouveau milieu par centrifugation ou retirez simplement du milieu et ajoutez un nouveau milieu.
12. Nourrir les cellules tous les deux jours jusqu'à confluence, puis diviser 1:2.

Remarques pour la culture CSP :

1. Il est très important d'ajouter de l'eau dans les puits environnants de la plaque pour assurer l'humidité dans la plaque, sinon la CSP ne se développera pas bien.

2. Normalement, dérivez la CSP à partir de 1 µl de sang dans une plaque à 48 puits (300 µl de milieu). Il faut environ 3 semaines pour que les cellules sanguines meurent et que la CSP se développe pour confluer. Les cellules sanguines semblent inhiber la croissance des CSP. Ensuite, transférez les cellules dans une plaque à 24 puits, nourrissez-les tous les deux jours jusqu'à confluence, puis divisez-les à nouveau 1:2 en 2 puits de 24 puits. Ensuite, les cellules pourraient être congelées (1:2) lorsqu'elles sont confluentes. Il y aura 4 tubes de CSP en congélation.
3. Le CSP convient à la température ambiante et à un pH élevé (environ 8). Ils sont donc très bien s'ils sont laissés longtemps à température ambiante, en particulier pendant la dérivation.
4. Les cellules fraîches et congelées utilisent une force de centrifugation différente pour former un culot. Certaines cellules montrant des fibroblastes attachés ont tendance à être difficiles à culotter.
5. Nourrissez les cellules en enlevant du milieu et complétez avec un nouveau milieu. Mais si pour les CSP qui vont être injectés pour la transmission germinale, changer le milieu par centrifugeuse.

Biobanque de tissus gonadiques embryonnaires de poulet

Materiel:

- Solution Fastgreen: 0.005g/ml ou 0.5% w/v, Dilution 1 en 50 pour la concentration de travail
- Milieu B27
- Tampon MACs: 0.5% BSA, 2 mM EDTA dans le PBS
- Billes MACs anti-souris conjuguées aux IgM:
- Anticorps SSEA1:
- Système de R&D, Cat No : MAB2155, Anticorps de souris anti-humain/souris SSEA-1, IgM
- dispase/collagenase
- Stem cellbank
- Aiguille hypodermique 23G (1 ¼'' in length)
- Boite de congélation Mr. Frosty™
- Pincettes ou ciseaux
- Pipette buccale
- Aiguille en verre

Procedure:

1. Incubation des œufs de poule : 9 jours avant la dissection des tissus gonadiques de poulet
Remarque : si la dissection du tissu gonadique a lieu le matin, les œufs seront mis en place le matin pour leur permettre de se développer au stade de développement attendu.
2. Dissection des tissus gonadiques:
 - 2.1 Ouvrez la coquille de l'œuf à partir de l'extrémité émoussée à l'aide d'une pince et cassez la membrane de la coquille jusqu'à ce que le corps de l'embryon soit visible.
 - 2.2 Prélevez l'embryon et mettez-le dans une boîte de Pétri, abattez l'embryon par la méthode de l'annexe 1 en déconnectant le cou à l'aide de pincettes ou de ciseaux.

- 2.3 Sous microscopie à dissection, positionnez le corps de l'embryon en plaçant l'estomac vers le haut, coupez l'embryon ouvert à l'aide de ciseaux pour exposer les organes internes, poussez les organes vers la direction crânienne pour visualiser les gonades et le mésonéphros.
 - 2.4 Disséquer doucement les deux gonades du mésonéphros à l'aide d'une aiguille hypodermique 23G (1'' de longueur), ramasser les gonades à l'aide d'une aiguille et les transférer dans un milieu DMEM qui a été préalablement déposé dans la zone marginale de la même boîte de Pétri pour éliminer le sang supplémentaire.
 - 2.5 Les tissus gonadiques ont ensuite été transférés dans un tube de 1,5 ml (bouchon à vis) avec 500 μ l de milieu DMEM froid et placés sur de la glace jusqu'à ce qu'un pool attendu de paires de gonades soit collecté.
3. Cryoconservation des tissus gonadiques entiers
 - 3.1 Centrifuger le tube eppendorf rapidement pendant 4 secondes pour faire précipiter les tissus gonadiques au fond.
 - 3.2 Retirez délicatement le milieu DMEM surnageant, essayez de ne pas perturber les tissus gonadiques, ajoutez 100 μ l de Stem cellbank au tube pour un échange moyen, centrifuger rapidement le tube comme en 3.1 pour précipiter le tissu au fond du tube.
 - 3.3 Retirer délicatement le surnageant et ajouter 200 μ l Stem cellbank au tissu.
 - 3.4 Laissez le tissu gonadique dans le Stem Cellbank sur de la glace pendant 15 pour équilibrer le tissu, placez les tubes dans le conteneur de congélation Mr. Frosty™ et placez-les au congélateur à -80°C. (Vitrification des tissus par tube de goutte dans l'azote liquide ?)
 - 3.5 Transférer les tubes au congélateur à -150°C le lendemain.
 4. Préparation d'une suspension unicellulaire à partir de tissu gonadique congelé
 - 4.1 Récupérer les tissus gonadiques du congélateur à -150°C et les placer sur de la neige carbonique
 - 4.2 Décongeler les tissus à 37°C pendant 30 secondes jusqu'à décongélation complète.
 - 4.3 Dans une hotte de biosécurité, retirez doucement le milieu de congélation, en évitant d'aspirer les tissus et ajoutez 500 μ l de DMEM lentement par goutte à goutte pour laver et équilibrer les tissus.
 - 4.4 Centrifuger brièvement les tubes si les tissus ne descendent pas au fond, retirer le milieu de lavage et ajouter 200 μ l de dispase/collagénase.
 - 4.5 Laisser le tube à 37°C pendant 10 min pour dissocier les tissus, en tapotant du doigt le tube pour suspendre les tissus trois fois pendant l'incubation.
 - 4.6 Pipeter les tissus de haut en bas pour libérer des cellules individuelles à l'aide d'une pipette P200 jusqu'à ce que les amas de tissus disparaissent, centrifuger à 2000 tr/min pendant 4 min pour sédimenter les cellules.
 - 4.7 Retirer le surnageant et remettre en suspension toutes les cellules dans 500 μ l de milieu B27, centrifugation des cellules de culot à 2000 tr/min pendant 4 min.

- 4.8 Laver les cellules deux fois avec 500µl de milieu B27 à chaque fois et compter le nombre de cellules, remettre les cellules en suspension dans du milieu B27 avec la densité cellulaire attendue (10 000 – 15 000 cellules/µl).
5. Enrichissement des CSP gonadiques femelles par tri MACs à l'aide de l'anticorps SSEA-1
 - 5.1 Remettre en suspension les cellules dans un volume approprié de tampon MAC pour atteindre la densité cellulaire à 2×10^7 cellules/ml.
 - 5.2 Ajouter l'anticorps SSEA1 à la suspension cellulaire par 1µg/ 10^7 cellules. Incuber à 4°C sur rouleau pendant 20 min.
 - 5.3 Cellules pastille par centrifugation à 2000 rpm pendant 4 min. Laver deux fois avec 200 ul de tampon MACs.
 - 5.4 Remettre en suspension les cellules dans un volume approprié de tampon MAC pour atteindre la densité cellulaire à 1×10^8 cellules/ml.
 - 5.5 Ajouter des billes MACs anti-souris conjuguées à des IgM dans un rapport de 20 ul pour 10^7 cellules. Incuber à 4°C sur rouleau pendant 20 min.
 - 5.6 Ajouter du tampon MAC aux cellules jusqu'à 1 ml, centrifuger à 2000 tr/min pendant 4 min pour séparer les cellules et les microbilles.
 - 5.7 Montez la colonne LS sur la station magnétique et réglez un tube Falcon de 15 ml pour collecter le flux continu.
 - 5.8 Équilibrez la colonne LS avec 3 ml de tampon MAC, puis chargez la suspension cellulaire dans la colonne, placez un nouveau tube Falcon de 15 ml pour collecter le flux continu, en maintenant le flux continu.
 - 5.9 Laver la colonne avec 3 ml de tampon MACs deux fois, retirer la colonne de la station magnétique et ajouter 3 ml de tampon MACs à la colonne, insérer un bouchon et éluer les cellules dans un tube Falcon de 15 ml.
 - 5.10 Aliquoter l'élution dans des tubes de 1,5 eppendorf et centrifuger à 2000 tr/min pendant 4 min pour sédimenter les cellules.
 - 5.11 Remettre en suspension et combiner toutes les cellules dans 200 ul de milieu B27, compter les cellules et sédimenter les cellules par centrifugation à 2000 tr/min pendant 4 min.
 - 5.12 Laver les cellules deux fois avec 200 ul de milieu B27 par lavage, remettre les cellules en suspension dans du milieu B27 à une densité cellulaire de 1 000 cellules/ul.
6. Injection de cellules dans des embryons hôtes.
 - 6.1 Les œufs hôtes doivent être placés dans un incubateur à bascule avec une humidité de 60 % 2,5 jours avant l'injection pour permettre aux embryons de se développer jusqu'au stade HH 15-16.
 - 6.2 Le jour de l'injection, ajouter la solution Fast green à la suspension cellulaire à raison de 1 ul de Fast green pour 50 ul de suspension cellulaire.

- 6.3 Ajouter 25 mM de médicament B/B selon un rapport de 1 ul de médicament pour 50 ul de suspension cellulaire.
- 6.4 Aspirer 1 ul au-dessus de la suspension cellulaire à l'aide d'une pipette buccale et injecter dans l'hôte de substitution à travers l'aorte centrale, comme indiqué dans le film.
- 6.5 Sceller la fenêtre sur la coquille d'œuf à l'aide de papier ou de rubans soyeux et remettre les embryons dans l'incubateur pour un développement ultérieur.
- 6.6 Ouvrez l'embryon hôte 11 jours après l'injection (embryons à 14 jours d'incubation), exposez les gonades et la région du mésonéphros.
- 6.7 Examiner les CSP GFP et TPZ dans la gonade hôte sous la microscopie à fluorescence pour évaluer la re-migration des cellules donneuses.
 - 6.7.1 Le médicament B/B est un dimérisateur, un médicament inductible pour tuer les CSP endogènes.
 - 6.7.2 Les GFP sont des embryons transgéniques GFP, expression omniprésente de la GFP, y compris les CSP.
 - 6.7.3 Les TPZ sont des embryons transgéniques à fluorescence rouge, identiques aux oiseaux GFP.

Protocole d'injection d'embryon et d'incubation

Préparation d'embryon

1. Placer les œufs le vendredi à 19h avec le bout pointu vers le haut
2. Incuber jusqu'au lundi 8h.
3. Retirez chaque œuf pour injection.

Protocole de fenêtrage et de scellage des œufs manipulés

1. Peser l'œuf
2. Laver les œufs en vaporisant 70% d'éthanol
3. Faites un petit trou dans l'extrémité émoussée de l'œuf avec une pince coupante. Assurez-vous de ne pas pénétrer la membrane de la coquille. Il s'agit de réduire la pression de la poche d'air afin que l'œuf puisse tomber.
4. Utiliser des pinces pour faire une petite fenêtre (5 mm < 1 cm) dans les œufs à l'extrémité pointue
5. Retirer 3 ml d'albumine de l'œuf à l'aide d'une seringue de 1 ml. (Tagami spécifie 5 ml. Nous utiliserons 3 ml dans ces expériences et surveillerons l'humidité et la perte de poids.)
6. Retirez 1–2 ul de sang pour créer de la place pour les cellules injectées
7. (Facultatif) placez ce sang dans un tube pour le génotypage de l'œuf hôte
8. Injecter 1–2 ul de solution CSP.
9. Ajouter 100 ul de solution Pen/Strep (100×)
10. Après l'injection, placez un petit morceau de film alimentaire (double couche) sur l'œuf
11. Utilisez de l'albumine fine provenant d'œufs nouvellement pondus comme colle. Utilisez un coton-tige pour sceller le film alimentaire autour de l'œuf.

Incubation des oeufs

1. Peser à nouveau l'œuf et le placer dans l'incubateur Brinsea
2. Incuber les œufs avec l'extrémité pointue vers le haut
3. 45 degrés pour les incubateurs Brinsea toutes les 30 minutes à 38,4°C jusqu'au jour 18, humidité 60 %.

4. Peser les œufs tous les deux jours pour surveiller la perte d'eau (lundi, mercredi, vendredi)
5. Enregistrer les embryons morts et les placer à 4°C
6. Mirer les œufs aux jours 10 et 14 et placez les embryons morts à 4°C.
7. Passer à l'éclosoir au jour 18 à 37/37,5 °C pour l'éclosion. Selon Tagami, 90% des poussins peuvent sortir de l'œuf, 10% des poussins ne peuvent pas et ont besoin d'aide.

Re-injection de csps dans les embryons de poulet

Préparation des Embryons

1. Placer les œufs le vendredi à 19h avec le bout pointu vers le haut
2. Incuber jusqu'au lundi 8 h.
3. Retirez chaque œuf pour injection (étape 16–17).

Pour le test de migration

Pour l'étude de la migration des CSP, 500–1000 cellules CSP dans 1 ul sont injectées dans chaque embryon.

Préparation des cellules

- Sucrer toutes les cellules
- 1600 tr/min, 4 minutes
- Retirer le surnageant
- Attendre 1 min pour que le milieu gauche s'écoule complètement
- Mesurer le volume et compléter avec du DMEM dilué. environ 10 ul, j'ai ajouté 35 ul de DMEM dilué. (Remarque : pour une injection normale, 500 à 1 000 cellules dans 1 ul sont injectées dans chaque embryon. Ou 5 000 cellules/ul pourraient être injectées pour le travail transgénique afin de rivaliser avec les CSP hôtes.)
- Ajoutez ensuite 0,2 ul de colorant alimentaire (1% Fast Green FCF (Sigma F7258–25G) dans du PBS, filtré pour stériliser)

Injection

Il est préférable de le faire dans une hotte pour la stérilité et un taux de survie plus élevé. Normalement, de nombreux embryons meurent après l'injection.

Le PBS avec pen/strep doit être préparé à l'avance et mettre quelques gouttes avec une pipette Pasteur en plastique sur l'embryon après l'injection.

- Casser l'aiguille sous le microscope
- Agiter les cellules et aspirer les cellules dans l'aiguille, 1–2 ul
- Drapez l'aspirateur sur le microscope
- Vaporiser l'œuf avec de l'éthanol à 70%
- Ouvrez l'œuf, retirez une partie de la membrane de la coquille pour exposer l'embryon. Il est préférable de

retirer le moins de membrane possible pour éviter l'évaporation car l'œuf doit continuer à se développer dans l'incubateur.

- Insérez l'aiguille dans l'aorte dorsale et soufflez les cellules. Je pense qu'il vaut mieux souffler les cellules lentement pour éviter trop de pression. Presque immédiatement, la couleur bleue pourrait être vu dans le réseau des vaisseaux sanguins.
- Mettez quelques gouttes de PBS (pen/strep) sur l'embryon
- Sceller l'œuf avec du ruban de cellulose. Assurez-vous qu'il est bien scellé, sinon l'embryon pourrait sécher pendant l'incubation.
- Remettez l'œuf en incubation immédiatement. L'incubateur doit être humidifié avec de l'eau.
- Après une nuit, vérifiez la survie des embryons et retirez les morts.
- Après 4 jours vers le jour 6.5 (par exemple, vendredi - mardi), les gonades pourraient être disséquées et vérifiées pour la migration CSP. Ou, attendez le jour 9.5 pour vérifier la migration.

Pour la transmission ces cellules germinales (lignée de poulet transgénique ou régénérée à partir de CSP congelée)

- Il vaut mieux injecter de nombreuses cellules pour rivaliser avec l'embryon hôte CSP. Ainsi, 4000–5000 cellules CSP dans 1 ul sont injectées dans chaque embryon.
- Il est préférable que la fenêtre de l'œuf soit petite pour un meilleur taux d'éclosion.
- Le stade embryonnaire est préférable de ne pas dépasser le stade 17. Si l'embryon est trop vieux, les CSP ont déjà migré alors les cellules injectées ne migreront pas pour entrer en compétition avec les cellules hôtes.

La préparation des cellules est la même que ci-dessus.

Protocole de fenêtrage et de scellage des œufs manipulés

Peser l'œuf

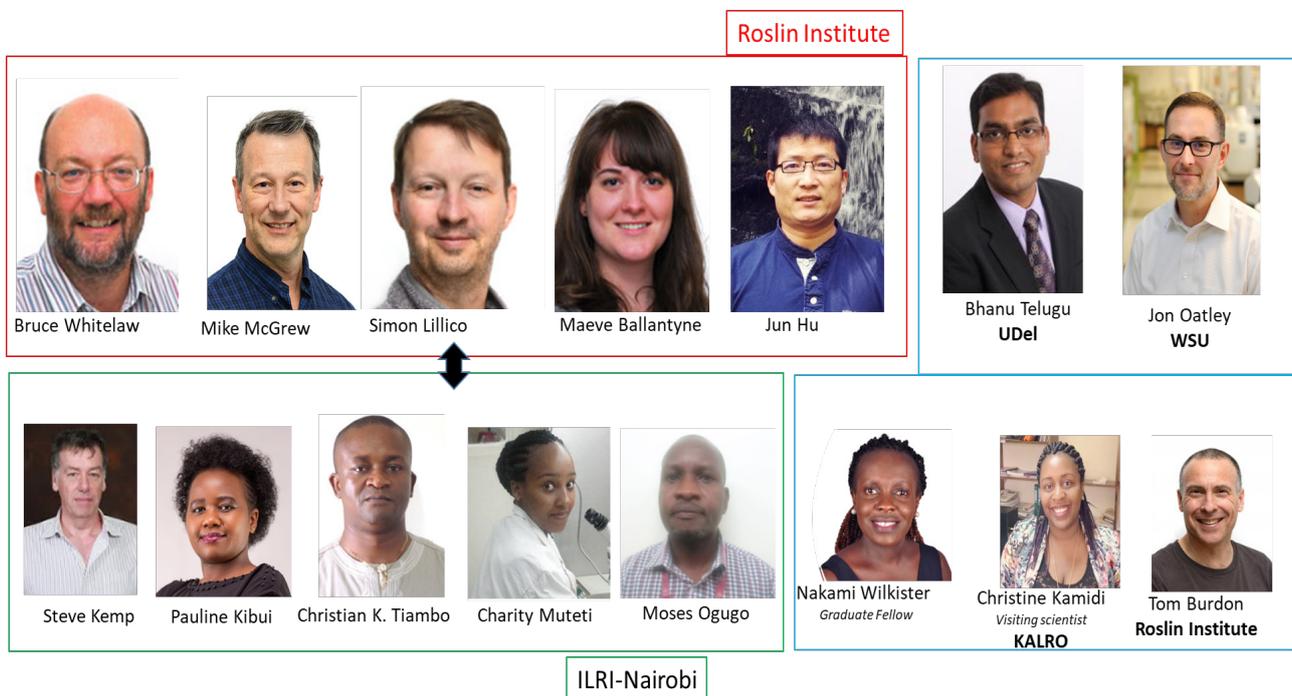
1. Nettoyer les œufs en vaporisant 70% d'éthanol
2. Faites un petit trou dans l'extrémité émoussée de l'œuf avec une pince coupante. Assurez-vous de ne pas pénétrer la membrane de la coquille. Il s'agit de réduire la pression de la poche d'air afin que l'œuf puisse tomber.
3. Utiliser des pinces pour faire une petite fenêtre (5 mm < 1 cm) dans les œufs à l'extrémité pointue
4. Retirer 3 ml d'albumine de l'œuf à l'aide d'une seringue de 1 ml. (Tagami spécifie 5 ml. Nous utiliserons 3 ml dans ces expériences et surveillerons l'humidité et la perte de poids.)
5. Retirez 1–2 ul de sang pour créer de la place pour les cellules injectées
6. (Facultatif) placez ce sang dans un tube pour le génotypage de l'œuf hôte
7. Injecter 1–2 ul de solution CSP.
8. Ajouter 100 ul de solution Pen/Strep (100×)
9. Après l'injection, placez un petit morceau de film alimentaire (double couche) sur l'œuf
10. Utilisez de l'albumine fine provenant d'œufs nouvellement pondus comme colle. Utilisez un coton-tige pour sceller les trous

Incubation des œufs

1. Peser à nouveau l'œuf et le placer dans l'incubateur Brinsea

2. Incuber les œufs avec l'extrémité pointue vers le haut
3. 45 degrés pour les incubateurs Brinsea toutes les 30 minutes à 38,4°C jusqu'au jour 18, humidité 60%.
4. Peser les œufs tous les deux jours pour surveiller la perte d'eau (lundi, mercredi, vendredi)
5. Enregistrer les embryons morts et les placer à 4C
6. Bougie aux jours 10 et 14 et placer les embryons morts à 4°C.
7. Passer à l'éclosoir au jour 18 à 37/37,5 °C pour l'éclosion. Selon Tagami, 90% des poussins peuvent sortir de l'œuf, 10% des poussins ne peuvent pas et ont besoin d'aide.

L'équipe de technologie de reproduction et élevage de précision du CTLGH



Cette recherche a été financée en partie par la Fondation Bill & Melinda Gates et UKaid du UK Foreign, Commonwealth and Development Office (Accord de subvention OPP1127286) sous les auspices du Centre for Tropical Livestock Genetics and Health (CTLGH), établi conjointement par l'Université d'Édimbourg, le Collège rural d'Écosse (SRUC) et l'Institut international de recherche sur l'élevage (ILRI). Les constatations et conclusions contenues dans le manuel sont celles des auteurs et ne reflètent pas nécessairement les positions ou les politiques de la Fondation Bill & Melinda Gates ni du gouvernement britannique. Dans le cadre des conditions d'octroi de la Fondation, une licence générique Creative Commons Attribution 4.0 a déjà été attribuée à l'auteur du présent document.

ISBN: 92-9146-702-2



L'Institut de recherche sur l'élevage (ILRI) s'efforce d'améliorer la sécurité alimentaire et de réduire la pauvreté dans les pays en développement grâce à la recherche pour une utilisation meilleure et plus durable du bétail. L'ILRI est un centre de recherche du CGIAR. Il travaille à travers un réseau de bureaux et de projets régionaux et nationaux en Asie de l'Est, du Sud et du Sud-Est, et en Afrique centrale, orientale, australe et occidentale. ilri.org



Le CGIAR est un partenariat mondial de recherche agricole pour la sécurité alimentaire. Ses recherches sont menées par 15 centres de recherche en collaboration avec des centaines d'organismes partenaires. cgiar.org