



**HAL**  
open science

**De la décalcification de la coquille de l'oeuf à la  
minéralisation osseuse de l'embryon d'oiseau INRA  
UMR Biologie des Oiseaux et Aviculture (BOA) équipe  
Défense de l'OEuf, Valorisation et Evolution (DOVE)  
37380 NOUZILLY**

Marine Crepeau, Nelly Bernardet, Sophie Réhault-Godbert

► **To cite this version:**

Marine Crepeau, Nelly Bernardet, Sophie Réhault-Godbert. De la décalcification de la coquille de l'oeuf à la minéralisation osseuse de l'embryon d'oiseau INRA UMR Biologie des Oiseaux et Aviculture (BOA) équipe Défense de l'OEuf, Valorisation et Evolution (DOVE) 37380 NOUZILLY. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. hal-02888789

**HAL Id: hal-02888789**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02888789>**

Submitted on 3 Jul 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**CREPEAU Marine**



---

# MEMOIRE DE STAGE

---

De la décalcification de la coquille de l'œuf à la minéralisation osseuse de l'embryon d'oiseau



**Tutrice :** Sophie REHAULT-GODBERT



ANNEE 2019

**INRA**

UMR Biologie des Oiseaux et Aviculture (BOA)  
équipe Défense de l'Œuf, Valorisation et Evolution (DOVE)  
37380 NOUZILLY

**Site web image couverture :** <http://www.greyparis.fr/a-quoi-sert-couveuse-automatique/>

# Remerciements

---

Je remercie tout d'abord ma maîtresse de stage Mme. Sophie Réhault-Godbert pour son accueil, sa confiance et pour son aide lors de la rédaction de ce mémoire.

Je tiens à remercier aussi Nelly Bernardet pour m'avoir accompagnée tout au long de ce stage en m'encadrant lors de manipulations, en m'apportant beaucoup d'informations sur les principes de biologie moléculaire et en m'aidant à corriger le matériel et méthodes et la partie résultats de mon mémoire.

Je remercie Maxwell Hincke (*Stadium Professorship*, Université d'Ottawa, Canada) pour les discussions et son aide au prélèvement des membranes chorioallantoïques.

Je souhaite remercier Nathalie Meme (équipe « Alimentation et Systèmes d'Élevage, UMR BOA) qui m'a encadrée lors des dosages de minéraux tout en me donnant beaucoup d'autonomie et Séverine Urvoix (équipe « Adaptation, Qualité et Sélection, UMR BOA) pour m'avoir accompagnée pour la lyophilisation des échantillons. Je remercie Agnès Narcy (équipe « Alimentation et Systèmes d'Élevage, UMR BOA) qui a pris en charge l'analyse statistique des résultats.

Je remercie également Sabine Alves (Équipe « Interactions Cellulaires et Fertilité », UMR PRC) pour m'avoir cédé les œufs nécessaires aux expérimentations et le protocole de sexage moléculaire, Joel Delaveau et Christophe Rat (« Pôle Expérimental Avicole de Tours ») pour avoir géré la collecte, le poids des œufs et la mise en incubation (couvoir) pour réaliser notre projet.

Je remercie aussi Thierry Bordeau (« Métabolisme des Oiseaux, Qualité, Adaptation », UMR BOA), pour son aide lors de la dissection des embryons.

Enfin je remercie toute l'équipe DOVE de l'UMR BOA pour son accueil chaleureux et bienveillant ainsi que Lucie et Manon avec qui j'ai eu la chance de faire mon stage.

# Abréviations

---

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire

**ARN** : Acide ribonucléique

**BOA** : Biologie des Oiseaux et Aviculture

**CaBP** : Calcium Binding Protein

**CAM** : Membrane chorioallantoïque

**DOVE** : Equipe « Défense de l'Oeuf, Valorisation, Evolution »

**ED12** : 12 jours d'incubation

**ED16** : 16 jours d'incubation

**EDTA** : éthylènediaminetétraacétique

**ICP** : Inductively Coupled Plasma

**LC** : Liquide allantoïque

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**Qsp** : Quantité Suffisante Pour

**Rpm** : Round per minute

**RT-PCR** : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

**SV** : Sac vitellin

# Sommaire

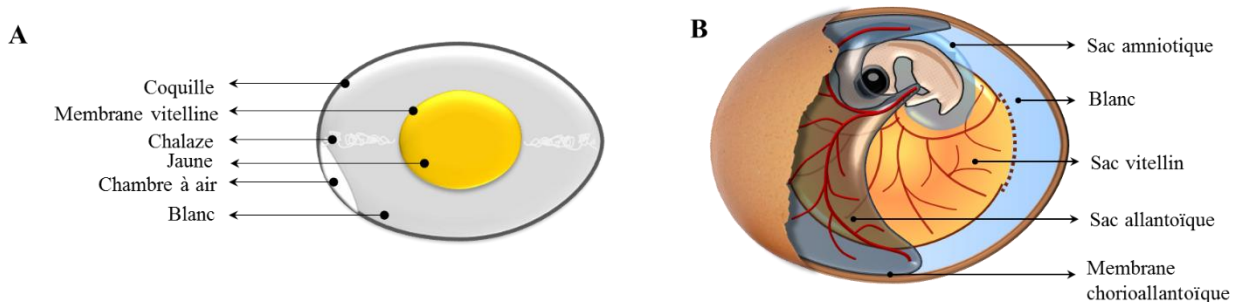
---

<b>I. Introduction – Généralités.....</b>	<b>1</b>
<b>II. Matériels et méthodes.....</b>	<b>5</b>
II.1. Prélèvement des échantillons .....	5
II.2. Coloration de l’embryon au bleu alcian et au rouge alizarine .....	6
II.3. Préparation et dosage des minéraux de la coquille et du liquide allantoïque par spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP optique) .....	7
II.4. Sexage moléculaire.....	8
II.5. Expression des gènes de transporteurs minéraux .....	9
II.5.1. <i>Broyage de la membrane chorioallantoïque et extraction de l’ARN</i> .....	9
II.5.2. <i>Traitement à la DNase</i> .....	10
II.5.3. <i>Vérification de la qualité des ARN extraits</i> .....	11
II.5.4. <i>RT-PCR</i> .....	11
II.6. Analyse statistique des données .....	12
<b>III. Résultats .....</b>	<b>13</b>
III.1. Caractéristiques de l’œuf.....	13
III.2. Coloration du squelette.....	15
III.3. Sexage moléculaire.....	16
III.4. Extraction des ARN et RT-PCR pour l’analyse ultérieure de l’expression de gènes candidats .....	17
<b>IV. Discussions – Conclusions – Perspectives.....</b>	<b>19</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>23</b>
<b>Sitographie .....</b>	<b>24</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>25</b>

# I. Introduction – Généralités

Les oiseaux sont des ovipares, c'est-à-dire que leur système de reproduction s'appuie sur la production d'œufs dans lequel l'embryon va se développer jusqu'à l'éclosion. Ce développement se déroule de façon autonome grâce à différentes structures qui l'aident aussi à se protéger des potentielles agressions extérieures.

Deux classes composent ces structures : élémentaires et extra-embryonnaires (**Figure 1**).



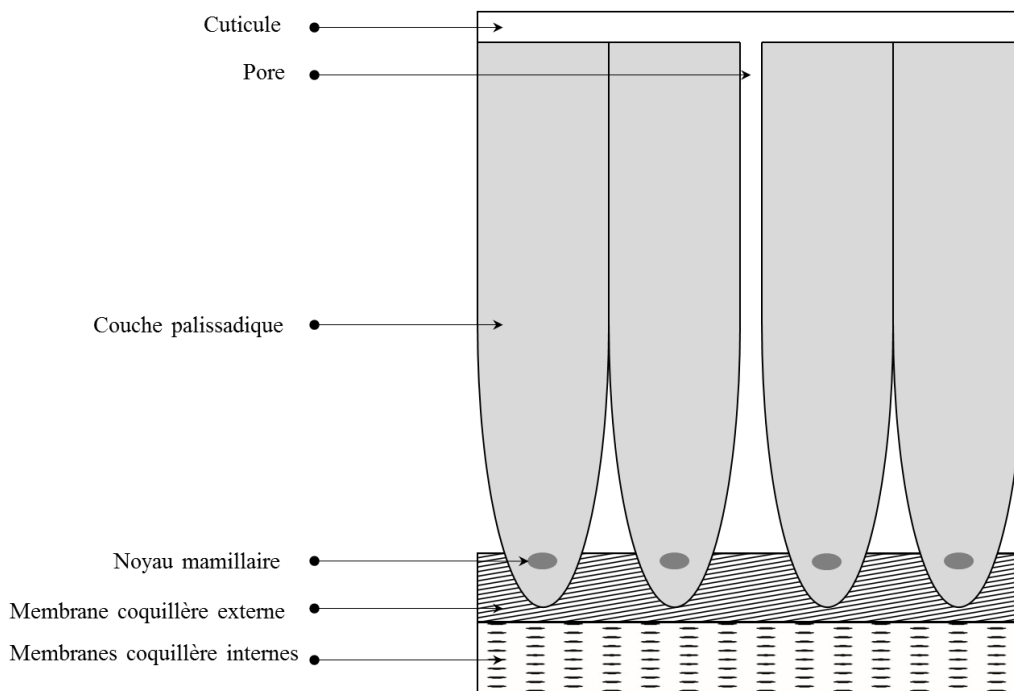
**Figure 1** : Représentation des structures élémentaires (A) et extra-embryonnaire (B) de l'œuf de poule (D'après [1])

Les structures élémentaires sont le blanc, le jaune, la membrane vitelline et la coquille. Ces différents éléments sont une source de nutriments (protéines, lipides, vitamines, oligoéléments, minéraux) et d'énergie nécessaires au bon développement de l'embryon. Ces structures assurent chacune une fonction bien définie au cours du développement embryonnaire.

Lorsque l'œuf est fécondé, des structures extra-embryonnaires vont se développer : il s'agit des sacs vitellin (SV), amniotique et allantoïque. Le SV se développe sur le jaune en s'appuyant sur la membrane vitelline. C'est cette structure qui assurera le transfert des nutriments du jaune vers l'embryon au cours de sa croissance. Le sac amniotique est une poche dans laquelle baigne l'embryon et qui joue un rôle dans son hydratation tout en le protégeant contre les chocs mécaniques. Enfin, le sac allantoïque est relié à la partie postérieure de l'embryon, c'est un lieu de stockage pour les déchets métaboliques et aussi un acteur du maintien de l'équilibre acido-basique. Le sac allantoïque est composé d'un liquide (liquide allantoïque (LC)) et d'une membrane que l'on appelle membrane chorioallantoïque (CAM). Cette membrane permet l'échange des gaz respiratoires, le maintien de l'homéostasie acido-basique dans l'embryon, l'activation des cellules de l'immunité innée en cas d'infection et le transport des minéraux. Toutes ces structures assurent donc des fonctions vitales de l'embryon de poulet jusqu'à son éclosion, après 21 jours d'incubation [1].

Dans ce projet, nous avons choisi de nous intéresser aux mécanismes de décalcification de la coquille au cours du développement embryonnaire, étape nécessaire à la minéralisation osseuse de l'embryon. En effet, l'embryon a besoin de calcium pour répondre à ses besoins métaboliques au cours de la croissance osseuse. Dans l'œuf, il existe 2 sources principales de minéraux : le jaune essentiellement utilisé au cours de la première moitié de l'incubation (ED0 à ED11) puis la coquille, qui prend le relais (ED12 à ED21) et assure la minéralisation du squelette. C'est donc sur cette dernière fenêtre d'incubation que nous nous sommes focalisées.

La coquille possède différents rôles : protéger le contenu de l'œuf de l'environnement extérieur, permettre les échanges d'eau et de gaz grâce à la présence de pores (on en dénombre environ 10 000 sur une coquille) et fournir du calcium pour la calcification osseuse du squelette de l'embryon. La coquille est composée de 5 couches (**Figure 2**). Il y a tout d'abord la partie interne composée de deux membranes formées de fibres protéiques empêchant la diffusion du blanc. La couche palissadique compacte est formée de colonnes irrégulières composées de cristaux de calcite. La cuticule est un biofilm organique qui couvre la totalité de la coquille ainsi que les pores, ce qui limite la perte d'eau et la pénétration bactérienne.



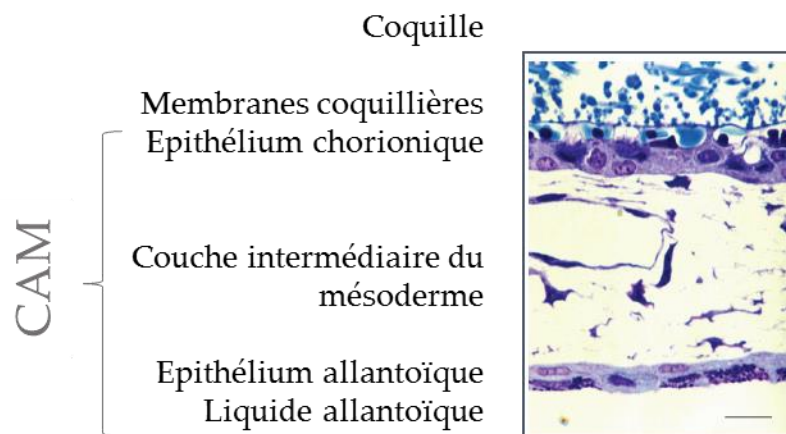
**Figure 2** : Représentation schématique d'une coupe transversale de coquille d'œuf (D'après [2])

Épaisse et solide, la coquille est composée à 95% de minéraux (calcium, sodium, phosphore...). Elle est constituée en majorité de calcite qui est une forme trigonale du carbonate de calcium.



Selon les espèces, l'épaisseur, la forme, la taille, la porosité et la microstructure de la coquille sont variables mais la structure globale est toujours la même [2].

Le transfert de calcium de la coquille à l'embryon débute à partir du 10ème jour d'incubation [3]. Il est estimé que 80% du calcium total de l'embryon provient de la coquille [4]. En effet il y a environ 2.6 g de calcium dans la coquille contre 20 à 25 mg dans le jaune. Le calcium est transporté de la coquille à l'embryon grâce à la CAM. Toutes ces fonctions sont contrôlées par les épithéliums chorionique et allantoïque et le mésoderme qui composent cette CAM (**Figure 3**) [5].



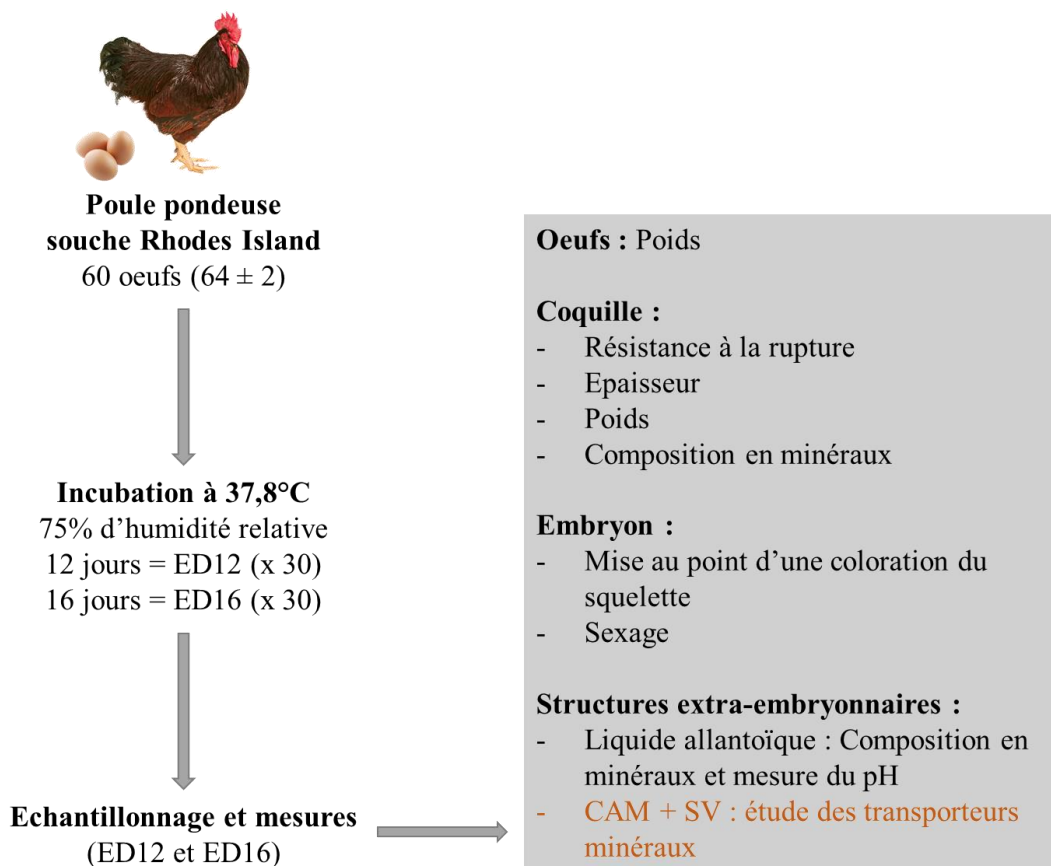
**Figure 3** : Observation microscopique des trois couches composant la membrane chorioallantoïque (D'après [5])

Les cellules présentes à la surface de l'épithélium chorionique vont adhérer à la membrane coquillière interne, des extensions cytoplasmiques vont s'étendre et atteindre les réserves de calcium de la coquille pour mobiliser et transporter les minéraux [1]. La synthèse de calcium Binding Protein (CaBP) qui est une protéine de liaison au calcium dépendante de la vitamine K, l'augmentation de l'ATPase dépendante du magnésium et l'activité de l'anhydrase carbonique (AC) sont effectuées par cet épithélium chorionique pour pouvoir réaliser le transport de calcium (de la dégradation et solubilisation de la coquille au transport des minéraux vers l'embryon après accumulation dans le jaune). Il a aussi rôle protecteur puisqu'il empêche la diffusion des ions avant que l'embryon n'ait besoin de calcium [5].

Lorsque l'épithélium chorionique adhère à la membrane coquillière, le calcium de la coquille est alors solubilisé sous forme de phosphate de calcium pour rejoindre le système sanguin de la CAM puis de l'embryon en développement pour participer à la minéralisation de son squelette. La perte de calcium au niveau de la coquille va en outre permettre un amincissement de celle-ci, ce qui facilitera la sortie de l'embryon au bout des 21 jours d'incubation [1].

Le squelette est un système très complexe qui joue un rôle structural et protecteur de certains organes chez tous les vertébrés. Le squelette de l'embryon est déposé sous la forme de cartilage qui est progressivement ossifié au cours du développement embryonnaire. Deux types de formations osseuses sont distingués. Il y a tout d'abord l'ossification endochondrale qui apparaît après la différenciation des cellules en chondrocytes. Celles-ci sécrètent une matrice extracellulaire riche en protéoglycanes, glycosaminoglycanes et collagène de type II et X. Elles subissent un processus de différenciation ainsi que d'apoptose qui permet de transformer le cartilage en os. Le deuxième type de formation est l'ossification endoconjonctive, les cellules mésenchymateuses se différencient en ostéoblastes et permettent la formation directe de l'os [6].

Les objectifs de ce stage sont d'étudier le processus de décalcification de la coquille en parallèle de l'ossification de l'embryon afin d'apprécier le flux de minéraux de la coquille vers l'embryon entre 12 jours et 16 jours d'incubation (le stade ED12 correspond à l'initiation de la minéralisation et le stade ED16 à un stade de mobilisation active de la coquille). Pour cela différentes procédures ont été réalisées (**Figure 4**).



**Figure 4 :** Schéma explicatif des différentes méthodes abordées pour l'étude  
*En orange : en cours de réalisation*

## II. Matériels et méthodes

---

### II.1. Prélèvement des échantillons

Les œufs utilisés lors de cette étude proviennent d'une souche de poules pondeuses « Rhodes Island ». Deux lots de 30 œufs fécondés ont été incubés respectivement 12 jours (ED12) et 16 jours (ED16) à 37,8°C, 45% d'humidité relative au couvoir de l'Unité expérimentale « Pôle Expérimental Avicole de Tours ». Avant prélèvements, ils sont maintenus dans une étuve à 37,8°C au laboratoire.

Les prélèvements des organes et liquides biologiques sont réalisés suite à des mesures des paramètres physiques (poids de l'œuf, résistance à la rupture et épaisseur de la coquille, **Figure 4**), à l'aide du *Digital Egg Tester 6000* (Nabel, Kyoto, Japon).

La coquille est ouverte au niveau de la chambre à air (voir **Figure 1**) afin de ne pas endommager l'embryon. La CAM est ensuite humidifiée pour faciliter l'observation des vaisseaux sanguins par transparence. Une seringue avec une aiguille de 0,6 x 25 mm est introduite à travers la membrane pour aspirer le LC en évitant une contamination de l'échantillon par du sang. Le contenu de l'œuf est ensuite versé dans une boîte de Pétri pour réaliser les prélèvements de CAM, SV, de jaune et d'embryon (**Figure 4**).

L'embryon est sacrifié rapidement par décapitation. Un morceau de cou est prélevé dans un microtube pour le sexage moléculaire puis conservé à -20°C. Le corps de l'embryon est ensuite placé dans un pot de 100 mL contenant 75 mL d'alcool à 90°C pour la réalisation de la coloration au bleu alcian/rouge alizarine (II.2).

Pour les œufs ED12, le jaune est prélevé avec une seringue de 5 mL après détachement du sac vitellin de l'embryon. Cette opération n'est pas réalisée pour les œufs ED16 car à ce stade il reste très peu de jaune.

La CAM est extraite de la coquille par décollement à l'aide d'une pince. Elle est lavée grâce à des bains d'eau physiologique (NaCl 0,9 %) puis plongée dans l'azote liquide, et conservée à -80°C. La procédure est similaire pour le sac vitellin.

La coquille est, quant à elle, lavée avec de l'eau du robinet puis séchée 2h à 110°C pour déterminer le poids sec. Les coquilles sont alors stockées à 4°C pour le dosage ultérieur des minéraux.

## II.2. Coloration de l'embryon au bleu alcian et au rouge alizarine

Cette technique a été décrite dans la littérature sur un modèle murin et a été adaptée ici sur un modèle aviaire [A]. La coloration du squelette permet la visualisation des formes et des tailles des différents os/cartilages qui le composent.

Les différents volumes de réactifs ont été adaptés à la taille de l'embryon soit 50 mL pour les embryons ED12 et 75 mL pour les ED16.

Les embryons sont tout d'abord fixés dans de l'éthanol 90% pendant 12 jours avec le renouvellement du bain tous les 4 jours. Il est alors possible de procéder à l'élimination de la peau et des organes. Puis, ils sont colorés pendant 3 jours dans un bain de bleu alcian à 0,1 g/L (Sigma, Saint-Louis, Etats-Unis, ref A5268) dans un mélange d'éthanol et d'acide acétique. C'est un colorant cationique qui se lie aux glycosaminoglycanes et aux glycoprotéines sulfatées présents dans le cartilage.

La fixation du colorant aux tissus embryonnaires est réalisée grâce à des bains successifs d'éthanol de concentrations décroissantes soit 2 fois 2h à 70% puis une nuit à 40% et 2h dans un bain à 15%. A l'issue de ces bains, les échantillons sont réhydratés dans un bain d'eau déminéralisée pendant 4h avant d'être plongés dans un bain d'hydroxyde de potassium (KOH) à 1% pendant 3 jours. Les tissus mous sont alors partiellement hydrolysés et translucides, ce qui permet au colorant d'accéder et de se fixer au squelette.

La deuxième partie de la coloration peut avoir lieu : le rouge alizarine (Sigma, ref A5533, dilué à 1% dans du KOH 1%). C'est un colorant anionique qui se lie aux métaux cationiques tels que le calcium et qui est spécifique des os puisqu'ils contiennent à 99% du calcium. La coloration au rouge alizarine dure 3 jours et comprend 2 changements de bains [6].

Les embryons sont ensuite rincés dans 3 bains de KOH à 1% de 2h chacun. Finalement, la conservation des échantillons est possible en milieu glycérolé grâce à 3 bains successifs contenant du glycérol en concentration croissante dans l'eau (20, 50 puis 87,5%) d'une journée chacun. Les ED12 n'ont été immergés que dans le glycérol à 20% car ils étaient trop fragiles et disloqués.

### II.3. Préparation et dosage des minéraux de la coquille et du liquide allantoïque par spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP optique)

La première étape consiste à mettre les minéraux contenus dans la coquille en solution. Pour ce faire, pour chacun des 60 échantillons (30 ED12 et 30 ED16), environ 300 mg de coquille préalablement broyée avec un broyeur à bille Cryomill (Retsch, Haan, Allemagne) sont pesés et placés dans un matras pour micro-onde. Les LC ont quant à eux été lyophilisés avant d'être pesés et déposés dans les matras. Sous sorbonne, 10 mL d'acide nitrique 65% sont ajoutés à chaque matras qui est installé dans un support complètement hermétique et placés dans un micro-onde (micro-onde Ethos Up (Milestone, Sorisole, Italie) et le cycle de solubilisation peut débuter. Ce dernier consiste en un cycle de montée en température pendant 20 min jusqu'à 200°C puis vient une phase de plateau à 200°C pendant 20 min et la température redescend pour pouvoir récupérer les échantillons.

Les minéralisats obtenus sont versés dans des tubes à hémolyse en vue de réaliser le dosage des minéraux par spectrométrie ICP optique. Les échantillons à doser sont vaporisés par nébulisation dans un plasma d'argon, ce qui va exciter thermiquement les ions. Lorsque les ions reviennent à leur état fondamental, ils émettent des photons à une longueur d'onde caractéristique de l'élément à doser, les longueurs d'ondes sont alors séparées, identifiées et leurs intensités mesurées par un spectromètre. Les concentrations sont déterminées à l'aide d'une gamme étalon réalisée pour chaque minéral à doser (quatre points de gamme (10, 5, 2 et 1 mg/L) pour chaque minéral). Des expériences préliminaires sur deux échantillons de coquilles ont été réalisées afin d'adapter ou non la dilution future des échantillons pour que leur concentration soit bien comprise entre 1 et 10 mg/mL (points de gamme). Ainsi, le phosphore, le magnésium, le potassium et le sodium ont été dosés sur un même échantillon tandis que le dosage du calcium a été réalisé sur une dilution d'échantillon plus élevée (1/500e) en raison de sa forte concentration dans la coquille (dosages réalisés en double).

Pour chaque minéral dosé, il faut choisir la visée : axiale (échantillons peu chargés) ou radiale (échantillons chargés). Les longueurs d'onde et visées choisies par minéral sont présentées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau I :** Longueur d'onde et visée sélectionnées pour chaque minéral souhaitant être dosé

Minéral	Longueur d'onde (en nm)	Visée
Phosphore	213.618	Axiale
Magnésium	285.213	Radiale
Potassium	213.618	Axiale
Sodium	589.995	Radiale
Calcium	317.933	Axiale

La procédure est similaire pour le dosage des minéraux dans le LC à la différence que le dosage est réalisé sur la totalité de l'échantillon car celui-ci est de petit volume et relativement peu concentré en minéraux. Une dilution au ½ est réalisée pour le dosage du calcium, potassium et sodium.

#### II.4. Sexage moléculaire

Contrairement aux mammifères, les oiseaux ne possèdent pas le chromosome Y mais un chromosome W qui permet lui aussi la différenciation sexuelle. Le mâle est donc ZZ et la femelle ZW (contrairement à l'espèce humaine où c'est l'homme qui est hétérogamétique). Des amorces WCs et WCas reconnaissent une séquence répétée spécifique du chromosome W appelée *XhoI-Repeat Sequence* [7].

Cette séquence est amplifiée par une réaction d'amplification en chaîne (*Polymerase Chain Reaction* = PCR) grâce à des amorces spécifiques. En parallèle, le gène de référence 18S (ARN ribosomique 18S) est aussi amplifié car il est ubiquitaire (exprimé dans tous les tissus) et qu'il est aussi bien présent chez les mâles que chez les femelles.

L'échantillon biologique (prélèvement de morceau de cou) est dans un premier temps soumis à une lyse enzymatique afin de libérer les acides nucléiques. Cette réaction est réalisée en présence d'une résine Chelex® 100 (BioRad, Hercules, Etats-Unis, ref 1421253) qui va chélater les ions divalents. Le tissu est digéré à l'aide d'un mélange contenant 2,5 µL de Protéinase K (20 mg/mL (Qiagen, Hilden, Allemagne, ref 19131), 0,02 g de résine qsp 0,2 mL d'eau. Les tubes sont incubés sous agitation à 700 rpm pendant minimum 2h à 56°C. A l'issue de l'incubation, l'inactivation de l'enzyme se fait par un chauffage de 10 min à 99°C. Une

centrifugation est alors réalisée pendant 2 min à 10 000 g afin d'éliminer les restes de tissus ainsi que la résine (qui se retrouvent dans un culot).

Les conditions de PCR utilisées ici sont les suivantes : pour 1 µL de lysat cellulaire contenant l'Acide Désoxyribonucléique (ADN), il faut ajouter 12,5 µL de DreamTaq PCR Master Mix 2X (ThermoFisher, Waltham, Etats-Unis, ref K1071), 1,25 µL pour chaque amorce utilisée (10 µM), ainsi que 6,5 µL d'eau. L'amplification est effectuée à l'aide d'un thermocycleur *Mastercycler Gradient* (Eppendorf, Hambourg, Allemagne). Un cycle de PCR est composé de 3 étapes : la dénaturation (30 s à 95°C) qui va permettre d'obtenir des molécules d'ADN monocaténares à partir des deux brins d'ADN, l'hybridation des amorces complémentaires (30 s à 58°C) et enfin l'élongation (1 min à 72°C). Ce cycle est répété 30 fois afin de s'assurer que le gène est suffisamment amplifié. La migration en gel d'agarose permettra de visualiser cette amplification du gène d'intérêt. Pour cela 5 µl de produits de PCR sont déposés sur un gel contenant 2% d'agarose (Eurogentec, Liège, Belgique, ref EP-0010-05) et 1X de Gel Red (Biotium, Fremont, Etats-Unis, ref 41003). La séparation des fragments est faite par électrophorèse en tampon TAE 1X (Eppendorf, ref 0032 006 558). La migration se fait sous un voltage 100V pendant 45 min avec le *Mupid®-one electrophoresis system* (Eurogentec). Le marqueur de masse utilisé est le Trackit 100pb (Invitrogen, ref 10488058). Il permet de faire une estimation de la taille des fragments obtenus sur le gel. Les gels contenant les ADN amplifiés sont placés dans le *GeneGenius Bio Imaging System* (Syngene, Bangalore, Inde) pour l'analyse des résultats : entre 254 et 312 nm, le GelRed va émettre de la fluorescence, ce qui va permettre de visualiser les ADN amplifiés dans lesquels il s'est intercalé.

## II.5. Expression des gènes de transporteurs minéraux

### II.5.1. Broyage de la membrane chorioallantoïque et extraction de l'ARN

Cette étude est réalisée sur deux structures extra-embryonnaires de l'œuf qui sont respectivement la CAM et le SV. Ces structures sont constituées de différents tissus et types cellulaires. Afin d'homogénéiser l'échantillon, il faut procéder dans un premier temps à un broyage des tissus. Trente-six échantillons, 18 pour chaque temps d'incubation, sont traités. Afin de préserver l'intégrité des échantillons, le broyage mécanique est réalisé en présence d'azote grâce à un broyeur *All Basic* (IKA, Staufen im Breisgau, Allemagne).

L'extraction d'ARN est réalisée en suivant les instructions du fournisseur du kit *Nucleospin RNA* (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne, ref 740 955). La lyse des cellules est la première étape, elle permet de libérer les acides nucléiques contenus à l'intérieur de celles-ci. Le tampon de lyse contient une grande quantité d'ions chaotropiques qui détruisent la structure tridimensionnelle des cellules et qui permet aussi d'inactiver immédiatement les RNAses. En plus du tampon de lyse, le bêta-mercaptoéthanol 1% (Sigma, ref M6250) va pouvoir réduire les ponts disulfures de protéines, ce qui va faciliter leur dénaturation. Une bille d'acier est ajoutée dans le microtube et le tout est mis à homogénéiser 2 min à 30 Hz avec le broyeur à billes MM400 (Retsch). Le lysat est filtré sur une colonne après centrifugation 1 min à 11 000 g. Le filtrat obtenu est mis dans un tube de 2 mL puis incubé 10 min à 55°C avec 10 µL de Protéinase K (Qiagen). Les restes protéiques sont éliminés après centrifugation 3 min à 11 000 g en récupérant seulement le surnageant dans un nouveau tube de 2 mL.

L'ARN est ensuite précipité avec 0,5 volume l'éthanol absolu, puis le tout est transféré sur une colonne *Nucleospin RNA II*. Cette colonne possède une membrane de silice. Cette membrane fixe sélectivement les acides nucléiques dans des forces ioniques élevées. La colonne est centrifugée et l'ultrafiltrat est éliminé. Cette opération est réalisée plusieurs fois, c'est ce qui va permettre le "lavage de la colonne" et la fixation des ARN à la membrane de silice.

La membrane de silice subit une succession de rinçages avec 350 µL de *Membrane Desalting Buffer* (MDB) fourni par le kit. L'objectif étant de n'obtenir que de l'ARN, l'ADN est digéré durant 30 min à 37°C par une enzyme (DNase I 10 µL + 90 µL de *DNase Reaction Buffer*).

Le lavage est ensuite réalisé avec 2 tampons différents (RA2 et RA3) qui éliminent le sel, les métabolites et les composants cellulaires macromoléculaires. RA2 (200 µL) est placé sur les colonnes puis le tout est centrifugé 1 min à 11 000 g puis le liquide est jeté. Est ajouté ensuite 300 µL de RA3 (1 min à 11 000 g) puis 250 µL (2 min à 11 000 g).

L'ARN peut alors être élué. Pour cela la colonne est mise dans des conditions de faible force ionique avec de l'eau *RNase Free* (60 µL, chauffée à 37°C au préalable) pendant 2 min à température ambiante puis centrifugé pendant 2 min à 11 000 g [B].

### II.5.2. Traitement à la DNase

Afin d'éliminer toute trace d'ADN génomique résiduel, un deuxième traitement à la DNase est effectué avec le kit *TURBO DNA-free™* (Life technologies, Carlsbad, Etats-Unis, ref



10792877). L'enzyme DNase contenue dans ce kit est une forme recombinante de l'enzyme DNase I. La réaction de digestion est effectuée suivant les recommandations du fournisseur.

En résumé, les 60µl de solution contenant l'ARN en suspension sont traités par 1µl de TURBO DNase (2 unité/ µL), un tampon (*TURBO DNase Buffer 10X*) est ajouté (5 µL). Il contient des petites billes qui vont permettre l'activation de la réaction de DNase lors de l'incubation pendant 30 min à 37°C. L'arrêt de la réaction est fait par incubation en présence de 5 µL de réactif *TURBO DNase Inactivation* et puis les billes sont éliminées par centrifugation 2 min à 10 000 g.

### II.5.3. Vérification de la qualité des ARN extraits

Les concentrations et les puretés des ARN extraits sont déterminées par mesures des absorbances à 260, 280 et 230 nm au Nanodrop (ThermoFisher Scientific, Etats-Unis). L'absorbance (ou Densité Optique) à 260 nm est spécifique des acides nucléiques, les absorbances à 230 et 280 nm qui correspondent aux protéines permettent d'estimer la pureté des ARN [C].

La migration électrophorétique des ARN permet de visualiser leur intégrité. Le dépôt est de 500 ng d'ARN total et la migration se fait à 135 V pendant 30 min. Les molécules soumises à un champ électrique sont séparées en fonction de leurs tailles. La bonne qualité des ARN totaux est définie par un ratio des ARN ribosomiques (ARNr) 28S/18S de 2/1. Ce sont les deux bandes qui doivent apparaître sur le gel si les ARN totaux n'ont pas été dégradés lors de l'extraction. L'absence d'ADN est contrôlée par un test PCR. Le mode opératoire est similaire à la partie II.3. Ici, les amorces conçues à partir d'un gène ubiquitaire se trouve sur un seul intron et le nombre de cycles est de 40. Les échantillons sont ensuite mis à migrer sur un gel d'agarose 1% à 100 V pendant 30 min.

### II.5.4. RT-PCR

La RT-PCR est réalisée à l'aide du kit *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Californie, USA, ref 18064).

Un mix contenant 1 µL d'oligo dT (500 µg/mL) et 1 µL de dNTP (10 mM) est ajouté à 1 µg d'ARN puis le volume est complété à 12 µL en eau. Les tubes sont placés 5 min à 65°C afin de dénaturer l'ARN puis transférés immédiatement dans la glace pour empêcher sa renaturation. Un mix commun est alors ajouté à chaque tube dans la glace. Il contient 4 µL du tampon *First-Strand Buffer 5X*, de l'eau (1 µL) et du DTT 0,1 M (2 µL) qui va déstabiliser les RNases. Les

tubes sont incubés 2 min à 42°C pour permettre à l'oligo dT de s'hybrider. L'enzyme de RT (*SuperScript™ II Reverse Transcriptase*) est ajouté à raison de 1 µL par tube puis les tubes sont placés dans le thermocycleur pour subir le cycle de RT-PCR. La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) se fait pendant 20 min à 52°C, l'arrêt de la synthèse a lieu 15 min à 70°C.

Une PCR avec le gène de ménage GAPDH, est par la suite effectuée afin de s'assurer que la RT-PCR a bien fonctionné et que de l'ADNc a bien été synthétisé dans chaque échantillon. La procédure est similaire à celle décrite dans la partie II. 4 [D].

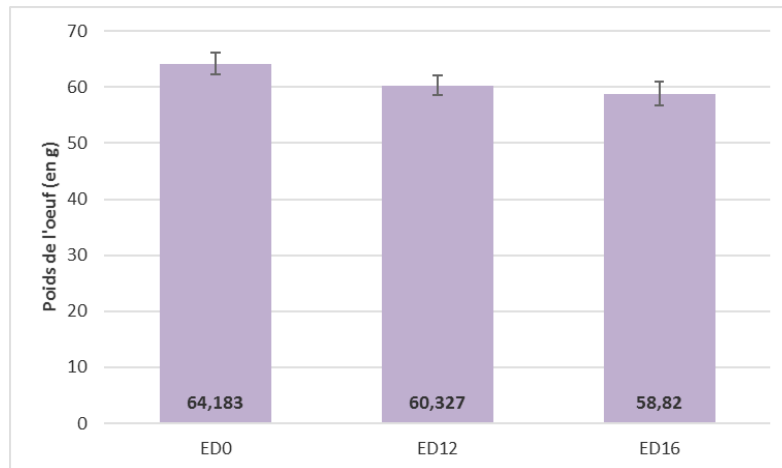
## II.6. Analyse statistique des données

L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un modèle linéaire général qui permet de déterminer si les moyennes des 2 temps d'incubation diffèrent, grâce au logiciel Minitab (Minitab Statistical Software, Pennsylvanie, Etats-Unis).

### III. Résultats

#### III.1. Caractéristiques de l'œuf

Le poids des œufs est observé afin de voir s'il y a un changement au cours de l'incubation. Les poids moyens obtenus sont illustrés graphiquement sur la figure suivante :



**Figure 5 :** Comparaison des poids d'œufs entre trois temps d'incubation

A ED0, les poids des œufs ayant servi à faire les deux lots (30 à ED12 et 30 pour ED16) ne sont pas différents ( $64,4 \pm 1,8$  versus  $63,9 \pm 1,9$ ,  $P = 0,511$ ), ce qui permet de confirmer que les deux lots sont homogènes. Une évolution du poids de coquille entre ces 3 jours d'incubation est constatée. En effet, il semble qu'au cours du développement embryonnaire le poids de coquille diminue. A ED0, l'œuf a une masse moyenne de 64,1 g puis à ED12 cela passe à 60,3 g pour finalement être à 58,8 g à ED16. En 16 jours d'incubation, l'œuf a donc perdu 5,3 g de sa masse.

Le DET6000 a permis de réaliser différentes mesures physiques rapidement pour chaque œuf telles que le poids de l'œuf au cours de l'incubation, la résistance à la rupture ou l'épaisseur de la coquille.

Pour chaque échantillon de coquille, le dosage des minéraux est réalisé en duplicata. Cela permet de s'assurer qu'il n'y a pas de valeurs aberrantes. Les données sont collectées sur tableur afin d'établir des moyennes pour chaque échantillon à partir du double dosage. La concentration moyenne obtenue va permettre par la suite de déterminer qu'elle est la masse de chaque minéral dans la coquille correspondant à l'échantillon selon le calcul suivant :

$$\frac{\text{Concentration en minéraux (en } \frac{mg}{g} \text{)}}{\text{Poids de coquille (en g)}}$$

Pour le LC, faute d'assez de quantité, il n'y a pas de réalisation de duplicata. Seule la teneur est calculée.

L'ensemble des données est présenté dans le **Tableau II**.

**Tableau II** : Comparaison des caractéristiques de l'œuf (physiques et minéraux) et du liquide allantoïque aux temps d'incubations ED12 et ED16

		ED12	ED16	p-value
<b>Poids œuf (en g)</b>		60,33 ± 1,81	58,82 ± 2,09	< 0,001
<b>Résistance à la rupture (en N)</b>		39,50 ± 4,36	34,01 ± 4,92	0,004
<b>Poids de la coquille (en g)</b>		6,29 ± 0,08	6,04 ± 0,08	0,025
<b>Épaisseur de la coquille (en mm)</b>		0,47 ± 0,02	0,43 ± 0,03	0,001
<b>pH LC</b>		7,60 ± 0,32	7,05 ± 0,50	< 0,001
<b>Phosphore (mg/g)</b>	<b>Coquille</b>	1,07 ± 0,15	1,06 ± 0,11	0,979
	<b>LC</b>	9,66 ± 3,20	10,40 ± 4,13	0,312
<b>Mg de phosphore dans la coquille</b>		6,59 ± 0,74	6,40 ± 0,71	0,268
<b>Magnésium (mg/g)</b>	<b>Coquille</b>	3,12 ± 0,36	2,90 ± 0,35	0,205
	<b>LC</b>	6,31 ± 1,79	8,06 ± 3,52	0,045
<b>Mg de magnésium dans la coquille</b>		18,82 ± 2,45	17,54 ± 2,35	0,013
<b>Potassium (mg/g)</b>	<b>Coquille</b>	0,43 ± 0,04	0,43 ± 0,04	0,383
	<b>LC</b>	30,58 ± 14,90	95,21 ± 45,00	< 0,001
<b>Mg de potassium dans la coquille</b>		2,65 ± 0,28	2,52 ± 0,26	0,035
<b>Sodium (mg/g)</b>	<b>Coquille</b>	1,00 ± 0,10	1,00 ± 0,10	0,923
	<b>LC</b>	323,80 ± 89,40	118,10 ± 57,80	< 0,001
<b>Mg de sodium dans la coquille</b>		6,42 ± 0,60	6,03 ± 0,51	0,103
<b>Calcium (mg/g)</b>	<b>Coquille</b>	363,25 ± 8,47	361,22 ± 8,45	0,619
	<b>LC</b>	9,15 ± 3,68	5,82 ± 4,08	< 0,001
<b>Mg de calcium dans la coquille</b>		2299,90 ± 191,00	2165,00 ± 150,10	0,022

*En orange : paramètres ayant une différence statistique significative entre ED12 et ED16 ( $p < 0,05$ )*

D'après les données obtenues, il semble que certains paramètres caractéristiques de l'œuf et du LC évoluent de manière significative entre 12 et 16 jours d'incubation.

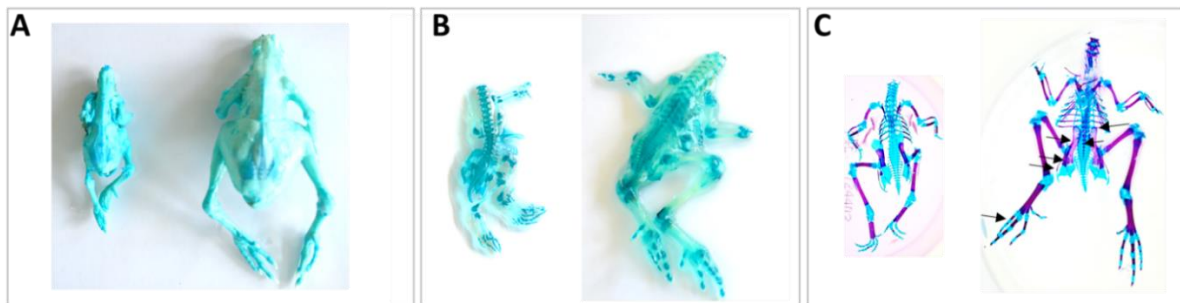
Tout d'abord, il est constaté que les paramètres définissant la qualité de coquille (résistance à la rupture, poids de la coquille et épaisseur de la coquille) sont significativement plus faibles à ED16 qu'à ED12.

Pour ce qui est de la masse de minéraux contenue dans la coquille, elle est diminuée à ED16 par rapport à ED12 pour le calcium, magnésium et potassium. La teneur en minéraux/g de coquille, elle, ne change pas entre ces 2 temps d'incubation.

Les résultats de dosage de minéraux obtenus pour le LC sont différents par rapport à la coquille avec des teneurs globalement plus élevées pour le LC sauf pour le calcium. La teneur en minéraux est significativement plus élevée à ED16 pour le magnésium et le potassium.

### III.2. Coloration du squelette

Tout au long du processus de coloration qui consiste en des changements de bains, l'aspect de l'embryon évolue (**Figure 6**). Les chairs deviennent translucides et rendent visible le squelette.



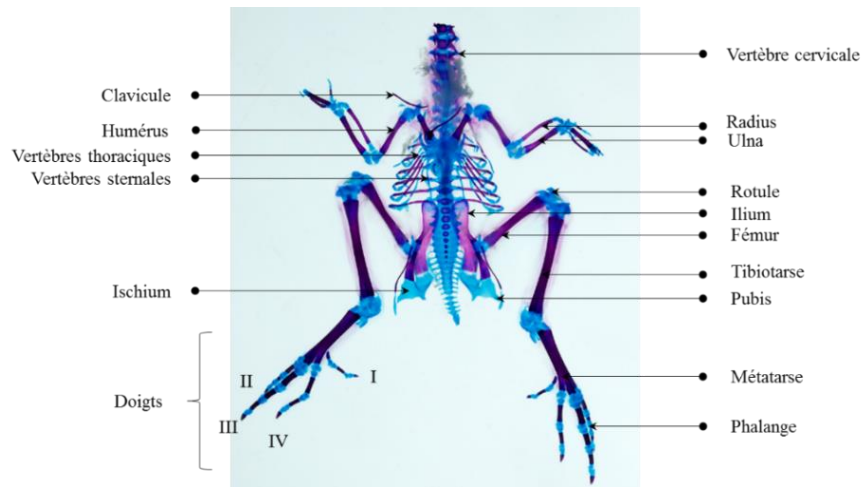
**Figure 6 :** Etat des embryons ED12 (à gauche) et ED16 (à droite) à différents stades de la coloration

- **A :** Après 3 jours de coloration dans le bleu alcian, les chairs sont fermes, opaques et colorées
- **B :** Après 3 jours dans le KOH 1%, les chairs sont devenues translucides et l'embryon a un aspect gélatineux. Le squelette est visible pour la première fois avec les parties cartilagineuses colorées en bleu
- **C :** A la fin de la coloration, les chairs sont complètement translucides, les os sont colorés en rouge par le rouge alizarine et les cartilages en bleu par le bleu alcian. Les flèches indiquent les structures du squelette dont la minéralisation s'est accentuée entre ED12 et ED16.

La coloration a bien marché, le résultat obtenu est similaire à celui présenté dans la littérature [6]. Sur un même stade, tous les embryons ont une coloration identique (il n'y a pas certaines parties qui sont rouges chez l'un et bleu chez l'autre, ce qui dénote une homogénéité des embryons pour un même stade de développement). Il est à noter, que malheureusement, les embryons du stades ED12, très fragiles n'ont pas résisté aux différents changements de bains et aux bains prolongés dans le KOH. Ces dernières étapes les ont fortement détériorés. A la fin de la procédure, plus aucun embryon ED12 n'est entier, ce qui complique l'analyse des résultats pour ce temps d'incubation.

En observant la partie **C** de la **Figure 6**, il est possible de comparer l'évolution de la minéralisation du squelette des embryons à 2 stades différents. La comparaison des stades ED16

avec les stades ED12 a été réalisée sur les squelettes déstructurés et en appuyant sur l'anatomie du squelette de l'embryon d'oiseau (**Figure 7**).

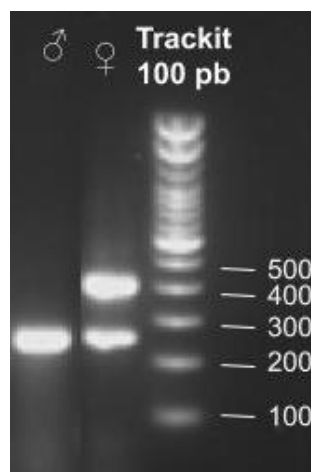


**Figure 7** : Anatomie du squelette de l'embryon de poussin au stade ED16. Crédit photo : Thierry Moreau (Equipe DOVE, UMR BOA). En rouge : partie minéralisée = os ; En bleu : cartilages

Ainsi, Nous avons pu observer une minéralisation plus importante des vertèbres cervicales, des vertèbres sternales, des phalanges, de l'ischium, de l'ilium et du pubis à ED16.

### III.3. Sexage moléculaire

Pour réaliser le sexage, chaque échantillon a subi une PCR afin d'amplifier 2 fragments : *XhoI* présent uniquement chez les femelles d'une taille de 415 pb et le fragment 18S d'une taille de 250 pb, ce dernier permettant de mettre en évidence la présence d'une matrice d'ADN dans le milieu réactionnel et servant de témoin d'efficacité de la réaction.



**Figure 8** : Détermination du sexe, à partir d'un bout de cou prélevé sur des embryons, par PCR. 2 cas possibles :

- Soit 1 bande présente à 250 pb : l'individu est un mâle
- Soit 2 bandes visibles, l'une à 250 pb et l'autre à 415 pb : l'individu est une femelle

Sur les 60 échantillons, il a été déterminé qu'il y a 20 mâles et 31 femelles. Pour 9 embryons, il n'a pas été possible de déterminer le sexe malgré une deuxième tentative à partir de CAM.

### III.4. Extraction des ARN et RT-PCR pour l'analyse ultérieure de l'expression de gènes candidats

Différents contrôles sont réalisés sur les acides nucléiques extraits. Les résultats obtenus par lecture des absorbances permettent d'évaluer la quantité d'acide nucléique obtenue (260 nm) ainsi que leur pureté grâce aux ratios 260/280 nm et 260/230 nm. Ce sont les acides nucléiques qui absorbent à 260 nm, les protéines à 280 et différents types de contaminants (glucides, lipides...) à 230 nm. Il est établi qu'un échantillon est de bonne qualité lorsque ces 2 ratios sont compris entre 1,8 et 2.

Les résultats suivants ont été obtenus :

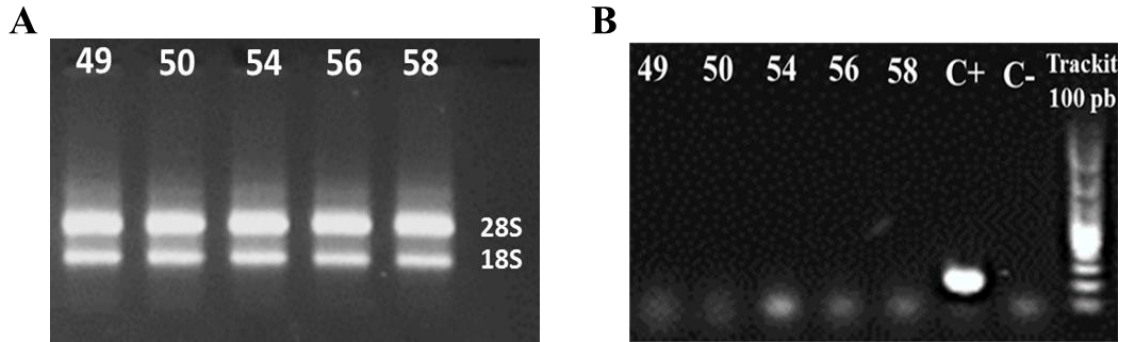
**Tableau III** : Exemple de ratios obtenus au *Nanodrop* pour les échantillons de CAM 1 et 2 ayant subi une procédure d'extraction d'ARN

Echantillon	Concentration (en ng/ul)	A 260/280 nm	A 260/230 nm	Quantité (en µg)
1	518,01	2,01	2,04	28,5
2	235,61	2,02	1,94	13,0

Pour l'ensemble des échantillons, les quantités d'acides nucléiques varient de 9,7 à 35,3 µg et des ratios sont satisfaisants car compris entre 1,8 et 2.

Il faut également s'assurer de l'intégrité des ARN. Les échantillons sont mis à migrer sur un gel d'agarose 2% (**Figure 9 A**). Pour chaque échantillon, il y a la présence de 2 bandes qui correspondent aux ARN ribosomiques 28S et 18S. Les ratio 28S/18S de 2/1 prouvent une intégrité des ARN extraits.

Le dernier paramètre à vérifier est l'absence d'ADN contaminant. Pour cela, une PCR est réalisée directement sur un gène ubiquitaire témoin, la GADPH (**Figure 9 B**). Ici l'absence de fragment amplifié témoigne d'une non-contamination de l'échantillon par de l'ADN génomique.

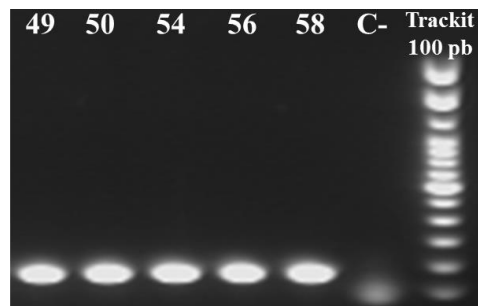


**Figure 9 :** Vérification de la qualité des ARN de CAM extraits

- **A :** Exemple de migration d'échantillons après extraction d'ARN sur gel d'agarose (les profils sont identiques pour les 31 échantillons restants)
- **B :** Vérification de l'absence d'ADN dans des échantillons de CAM après les procédures de DNase, profils identiques pour les 36 échantillons
  - o C+ : contrôle positif de PCR contenant de l'ADN
  - o C- : contrôle négatif, ne contient aucun acide nucléique

Ces différents tests nous permettent de conclure que l'ARN a été extrait en quantité suffisante sans contamination détectable et que l'ADN génomique éventuellement résiduel a bien été dégradé par les traitements à la DNase. Il est donc possible de poursuivre avec la RT-PCR.

Pour s'assurer que la *Reverse Transcription* a bien fonctionné, une nouvelle PCR de contrôle avec le gène de ménage GAPDH est réalisée :



**Figure 10 :** Migration sur gel d'agarose d'échantillons de CAM ayant subi une RT-PCR puis une PCR

- Pour chaque échantillon, observation d'une bande (176 pb)
- C- : contrôle négatif, ne contient aucun acide nucléique

Pour tous les échantillons, la présence d'une bande unique à la taille attendue (176 pb) dans les conditions de PCR choisies permet de valider l'étape de RT.

Après ces différents traitements et vérifications, les échantillons sont prêts pour la PCR quantitative qui est actuellement en cours. Le but est de mesurer l'expression des gènes candidats impliqués dans le transport d'ions et de minéraux et dans l'acidification nécessaire à la solubilisation du calcium de la coquille.



## IV. Discussions – Conclusions – Perspectives

---

Le but de ce stage était d'étudier les mécanismes biochimiques et moléculaires qui témoignent et/ou accompagnent la décalcification de la coquille d'œuf pour permettre la minéralisation osseuse de l'embryon d'oiseau.

Pour illustrer ce phénomène, différentes mesures ont été réalisées. Des paramètres physiques ont tout d'abord été déterminés pour les 60 échantillons de coquilles contenant 2 lots de 30 à 2 temps d'incubation distincts. Il est tout d'abord observé que le poids de l'œuf diminue tout au long de l'incubation. Cette perte de poids est attribuable à une évaporation de l'eau contenue dans l'œuf et aux échanges gazeux *via* les pores de la coquille. En observant les données obtenues, il est aussi constaté que la qualité de la coquille n'est pas identique entre ED12 et ED16. En effet, à ED16 la coquille est moins épaisse, plus légère et résiste moins bien à la rupture. Ces résultats sont cohérents avec une solubilisation progressive de la partie interne de la coquille au cours du développement, d'une perte de matériel (poids de coquille plus faible de 0,325g), d'un amincissement de la coquille (- 0,04 mm) et donc d'une altération de sa solidité (diminution de la résistance à la rupture (- 5,5 N)).

La teneur globale en minéraux dans la coquille est également bien différente entre ces deux stades d'incubation. Une nette diminution est constatée pour le calcium, magnésium et potassium à ED16 par rapport à ED12. Ces résultats corroborent une assimilation progressive du calcium mais aussi d'autres minéraux par l'embryon et qu'il n'y a pas de prélèvement sélectif d'un minéral par rapport à un autre (mg de minéral/g de coquille inchangé). Cette assimilation des minéraux de la coquille est susceptible d'être assurée par l'épithélium chorionique de la CAM (**Figure 3**). La méthode utilisée pour obtenir ces résultats est assez fiable puisqu'il y a eu peu de valeurs aberrantes et les duplicatas étaient la plupart du temps comparables. De plus, elle permet de réaliser les dosages rapidement et de façon semi-automatique, ce qui est un avantage.

Le dosage des minéraux a aussi été effectué sur le LC. Là aussi il y a des différences en teneur entre les 2 stades. De ED12 à ED16 elle diminue pour le calcium, et augmente pour le magnésium, potassium et sodium. Le LC est donc lui aussi une source de calcium pour l'embryon et suppose un rôle de la part de l'épithélium allantoïque de la CAM (**Figure 3**). Il a été aussi observé que le pH de ce liquide entre ED12 et ED16 a diminué passant en moyenne de 7,6 à 7,06. Cette légère diminution s'explique par l'accumulation d'acide urique secrété par

l'embryon au cours de son développement. Cette acidification va s'accroître jusqu'à atteindre une valeur de pH de 5,9 à ED19 d'incubation [1].

La mise au point de la coloration des embryons donne des résultats assez satisfaisants pour un premier essai. Les colorants se sont bien accrochés aux os et cartilages et la coloration est identique pour chaque individu du même lot. Certains points sont à revoir et à corriger pour de prochaines expérimentations. Il sera notamment nécessaire d'ajuster le temps et le nombre de bains en KOH pour éviter la dégradation des échantillons aux stades précoces ( $\leq$  ED12). De plus, avant l'incubation dans l'éthanol et la coloration, sur le protocole de référence utilisé et mis au point pour la souris, il est demandé d'ôter la peau et les organes internes. Or, dans le cas présent, nous avons également enlevé les muscles et autres tissus mous visibles (tissus conjonctifs) ne sachant pas s'ils allaient gêner les étapes de coloration. Nous étions 4 sur ce chantier dont une personne experte (T. Bordeau, voir remerciements), ce qui nous a permis d'avoir un panel d'embryons plus ou moins nettoyés. Au vu des résultats obtenus, il semble que les tissus mous (autres que les organes) ne gênent pas la coloration par le bleu alcian car ceux-ci deviennent translucides avec le KOH. En revanche, ces muscles sont structurants et leur présence permettraient probablement de maintenir squelette en place et peut être cela aurait-il permis de préserver les embryons ED12.

Le sexage moléculaire a permis de déterminer le sexe des embryons sauf pour 9 de nos 60 échantillons. La première hypothèse est que la nature de l'échantillon biologique a perturbé la réaction. En effet, l'échantillon de cou semblait un peu gras dans certains cas et a possiblement altéré l'efficacité d'extraction de l'ADN. Le sexage a donc été refait sur ces 9 échantillons mais à partir d'un autre type de tissu : la CAM. Les résultats n'ont ici pas encore été concluants et les 9 étaient encore de sexe inconnu. Le sexage moléculaire de ces 9 échantillons sera de nouveau réalisé sur le sac vitellin qui a également été prélevé mais qui n'a pas encore été exploité. Malgré ce problème, c'est une méthode plutôt simple et rapide pour déterminer le sexe des embryons. Sur les 51 échantillons qui ont pu être sexés, 39,2% sont des mâles contre 60,8% de femelles. Il est assez intéressant de constater que pour cette souche de poule (poules pondeuses, Rhodes Island), le sex-ratio des œufs embryonnés est en faveur des femelles. Pour l'analyse des résultats « biochimiques », l'effet « sexe » n'a pas été pris en compte mais ce paramètre sera intégré dans les prochaines analyses afin d'évaluer s'il existe une différence de solubilisation des minéraux de la coquille et de la minéralisation du squelette entre les embryons mâles et les embryons femelles.

L'étude de l'expression des gènes de transporteurs minéraux sur la CAM n'a malheureusement pas pu être achevée au cours de ce stage faute de temps. Seules l'extraction de l'ARN, la vérification de la qualité de ceux-ci et la RT-PCR ont pu être abordées. Grâce aux résultats obtenus au *Nanodrop* il a été possible de conclure qu'une quantité suffisante d'ARN a été extraite de la CAM. La qualité de l'ARN extrait a été vérifiée en faisant migrer l'échantillon sur un gel d'agarose. Les bandes obtenues correspondent à des ARNr (18S et 28S) qui sont les formes d'ARN les plus présentes dans la cellule. Ce résultat est satisfaisant puisqu'il témoigne bien de la présence d'ARN. L'autre vérification nécessaire à réaliser avant de faire la RT-PCR est l'absence d'ADN dans les échantillons. Le gel contenant les produits de PCR ne contient aucune bande, ce qui témoigne de l'efficacité des deux traitements à DNase qui ont bien éliminé l'ADN génomique. L'échantillon est donc de bonne qualité pour faire la RT-PCR qui a elle aussi bien fonctionné comme l'illustre le gel de migration contenant les gènes amplifiés par PCR à partir d'ADNc obtenu par RT-PCR.

La CAM joue un rôle très important dans le transport des minéraux à l'aide de mécanismes complexes impliquant de nombreux transporteurs codés par différents gènes. Au cours de ce stage, il était souhaité que ces gènes codant des transporteurs d'ions et de minéraux ainsi que des pompes à protons (pour l'acidification nécessaire à la solubilisation de la coquille) soient différentiellement exprimés entre les deux stades, afin de pouvoir démontrer ce phénomène. Les analyses par quantitative-PCR sont en cours dans le laboratoire mais je n'ai malheureusement pas pu m'impliquer davantage, faute de temps.

Pour compléter cette étude et avoir une vision d'ensemble du flux de minéraux au cours du développement embryonnaire, il s'agira également de doser les minéraux contenus dans le jaune (prélevé à ED12 uniquement) et de comparer l'expression des transporteurs de minéraux du sac vitellin avec ceux de la CAM. En effet, les minéraux du jaune sont assimilés par l'embryon grâce au sac vitellin jusqu'à ED10-12 et ceux de la coquille à partir de ED10, grâce à la CAM. Il est possible que les transporteurs mobilisés/exprimés soient différents entre les deux tissus.

Au cours de ce stage, les différents résultats obtenus ont été satisfaisants car ils illustraient bien le phénomène de décalcification de la coquille en parallèle de la minéralisation osseuse de l'embryon. Plusieurs perspectives sont possibles pour approfondir cette étude.

Tout d'abord, il serait intéressant de refaire à nouveau toutes ces mesures mais à des temps d'incubation différents avec des stades intermédiaires pour avoir une idée plus précise de

l'évolution de la décalcification de la coquille tout au long de l'incubation et en parallèle, la cinétique de l'ossification du squelette embryonnaire.

Pour la coloration du squelette, il faudrait également trouver une méthode pour exploiter les résultats de façon quantitative car qualitativement et visuellement, les différences observées restent imprécises. Sachant que chaque embryon/squelette a été photographié, l'idée serait peut-être d'utiliser un logiciel d'analyse d'images et de la couleur rouge/bleu pour trouver un moyen de calculer des pourcentages de cartilages et d'os entre les différents stades.

Pour conclure, les résultats obtenus et ceux en cours sont très prometteurs et feront l'objet d'une présentation sous forme de poster au congrès « *Combined Workshop of Fundamental Physiology and Perinatal Development in Poultry and Incubation and Fertility Research Group* » qui aura lieu à Tours du 28 au 30 Août 2019. Ce projet est très intéressant car peu de données sont connues à ce jour et il reste encore beaucoup de perspectives d'études.

## Références bibliographiques

---

- [1] : M. DA SILVA, Les liquides amniotique et allantoïque de l'œuf de poule : caractérisation et rôles dans la protection de l'embryon au cours du développement. Université François-Rabelais – Tours. 2017 : 25-42
- [2] : Y. NYS, M-T. HINCKE, A. HERNANDEZ-HERNANDEZ, A-B. RODRIGUEZ-NAVARRO, J. GOMEZ-MORALES, V. JONCHERE, J-M. GARCIA-RUIZ, J. GAUTRON. Structure, propriétés et minéralisation de la coquille de l'œuf : rôle de la matrice organique dans le contrôle de sa fabrication. INRA Prod. Anim. 2010, 23(2) : 143-154
- [3] : R-S. TUAN et T. ONO. Regulation of extraembryonic calcium mobilization by developing chick embryo. J.Embryol. exp. Morph. 1986, 97 : 63-74
- [4] : R-S. TUAN. Supplemented eggshell restores calcium transport in chorioallantoic membrane of cultured shell-less chick embryos. J. Embryol. exp. Morph. 1983, 74 : 119-131
- [5] : M-G. GABRIELLI et D. ACCILI. The Chick Chorioallantoic Membrane: A Model of Molecular, Structural, and Functional Adaptation to Transepithelial Ion Transport and Barrier Function during Embryonic Development. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2010, article ID 940741
- [6] : D. RIGUEUR et K-M. LYONS. Whole-Mount Skeletal Staining. Methods Mol Biol. 2017, 1130 : 113-121
- [7] : M. CLINTON, L. HAINES, B. BELLOIR et D. McBRIDE. Sexing Chick embryos : a rapid and simple protocol. British Poultry Science. 2001, 42(1) : 134-138

## Sitographie

---

[A] : Scientific Protocol. Alizarin Red S (Bone) and Alcian Blue (Cartilage) Staining of Cleared Skeletons [en ligne]. Disponible sur :

<https://protocols.scienceexchange.com/protocols/alizarin-red-s-bone-and-alcian-blue-cartilage-staining-of-cleared-skeletons>, mis à jour le 30 décembre 2014 (consulté le 15/04/2019)

[B] : Macherey-Nagel. RNA isolation, user manual [en ligne]. Disponible sur :

[https://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/RNA%20and%20mRNA/UM\\_TotalRNA.pdf](https://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/RNA%20and%20mRNA/UM_TotalRNA.pdf), juin 2015 (consulté le 02/05/2019)

[C] : ThermoFisher. TURBO DNA-free™ Kit [en ligne]. Disponible sur :

[https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2F1907M\\_turbodnafree\\_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogVFVSQk8gRE5BLWZyZWUgS2l0IChFbmdsaXNoICk=](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2F1907M_turbodnafree_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogVFVSQk8gRE5BLWZyZWUgS2l0IChFbmdsaXNoICk=), mis à jour le 29 juin 2018 (consulté le 07/05/2019)

[D] : ThermoFisher SuperScript™ II Reverse Transcriptase [en ligne]. Disponible sur :

[https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FsuperscriptII\\_pps.pdf&title=U3VwZXJTY3JpcHQgSUkgUmV2ZXJzZSBUcmFuc2NyaXB0YXNl](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FsuperscriptII_pps.pdf&title=U3VwZXJTY3JpcHQgSUkgUmV2ZXJzZSBUcmFuc2NyaXB0YXNl), mis à jour le 20 mai 2010 (consulté le 15/05/2019)

# Annexes

---

## Annexe 1 : Préparation des solutions et réactifs

### **Bleu alcian 0,1 g/L**

Bleu alcian	400 mg
Eau ultra pure	160 mL
Alcool 100 %	3,2 L
Acide acétique glacial	800 mL

### **Rouge alizarine 0,01 g/L**

Rouge alizarine	80 mg
KOH 1%	8 L

## Annexe 2 : Composition des réactifs

### **Dream Taq PCR Mix 2X**

DreamTaq DNA polymerase	0,625 U
DreamTaq Buffer	2X
dNTP	0,4 mM par acide nucléique (A, T, C et G)
MgCl <sub>2</sub>	4 mM

### **Tampon de charge LB6X de tampon de migration TAE**

Bleu de bromophénol	0,25 %
Xylène cyanol FF	0,25 %
Glycérol	30 %

**TAE1X (tampon de migration) :**

Tris-acétate	40 mM
EDTA	1 mM

**First-Strand Buffer 5X**

Tris-HCl	250 mM, ph 8 ,3
KCl	375 mM
MgCl <sub>2</sub>	15 mM

**Membrane Desalting Buffer**

Ethanol	5 – 15 %
---------	----------

**Annexe 3 : Amorces utilisées pour le sexage moléculaire :**

WC-S	Sequence (5' to 3'): CCC AAA TAT AAC ACG CTT CAC T
WC-AS	Sequence (5' to 3'): GAA ATG AAT TAT TTT CTG GCG AC
18S-S	Sequence (5' to 3'): AGC TCT TTC TCG ATT CCG TG
18S-AS	Sequence (5' to 3'): GGG TAG ACA CAA GCT GAG CC

**Annexe 4 : Amorces utilisées pour la PCR contrôle des ARN :**

PKD2-F-2472	: 5' AGCAGATGGAGAGGCTGGTA 3'
PKD2-R-2703	: 5' GTTGGCTTGATGCTGACTGA 3'



### **Annexe 5 : Mesures physiques obtenues sur les 60 œufs de poule ponde Rhodes Island**

N° échantillon	Poids ED0	Poids ED12/16 (g)	Résistance à la rupture (N)	Poids de coquille (g)	Epaisseur (mm)	pH LC	Sexe
1	65,7	61,4	49,9	7,11	0,47	7,4	Mâle
2	63,2	60,3	34,8	5,97	0,47	7,71	Femelle
3	65,5	60,4	44,1	6,73	0,52	7,57	Femelle
4	61,6	57,9	44,1	5,87	0,55	7,25	Mâle
5	65	60,9	37,8	5,8	0,46	7,41	ND
6	65,8	61,4	36,2	5,66	0,43	6,81	ND
7	62,5	58,7	40,7	6,65	0,53	7,75	Femelle
8	65,1	61	41,2	6,92	0,48	7,45	Femelle
9	62	58,4	44,3	5,83	0,45	7,48	Mâle
10	64,2	59,7	36,8	5,91	0,44	7,93	Femelle
11	66,9	62,8	37,6	6,88	0,47	7,53	Mâle
12	63,4	58,7	35,5	5,86	0,47	7,52	Mâle
13	65,7	61,7	43,1	6,17	0,46	6,75	Femelle
14	65	61,1	35	6,08	0,45	7,92	Mâle
15	68	64,4	41,6	7,06	0,46	7,84	Femelle
16	63,8	60,7	34,2	5,92	0,43	7,73	Mâle
17	65,6	61,3	46	6,84	0,48	7,41	Femelle
18	65,4	61,5	38,1	6,74	0,45	7,94	Femelle
19	65,5	61,1	44,9	6,23	0,44	8,01	Femelle
20	61,5	57,2	36,6	5,74	0,43	7,76	Femelle
21	62	58,5	41,1	5,95	0,45	7,68	Mâle
22	68,4	63,8	35,4	6,64	0,48	7,78	Femelle
23	63,6	60,1	44,4	7,12	0,48	7,67	Femelle
24	64,6	60	27,7	5,86	0,45	7,93	Femelle
25	65,1	61,5	34,6	6,74	0,48	7,72	ND
26	66,3	62	43,7	6,4	0,45	8,1	Femelle
27	61,6	57,3	40,7	6,08	0,48	6,11	Femelle
28	64	59,5	39,5	6,03	0,45	7,47	ND
29	62,2	58,4	44,2	6,16	0,45	7,11	Mâle
30	63,3	58,1	41,7	6,55	0,46	7,73	Femelle
31	68,1	63,9	39,4	6,63	0,43	7,38	Mâle
32	67,1	61,9	33,8	5,41	0,41	7,29	Femelle
33	64,2	59,4	36,1	5,71	0,43	7,88	Femelle
34	62,6	57,6	35,1	5,89	0,42	7,28	Mâle
35	62,4	57,6	29,8	5,19	0,41	7,45	Femelle
36	61,5	55,9	33,3	6,67	0,43	6,59	Femelle
37	61,5	56,8	34,5	5,78	0,45	7,49	ND
38	63,1	58,1	35,6	6,67	0,47	7,06	Mâle
39	65	60,9	27,9	5,97	0,41	7,37	Femelle
40	62,3	56,7	38	6,32	0,46	6,49	Mâle
41	63,9	58,2	31,2	5,69	0,38	5,74	Mâle
42	66,5	61	45,8	5,81	0,47	6,55	Femelle
43	61,4	55,9	31,4	5,84	0,42	6,57	Femelle
44	64,2	58,9	40	5,99	0,45	6,32	Mâle
45	67,2	62,5	32,3	6,77	0,46	7,08	Femelle
46	65,8	60,6	35	6,12	0,44	6,29	Femelle
47	62,1	57,4	32,4	5,71	0,43	7,76	Femelle
48	63,6	59,2	26,6	5,89	0,39	7,5	ND
49	63,6	59,3	27,8	6,03	0,44	7,42	Femelle
50	62,5	57,5	37	6,26	0,4	7,05	Mâle
51	62,3	57,4	40,3	5,92	0,47	7,08	Femelle
52	66,2	60,4	29,4	5,49	0,38	7,23	Femelle
53	62,1	57,2	31	5,69	0,41	7,03	Femelle
54	63	56,8	28,4	5,91	0,41	6,37	Mâle
55	65,1	59,5	26,3	5,38	0,36	6,42	Femelle
56	64,7	59,5	30,9	5,95	0,38	7,45	Mâle
57	66	60,8	42,6	6,62	0,45	6,17	Femelle
58	61,5	55,6	38,8	6,15	0,43	6,68	Mâle
59	62,4	57,5	38,5	6,98	0,46	7,18	Femelle
60	66,6	60,6	31,1	5,83	0,43	7,89	Mâle

## Annexe 5 : Dosage de différents minéraux dans la coquille des 60 échantillons

N° échantillon	P (mg/g)	mg de P dans la coquille	Mg (mg/g)	mg de Mg dans la coquille	K (mg/g)	mg de K dans la coquille	Na (mg/g)	mg de Na dans la coquille	Ca (mg/g)	mg de Ca dans la coquille
1	0,91	6,48	2,08	14,80	0,35	2,48	0,86	6,08	366,96	2609,05005
2	1,10	6,59	3,16	18,88	0,31	1,82	0,94	5,62	369,94	2208,51195
3	0,88	5,92	3,10	20,85	0,37	2,51	0,87	5,83	363,22	2444,44368
4	1,16	6,81	2,71	15,90	0,36	2,10	1,04	6,10	360,22	2114,517815
5	1,27	7,39	3,67	21,28	0,41	2,35	0,86	5,01	359,87	2087,2373
6	1,16	6,55	3,40	19,24	0,40	2,28	0,84	4,77	366,15	2072,39485
7	0,92	6,09	2,74	18,25	0,46	3,05	0,99	6,58	366,58	2437,75035
8	1,30	8,98	3,67	25,39	0,45	3,12	1,00	6,91	366,92	2539,07256
9	1,05	6,13	2,98	17,36	0,40	2,31	1,10	6,41	362,90	2115,67785
10	1,20	7,09	3,21	18,96	0,44	2,59	1,22	7,23	363,33	2147,283255
11	1,12	7,72	4,11	28,25	0,41	2,80	1,17	8,05	366,25	2519,7656
12	1,02	6,00	3,29	19,31	0,40	2,32	1,26	7,35	364,83	2137,89501
13	1,31	8,08	3,84	23,68	0,49	3,00	1,26	7,80	362,59	2237,14945
14	1,19	7,26	3,17	19,29	0,46	2,78	1,10	6,71	369,32	2245,45344
15	1,01	7,16	2,59	18,32	0,39	2,73	0,94	6,62	369,89	2611,40575
16	1,21	7,16	3,32	19,65	0,40	2,37	1,00	5,93	364,28	2156,51984
17	0,98	6,71	2,03	13,90	0,37	2,56	0,91	6,23	366,78	2508,75468
18	0,96	6,45	2,59	17,44	0,45	3,02	1,00	6,71	365,35	2462,459
19	1,05	6,56	2,81	17,51	0,47	2,90	0,95	5,92	363,79	2266,396125
20	1,17	6,69	3,08	17,68	0,43	2,45	1,12	6,40	369,29	2119,70451
21	1,30	7,76	3,00	17,85	0,51	3,02	1,10	6,57	383,52	2281,941025
22	0,91	6,05	4,05	26,89	0,50	3,31	1,06	7,06	376,71	2501,36768
23	1,26	8,94	3,52	25,08	0,46	3,28	0,95	6,79	384,96	2740,933
24	0,85	5,00	3,02	17,71	0,42	2,46	1,13	6,60	365,90	2144,16521
25	1,06	7,14	2,59	17,44	0,38	2,59	0,96	6,44	347,35	2341,1053
26	0,95	6,09	3,03	19,37	0,45	2,88	0,99	6,34	351,75	2251,2
27	0,89	5,42	3,34	20,31	0,44	2,65	1,06	6,45	350,81	2132,94
28	1,14	6,88	3,56	21,46	0,42	2,55	0,96	5,81	346,80	2091,194955
29	0,89	5,50	2,59	15,98	0,43	2,62	0,98	6,04	345,76	2129,90008
30	0,89	5,85	3,14	20,57	0,47	3,06	0,91	5,96	357,35	2340,645775
31	0,95	6,32	2,69	17,84	0,35	2,32	0,98	6,52	368,72	2444,62686
32	1,04	5,63	2,83	15,33	0,46	2,51	1,08	5,86	364,22	1970,416675
33	1,11	6,34	2,99	17,08	0,49	2,82	1,14	6,53	358,85	2049,019225
34	0,98	5,77	3,18	18,73	0,42	2,46	1,09	6,41	363,90	2143,34155
35	1,02	5,31	3,31	17,15	0,41	2,13	1,07	5,57	354,43	1839,47613
36	1,05	7,01	2,91	19,43	0,39	2,61	0,98	6,51	363,39	2423,82464
37	1,22	7,03	3,00	17,35	0,40	2,31	0,91	5,25	364,61	2107,42268
38	1,10	7,32	4,07	27,12	0,44	2,94	1,15	7,64	357,22	2382,674075
39	1,29	7,69	3,48	20,76	0,36	2,14	1,10	6,58	363,23	2168,486085
40	1,05	6,62	3,22	20,35	0,45	2,83	1,02	6,44	363,78	2299,11172
41	1,64	9,35	4,02	22,88	0,39	2,24	0,96	5,49	359,04	2042,951825
42	1,07	6,19	2,29	13,28	0,37	2,17	1,08	6,27	360,46	2094,252265
43	1,00	5,85	2,95	17,24	0,40	2,35	1,21	7,04	360,38	2104,6192
44	1,29	7,74	2,86	17,14	0,43	2,59	1,12	6,73	359,07	2150,826305
45	0,89	6,05	2,43	16,48	0,44	3,00	0,90	6,12	393,90	2666,70977
46	1,08	6,60	2,46	15,05	0,40	2,47	0,95	5,84	353,98	2166,34536
47	1,15	6,57	2,66	15,20	0,50	2,86	0,98	5,61	364,42	2080,823925
48	1,15	6,79	2,96	17,46	0,37	2,18	0,92	5,42	373,08	2197,41175
49	1,01	6,06	2,38	14,36	0,39	2,33	1,01	6,07	371,26	2238,67971
50	0,99	6,20	2,79	17,49	0,40	2,52	1,03	6,47	368,69	2308,01818
51	0,98	5,81	2,81	16,66	0,41	2,42	1,07	6,32	357,92	2118,89824
52	1,09	6,01	2,64	14,49	0,49	2,68	1,10	6,04	354,29	1945,03563
53	1,04	5,91	3,48	19,82	0,42	2,39	0,91	5,16	359,89	2047,7741
54	0,90	5,30	2,90	17,14	0,43	2,54	0,97	5,74	356,40	2106,32991
55	1,21	6,52	3,48	18,71	0,45	2,42	0,82	4,39	353,95	1904,24562
56	1,22	7,26	2,91	17,34	0,43	2,57	0,89	5,27	354,47	2109,111375
57	0,95	6,27	2,19	14,51	0,37	2,47	0,87	5,75	357,82	2368,78164
58	0,91	5,57	3,08	18,95	0,49	2,99	0,87	5,34	350,62	2156,31915
59	1,13	7,92	3,28	22,89	0,47	3,28	0,92	6,42	353,34	2466,32716
60	1,00	5,82	3,01	17,53	0,47	2,75	1,05	6,15	351,26	2047,82831

## Annexe 6 : Dosage de différents minéraux dans le liquide allantoïque des 60 échantillons

N° échantillon	P (mg/g)	mg de P dans LC lyophilisé	Mg (mg/g)	mg de Mg dans LC lyophilisé	K (mg/g)	mg de K dans LC lyophilisé	Na (mg/g)	mg de Na dans LC lyophilisé	Ca (mg/g)	mg de Ca dans LC lyophilisé
1	12,482	0,349496	4,05	0,1134	91,051	2,549428	317,639	8,893892	11,942	0,334376
2	6,858	0,288036	3,879	0,162918	7,43	0,31206	202,056	8,486352	6,554	0,275268
3	14,545	0,55271	5,069	0,192622	34,05	1,2939	304,77	11,58126	3,893	0,147934
4	10,715	0,289305	6,192	0,167184	50,581	1,365687	284,402	7,678854	10,827	0,292329
5	7,706	0,131002	7,685	0,130645	49,542	0,842214	426,806	7,255702	14,02	0,23834
6	11,376	0,125136	12,786	0,140646	83,981	0,923791	614,988	6,764868	22,871	0,251581
7	10,158	0,314898	6,307	0,195517	43,831	1,358761	278,889	8,645559	8,48	0,26288
8	9,236	0,193956	8,606	0,180726	42,439	0,891219	418,69	8,79249	5,041	0,105861
9	15,755	0,25208	8,086	0,129376	19,457	0,311312	446,198	7,139168	13,88	0,22208
10	1,79	0,33115	1,09	0,20165	6,123	1,132755	54,588	10,09878	0,881	0,162985
11	7,941	0,31764	6,566	0,26264	17,306	0,69224	235,053	9,40212	5,32	0,2128
12	7,813	0,242203	4,633	0,143623	43,165	1,338115	215,992	6,695752	4,114	0,127534
13	4,793	0,162962	7,339	0,249526	27,71	0,94214	227,692	7,741528	11,154	0,379236
14	5,761	0,207396	4,512	0,162432	22,95	0,8262	288,543	10,387548	9,701	0,349236
15	7,905	0,213435	4,198	0,113346	26,773	0,722871	287,13	7,75251	6,912	0,186624
16	13,97	0,23749	10,096	0,171632	165,017	2,805289	501,96	8,53332	11,486	0,195262
17	5,377	0,177441	3,651	0,120483	35,406	1,168398	255,184	8,421072	12,807	0,422631
18	6,894	0,193032	4,99	0,13972	45,67	1,27876	303,222	8,490216	8,96	0,25088
19	9,064	0,172216	6,674	0,126806	6,722	0,127718	369,468	7,019892	11,876	0,225644
20	13,577	0,217232	8,712	0,139392	66,954	1,071264	353,368	5,653888	18,074	0,289184
21	13,059	0,26118	9,163	0,18326	15,796	0,31592	437,283	8,74566	11,819	0,23638
22	6,997	0,251892	6,42	0,23112	15,6	0,5616	238,688	8,592768	8,386	0,301896
23	4,156	0,203644	4,303	0,210847	27,133	1,329517	216,438	10,605462	5,957	0,291893
24	6,086	0,219096	4,976	0,179136	33,662	1,211832	205,61	7,40196	11,955	0,43038
25	11,897	0,249837	6,25	0,13125	35,499	0,745479	385,702	8,099742	13,023	0,273483
26	10,547	0,242581	7,644	0,175812	53,544	1,231512	433,067	9,960541	10,649	0,244927
27	11,878	0,29695	7,472	0,1868	36,126	0,90315	304,373	7,609325	4,668	0,1167
28	12,142	0,267124	7,516	0,165352	19,847	0,436634	334,252	7,353544	15,863	0,348986
29	11,679	0,221901	5,433	0,103227	21,182	0,402458	470,319	8,936061	9,013	0,171247
30	26,193	0,314316	12,13	0,14556	57,417	0,689004	601,412	7,216944	7,066	0,084792
31	5,125	0,1798875	2,955	0,1037205	27,661	0,9709011	48,276	1,6944876	1,241	0,0435591
32	13,473	0,40419	10,161	0,30483	79,097	2,37291	176,792	5,30376	7,022	0,21066
33	15,152	0,53032	10,758	0,37653	117,166	4,10081	139,82	4,8937	3,054	0,10689
34	2,833	0,059493	1,237	0,025977	49,215	1,033515	24,706	0,518826	0,476	0,009996
35	7,657	0,298623	10,918	0,425802	90,363	3,524157	104,603	4,079517	5,456	0,212784
36	76,541	0,306164	53,738	0,214952	463,695	1,85478	824,394	3,297576	58,818	0,235272
37	14,154	0,268926	8,825	0,167675	85,397	1,622543	218,281	4,147339	4,786	0,090934
38	9,691	0,19382	12,379	0,24758	126,252	2,52504	192,246	3,84492	10,647	0,21294
39	6,44	0,14812	10,57	0,24311	80,599	1,853777	291,617	6,707191	13,859	0,318757
40	48,235	0,241175	71,731	0,358655	247,758	1,23879	918,724	4,59362	80,229	0,401145
41	67,974	0,271896	27,23	0,10892	649,18	2,59672	224,77	0,89908	10,401	0,041604
42	12,855	0,192825	11,345	0,170175	298,716	4,48074	208,847	3,132705	15,721	0,235815
43	384,351	0,384351	124,185	0,124185	2455,691	2,455691	1917,717	1,917717	22,256	0,022256
44	13,017	0,195255	21,396	0,32094	236,467	3,547005	110,097	1,651455	13,149	0,197235
45	34,232	0,581944	13,07	0,22219	213,648	3,632016	135,625	2,305625	5,506	0,093602
46	8,376	0,25128	11,146	0,33438	120,382	3,61146	76,271	2,28813	12,148	0,36444
47	6,339	0,266238	7,273	0,305466	94,81	3,98202	102,057	4,286394	3,416	0,143472
48	10,32	0,16512	13,069	0,209104	138,745	2,21992	260,021	4,160336	10,679	0,170864
49	10,809	0,659349	5,03	0,30683	77,151	4,706211	90,881	5,543741	6,761	0,412421
50	14,494	0,478302	6,033	0,199089	127,527	4,208391	65,138	2,149554	1,344	0,044352
51	4,387	0,188641	8,159	0,350837	92,276	3,967868	120,227	5,169761	4,773	0,205239
52	26,558	0,982646	7,558	0,279646	66,821	2,472377	136,878	5,064486	1,61	0,05957
53	5,112	0,2556	10,246	0,5123	71,1	3,555	56,641	2,83205	4,349	0,21745
54	14,492	0,666632	7,419	0,341274	82,131	3,778026	35,58	1,63668	4,051	0,186346
55	0,491	0,015221	0,396	0,012276	54,666	1,694646	161,542	5,007802	9,857	0,305567
56	12,796	0,588616	4,566	0,210036	70,616	3,248336	116,512	5,359552	5,176	0,238096
57	89,388	0,357552	49,366	0,197464	1122,95	4,4918	461,996	1,847984	156,376	0,625504
58	21,616	0,410704	6,835	0,129865	151,203	2,872857	88,303	1,677757	1,825	0,034675
59	15,623	0,296837	7,721	0,146699	55,596	1,056324	57,234	1,087446	1,283	0,024377
60	15,085	0,75425	5,784	0,2892	83,204	4,1602	143,131	7,15655	2,686	0,1343

**Annexe 7: Résumé accepté pour un poster à présenter pour le “Combined Workshop of Fundamental Physiology and Perinatal Development in Poultry and Incubation and Fertility Research Group”**

*Combined IFRG-PDP workshop  
<http://wpsa.fr/manifestations/ifrg-pdp>*

**From eggshell decalcification to skeleton mineralization of chicken embryos during incubation**

M. Crepeau<sup>1</sup>, N. Bernardet<sup>1</sup>, N. Mème<sup>1</sup>, A. Narcy<sup>1</sup>, M. Hincke<sup>2,3</sup>, S. Réhault-Godbert<sup>1</sup>

<sup>1</sup>BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

<sup>2</sup>Department of Innovation in Medical Education, University of Ottawa, Canada

<sup>3</sup>Le Studium Research Professor

In oviparous species, the egg contains protective systems and provides energy and nutrients that support the development of the embryo until hatching. The calcification of the chicken skeleton relies on two main mineral sources: the yolk during the first half of incubation, and the eggshell, thereafter. The mineral/calcium transport from the eggshell to the embryo is achieved by the chorioallantoic membrane (CAM), which develops in close contact with the inner eggshell from day 5 of incubation onwards. However, the molecular actors associated with the function of this extra-embryonic membrane are still poorly characterized. The objective of this study is to obtain basic data to decipher the role of the CAM in the mobilization of eggshell minerals and in subsequent mineralization of the embryonic skeleton.

Sixty eggs (64.1±1.8g) from Rhodes Island laying hens were incubated for 12 or 16 days. At each stage, egg weight as well as various eggshell quality parameters were measured. Eggshell strength, weight and thickness all decreased during incubation, which validates the model. Currently, we are analyzing eggshells for changes in their mineral content (calcium, potassium, phosphorus, etc.) and have stained bones and cartilage of each embryo to monitor the kinetics of skeleton mineralization. We also collected the CAM to study the expression of mineral transporter genes. Data collection and statistical analyses of the results are in progress in order to assess stage-dependent changes.

We believe that this study will provide insight into the role of the CAM in mineral metabolism during chicken embryonic development, and help to identify molecular markers to explain post-hatch dysfunctions linked to impairment of bone integrity/structure in certain chicken strains. Considering that intensive genetic selection of broiler breeders and laying hens for specific performance traits (meat and egg production) has resulted in considerable differences in growth and in chicken intrinsic metabolism, we hypothesize that the kinetics of bone mineralization during embryonic development will exhibit strain-dependent differences. To further test this hypothesis, next studies will evaluate fast-growing, and slow growing broiler strains to compare molecular and phenotypic traits associated with mineral metabolism with those of Rhodes Island laying hens.

## Résumé

---

Chez les ovipares, l'embryon se développe de façon autonome en puisant son énergie et les nutriments dans l'œuf. Environ 80% du calcium présent dans le squelette de l'embryon provient de la coquille. Cette assimilation des minéraux de la coquille et leur transfert vers l'embryon sont assurés par la membrane chorioallantoïque (CAM), une structure extra-embryonnaire très vascularisée. L'une des couches de la CAM, l'épithélium chorionique, adhère à la membrane coquillière pour solubiliser localement la coquille via un mécanisme complexe impliquant des pompes à protons, et exprimer des protéines permettant de lier puis transporter les minéraux vers les vaisseaux sanguins de la CAM puis vers l'embryon. Cependant les mécanismes biochimiques et moléculaires impliqués dans cette fonction restent méconnus.

Au cours de ce stage, à l'aide de différentes mesures réalisées sur 2 lots de 30 œufs de poules pondeuses au temps ED12 et ED16 de l'incubation, nous avons pu montrer qu'à ED12, le poids de coquille est plus important, la coquille est plus épaisse et plus résistante à la rupture qu'à ED16. La qualité de la coquille semble donc s'être dégradée au cours de l'incubation, ce qui valide le modèle. Nous avons également démontré que cette perte de coquille s'accompagne d'une diminution significative de sa quantité de calcium, magnésium et potassium. En parallèle, nous avons mis au point une méthode de coloration sur les embryons pour observer la cinétique de minéralisation du squelette. Ce travail sera complété par l'étude de l'expression des gènes de transporteurs minéraux dans la CAM et devrait permettre d'obtenir des résultats nouveaux sur la cinétique d'assimilation des minéraux par l'embryon au cours de son développement et de la minéralisation de son squelette.

**Mots clef : œuf, embryon, coquille, squelette, membrane chorioallantoïque, minéraux**