



HAL
open science

Etude de la minéralisation du squelette au cours du développement de l'embryon d'oiseau (*Gallus gallus*)

Célia Rousset, Maëva Halgrain, Sophie Réhault-Godbert

► **To cite this version:**

Célia Rousset, Maëva Halgrain, Sophie Réhault-Godbert. Etude de la minéralisation du squelette au cours du développement de l'embryon d'oiseau (*Gallus gallus*). [Stage] INRAE. 2021. hal-03248658

HAL Id: hal-03248658

<https://hal.inrae.fr/hal-03248658>

Submitted on 3 Jun 2021

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.

UNIVERSITE DE TOURS

Faculté des Sciences et Techniques

MASTER 1 - MENTION BIOLOGIE-SANTE

Parcours Biologie de la reproduction

Mémoire de stage de Master 1 Biologie-Santé

Mémoire présenté par : Célia Rousset

Le 2 juin 2021

**Titre : « Etude de la minéralisation du squelette au cours du développement de l'embryon
d'oiseau (*Gallus gallus*) »**

Travail réalisé sous la responsabilité de « Madame Réhault-Godbert Sophie » et encadré par

« Madame Halgrain Maeva »

« INRAE, UMR Biologie des Oiseaux et Aviculture (BOA), équipe « Défenses de l'Œuf,
Valorisation et Evolution (DOVE) »

Remerciements

En tout premier lieu, je remercie Sophie Réhault-Godbert, ma responsable de stage, pour son accueil, sa confiance et sa gentillesse.

Je tiens également à remercier Maeva Halgrain pour son temps, sa patience, sa confiance à me laisser utiliser ses échantillons de thèse et, surtout, d'avoir aussi bien disséqué les bréchets.

Merci à toutes les deux pour votre aide dans l'écriture de ce rapport.

Merci à Joël Gautron de s'être arrangé, avec Sophie Réhault-Godbert, pour me laisser un bureau à disposition et ainsi pouvoir être présente au laboratoire tout au long de ces 6 semaines de stage, malgré le contexte de crise sanitaire.

Je souhaite également remercier Christophe Praud de l'équipe « Métabolisme de Oiseaux, Qualité et Adaptation » qui a consacré la majorité de son temps au laboratoire pour effectuer les belles images microscopiques.

Je remercie Nelly Bernardet pour ses conseils en biologie moléculaire et Laura Caillaud pour la réalisation des gels de PCR et sa bonne humeur.

Enfin, je remercie toute l'équipe BOA pour son accueil chaleureux. Je suis reconnaissante du temps que chacun m'a consacré, cela n'a fait qu'enrichir mon apprentissage pendant ce stage.

Table des matières

I. Introduction générale et contexte scientifique	1
II. Matériel et Méthodes	5
A. Analyse de la cinétique de minéralisation du squelette de l'embryon à partir d'embryons colorés au bleu alcian et rouge alizarine.....	5
1. Obtention des échantillons et coloration au bleu alcian et rouge alizarine	5
2. Visualisation et mesure des os et du cartilage	6
B. Etude de l'expression de candidats susceptibles d'être impliqués dans la minéralisation du squelette de l'embryon dans la CAM.....	6
1. Prélèvement et préparation des échantillons.....	6
2. RT- PCR.....	9
3. Gel d'agarose et visualisation des résultats	11
III. Résultats-Discussion	11
A. Analyse des embryons.....	11
B. Etude de l'expression des candidats.....	15
1. Contrôle de l'efficacité des RT	15
2. Gènes candidats	16
IV. Conclusion	19
V. Perspectives	20

Abréviations

AD = Aile droite

AG = Aile gauche

ADN = Acide désoxyribonucléique

ADNc = Acide désoxyribonucléique complémentaire

ARN = Acide ribonucléique

ATP6V0A4 = ATPase H⁺ transporting V0 subunit a4

CA2 = Carbonic Anhydrase 2

CAB39L = Calcium Binding Protein 39 Like

CAM = Membrane chorioallantoïque

CASR = Calcium Sensing Receptor

dNTP = désoxyribonucléoside triphosphate

DTT= dithiothreitol

ED = Jour d'incubation

Ig = Immunoglobuline

LOC776719 / ATP6V1AL = H⁺ transporting two-sector ATPase

MGP = Matrix Gla Protein

Pb : paire de bases

PCR = Polymerase Chain Reaction

PD = Patte droite

PG = Patte gauche

Qsp = Quantité suffisante pour

RT = Reverse Transcription (transcription inverse)

S100A14 = S100 calcium binding protein A14

TGM4 = Transglutaminase 4

I. Introduction générale et contexte scientifique

Les oiseaux sont ovipares, c'est-à-dire que l'embryon se développe au sein d'un œuf, en dehors du corps de la mère. De ce fait, le développement embryonnaire se déroule de façon autonome, en s'appuyant sur les réserves disponibles dans l'œuf.

Dans le but d'assurer le développement de l'embryon et la robustesse du futur poussin, des structures inertes (déposées par la mère au cours de la formation de l'œuf) et extra-embryonnaires (structures cellulaires) sont mises en place au sein de l'œuf. Lors de la ponte (ED0), ce dernier se compose de quatre structures inertes (Figure 1) : le jaune qui représente 24 à 27 % du poids de l'œuf, l'albumen (63 à 65% de l'œuf), les membranes protéiques et la coquille (environ 10% du poids de l'œuf) (Lordelo et al., 2017). Ces structures d'origine maternelle constituent des sources d'eau, de nutriments et d'énergie et agissent également comme structures protectrices.

Outre ces structures primaires, des structures cellulaires se mettent en place au cours du développement embryonnaire (Figure 1). Il s'agit du sac amniotique qui, dans la première moitié de l'incubation, protège l'embryon des chocs mécaniques, de la déshydratation et des infections bactériennes, et dans un second temps, constitue une source de protéines pour la croissance embryonnaire. Il y a également le sac allantoïque qui concentre les déchets métaboliques de l'embryon et enfin le sac vitellin, qui englobe le jaune, et qui se met en place dès les premières 48h à partir de l'intestin postérieur. Très vascularisé, il a pour rôle le transfert des nutriments et des immunoglobulines (Ig) du jaune vers l'embryon *via* la circulation sanguine. Ces structures sont d'origine embryonnaire et assurent des fonctions vitales telles que la digestion, la respiration ou encore la protection contre les pressions microbiennes et environnementales (température, déshydratation, chocs...).

L'œuf possède donc tous les éléments requis pour accompagner le développement embryonnaire, qui dure 21 jours chez l'espèce *Gallus gallus*.

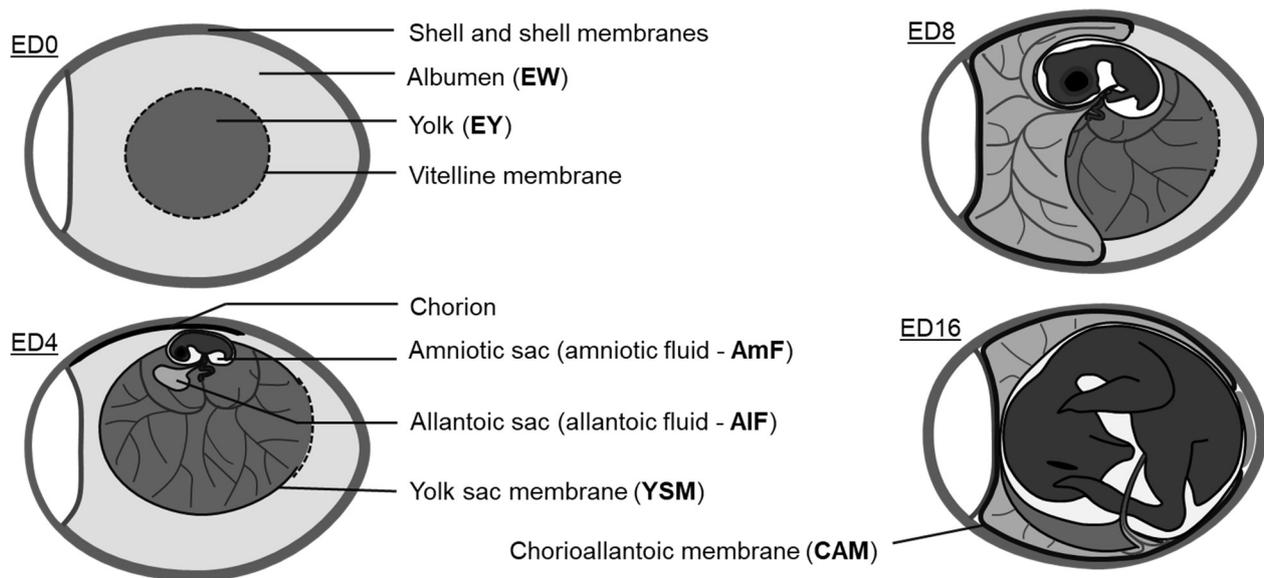


Figure 1: Représentation schématique de la formation et de l'évolution des structures extra-embryonnaires de l'œuf de poule du jour 0 au jour 16 (ED0-16) (Da Silva et al., 2017).

Pour ce projet, nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement au développement du squelette de l'embryon.

L'essentiel du squelette de l'oiseau est initialement cartilagineux et se minéralise progressivement, à partir de la deuxième moitié du développement embryonnaire (Bellairs and Osmond, 2014). La minéralisation et le développement osseux de *Gallus gallus* débute au cours du développement précoce de l'embryon et nécessite la présence de plusieurs minéraux tels que le calcium, le phosphore ou encore le manganèse. Ces minéraux sont répartis dans le jaune et la coquille de l'œuf.

Le jaune est la source principale de minéraux et en particulier de phosphore dans la première moitié de l'incubation. Ce phosphore (0,37 mg/g d'œuf) est sous forme liée à la phosvitine, qui est une protéine à l'origine de la majorité du phosphore nécessaire à la mise en place du squelette (Torres and Korver, 2018). Au jour 9 de l'incubation (ED9), il y a une augmentation du processus de déphosphorylation de cette protéine qui entraîne l'augmentation de la teneur en phosphate de l'embryon (Torres and Korver, 2018). Le jaune contient également des oligoéléments tel que le manganèse qui est un cofacteur de polymérase et de galactotransférase qui sont des enzymes impliquées dans la synthèse de sulfate de mucopolysaccharide de chondroïtine, un composant majeur du cartilage. Le manganèse a donc un rôle important dans la formation du cartilage osseux. Le zinc, lui, est un cofacteur de la collagénase et de la phosphatase alcaline de l'os. Il intervient dans le

développement osseux (Yair and Uni, 2011). Le dernier oligoélément du jaune est le cuivre. Il joue un rôle dans la réticulation du collagène et de l'élastine, et donc dans la solidité à la traction et l'élasticité de l'os (Yair and Uni, 2011).

Lors de la deuxième moitié de l'incubation, c'est la coquille qui constitue la source majoritaire de minéraux, en particulier de calcium. Sa solubilisation et son transport sont assurés grâce à la mise en place de la membrane chorioallantoïque (CAM) au 5^{ème} jour d'incubation (Marshall et al., 2020). La membrane chorioallantoïque résulte de la fusion du mésoderme somatique du chorion avec le mésoderme splanchnique de l'allantoïde (DeFouw et al., 1989). Cette structure extrêmement vascularisée est impliquée en outre dans le transport d'oxygène qui diffuse à travers les pores de la coquille, afin de satisfaire les besoins croissants en oxygène de l'embryon (Rizzo et al., 1995). La CAM joue également un rôle important au cours du développement embryonnaire dans l'équilibre acido-basique de l'embryon ou encore la réabsorption d'eau et d'électrolytes de la cavité allantoïque (Figure 1) (Gabrielli and Accili, 2010). Elle se développe très rapidement de ED5 à ED8 et entame une différenciation cellulaire à partir de ED11 pour atteindre sa pleine maturité fonctionnelle vers ED15 (Marshall et al., 2020). Vers ED17, cette structure commence à régresser et dégénère (Makanya et al., 2016).

La CAM est constituée de trois couches bien distinctes (Figure 2). Il y a, premièrement, l'épithélium chorionique d'origine ectodermique qui est en contact avec les membranes coquillières. L'épithélium chorionique mature est caractérisé par la présence de cellules de la cavité villositaire qui se différencient à ED12, et de cellules de recouvrement capillaire qui sont matures à ED14. Il y a ensuite une couche intermédiaire de mésoderme qui constitue le site du développement précoce du système vasculaire extra-embryonnaire. Enfin, au plus proche de l'embryon, se trouve l'épithélium allantoïque d'origine endodermique qui se compose de cellules basales, de cellules riches en granules et de cellules riches en mitochondries (Gabrielli et al., 2001; Gabrielli and Accili, 2010) et qui assure la réabsorption des minéraux et métabolites à partir du liquide allantoïque.

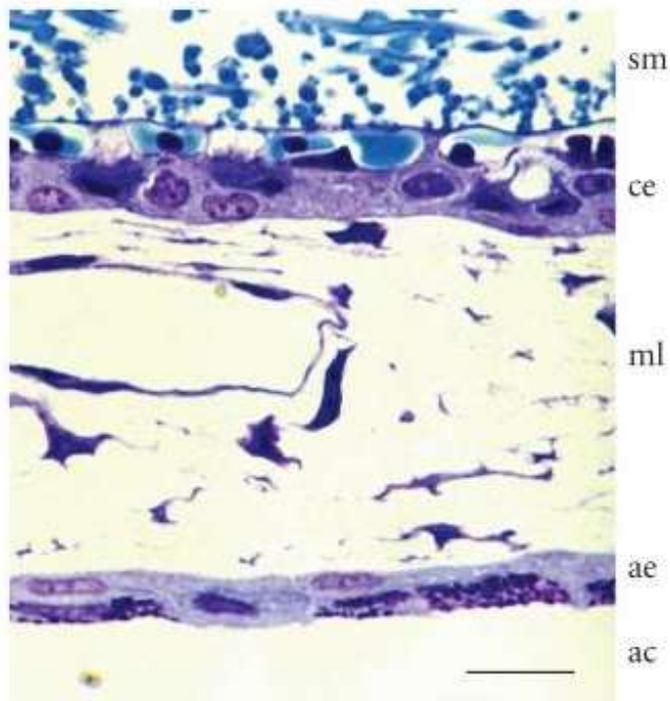


Figure 2 : Histologie par coloration au bleu de toluidine de la CAM mature d'embryon de *Gallus gallus* : ce = épithélium chorionique ; sm = membrane coquillière ; ml = mésoderme intermédiaire ; ae = épithélium allantoïque ; ac = cavité allantoïque. Echelle : 8 μm (Gabrielli and Accili, 2010).

Le transport du calcium au travers de la CAM est un processus actif et unidirectionnel régulé par la vitamine D. Le calcium de la coquille est libéré par les cellules de la cavité villositaire qui expriment l'anhydrase carbonique et d'autres enzymes qui catalysent l'hydratation du dioxyde de carbone métabolique et la déshydratation du bicarbonate pendant la régulation acido-basique (Gabrielli and Accili, 2010). Cela induit la solubilisation de la calcite (polymorphe de carbonate de calcium) de la coquille en ions calcium qui sont transportés jusqu'à l'embryon. Les mécanismes moléculaires impliqués dans le transfert du calcium de la coquille au squelette de l'embryon restent méconnus.

Les objectifs de ce stage étaient, dans un premier temps, d'étudier la cinétique de la minéralisation du squelette au cours du développement embryonnaire de *Gallus gallus*, de part des observations d'os d'embryons issus d'une souche de poules et de coqs sélectionnés sur la croissance musculaire (souche standard « chair » à croissance rapide), à l'aide d'un microscope automatisé à épifluorescence. Ces embryons avaient été préalablement colorés au bleu alcian (cartilages) et rouge alizarine (structures

minéralisées). Les squelettes d'embryons colorés à deux stades de développement ont été analysés puis comparés : les stades ED11 et ED15. Les deux stades choisis sont en accord avec le développement/la maturation de la CAM compte-tenu de son implication dans la minéralisation osseuse (le stade ED11 durant lequel la CAM continue sa mise en place et le stade ED15, où la CAM a atteint sa pleine maturité cellulaire et fonctionnelle).

Dans un second temps, il s'agissait d'analyser l'expression de gènes candidats susceptibles d'être impliqués dans la minéralisation du squelette de l'embryon dans la CAM. Pour cela, 20 échantillons de CAM prélevés sur des embryons de mêmes stades que ceux utilisés pour l'observation de la minéralisation, ont été étudiés. Pour ces deux études, le sexe des embryons n'a pas été pris en compte mais les analyses ont été faites avec un sex-ratio équilibré.

II. Matériel et Méthodes

A. Analyse de la cinétique de minéralisation du squelette de l'embryon à partir d'embryons colorés au bleu alcian et rouge alizarine

1. Obtention des échantillons et coloration au bleu alcian et rouge alizarine

Cette étape a été réalisée avant mon arrivée au laboratoire. Une centaine d'œufs fertilisés de poulet de souche « chair » Ross 308, ont été stockés 3 jours à 16 °C et 85% d'humidité relative puis incubés en conditions standard (37,8°C, 45% d'humidité relative avec un retournement toutes les heures) pendant 11 et 15 jours, à l'unité expérimentale Pôle Expérimental Avicole de Tours (INRAE, PEAT, Centre Val de Loire, DOI : 10.15454/1.5572326250887292E12). À ces deux stades, les œufs ont été ouverts du côté de la chambre à air puis vidés dans une boîte de Pétri et une incision au niveau de la trachée a été effectuée afin de sacrifier l'embryon.

Le traitement des embryons et les étapes de coloration ont été réalisés selon le protocole de coloration 0083-MO-0212 rédigé par N. Bernardet (Equipe DOVE, INRAE). Ainsi, les embryons ont été échaudés dans de l'eau chaude (65 °C- 70 °C) pendant 30 sec à 1 min en fonction de l'âge, puis plongés dans de l'éthanol 95% pendant 1 min afin d'éliminer plus facilement les plumes, la graisse et la peau au moment de la dissection. Les organes et les viscères ont été retirés pour faciliter, dans un second temps, la coloration des squelettes. Dans le but de visualiser la forme, la taille et l'état de minéralisation du squelette, des colorations au bleu alcian, permettant de marquer les protéoglycanes des

cartilages, et au rouge alizarine, permettant de marquer les parties minéralisées, ont été réalisées. Les embryons ont tout d'abord été placés une nuit dans une solution d'éthanol à 95% afin de fixer les structures cellulaires et tissulaires puis dans de l'acétone afin de solubiliser les graisses. Par la suite, les embryons ont été colorés pendant 24 h au bleu alcian 0,1 g/L dans le but de visualiser les cartilages. L'excès de colorant a été éliminé par des lavages successifs dans des bains d'éthanol 70% pendant 6 à 8 h. Afin de permettre une meilleure visualisation du squelette, les tissus mous ont été transparisés à l'aide d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) 1% pendant une nuit. Puis, une contre-coloration au rouge alizarine 0,01 g/L a été effectuée sur une nuit. Il s'agit d'un colorant anionique qui se lie au calcium et permet donc le marquage des structures minéralisées. L'excès de colorant a été éliminé par des lavages avec une solution de KOH 1% glycérol 20% pendant 2 jours. Les embryons colorés ont ensuite été placés dans du glycérol/éthanol (1:1) et conservés à 4 °C.

2. Visualisation et mesure des os et du cartilage

Les squelettes des embryons ainsi préparés ont été observés à l'aide du microscope inversé, à épifluorescence et automatisé « Nikon eclipse Ti2 E » (Nikon, Pays-Bas) afin d'obtenir des images en couleur par la lumière blanche, en Texas Red par épi-fluorescence et en noir et blanc. Ce microscope est piloté par le logiciel NIS Elements (version 5.30.01, Nikon, Pays-Bas). L'équipement disponible ne nous a pas permis de visualiser les embryons dans leur entier. Ainsi, les membres du squelette ont été séparés du tronc et observés individuellement. Afin de permettre une bonne visualisation des os et du cartilage, les échantillons du stade ED11 ont été placés dans un puits d'une plaque 6 puits contenant 2 mL d'une solution éthanol/glycérol 1:1. Les échantillons du stade ED15, quant à eux, ont été mis dans une plaque non compartimentée avec 20 ml de solution éthanol/glycérol 1:1. Les images fournies par le microscope ont ensuite été analysées avec le logiciel Image J (National Institutes of Health, 1987, <https://imagej.nih.gov/ij/>). Nous avons ainsi pu analyser les ailes et les pattes de 4 embryons au stade ED11 et les ailes de 2 embryons au stade ED15.

B. Etude de l'expression de candidats susceptibles d'être impliqués dans la minéralisation du squelette de l'embryon dans la CAM

1. Prélèvement et préparation des échantillons

a) *Prélèvement des ARN*

L'obtention de la CAM des différents œufs à ED11 et ED15 ainsi que l'extraction des ARN de cette structure ont été réalisés antérieurement à mon arrivée. Ces échantillons ont été utilisés pour une analyse transcriptomique dans le cadre de la thèse de M. Halgrain. Lors de l'ouverture des œufs à ED11 et ED15, la partie équatoriale de la CAM a été récupérée, rincée à trois reprises dans du sérum physiologique, séchée rapidement sur du sopalin et placée dans des tubes à vis de 8 ml. Ces tubes ont été plongés immédiatement dans l'azote liquide et placés à -80 °C afin de conserver l'intégrité de la CAM.

Par la suite, la CAM a été broyée afin d'homogénéiser les échantillons et l'ARN a été extrait à l'aide d'un kit RNA-L Macherey-Nagel (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Après un deuxième traitement à la DNase, une PCR contrôle utilisant des amorces situées dans un intron du gène *PKD2* a été faite afin de vérifier l'absence d'ADN génomique. La qualité et la quantité des échantillons ont été déterminées en vue de leur séquençage par RNA Seq (Novogene, Grande-Bretagne) à l'aide d'un nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific, Etats-Unis) et d'un bio-analyseur (Agilent 2100 bioanalyzer, Agilent Technologies, Etats-Unis). Quarante échantillons ont été testés : 10 mâles et 10 femelles de chaque stade (ED11 et ED15). Les données obtenues ont été analysées avec le logiciel R (R Core Team, 2017, Vienne, Autriche) et ont permis de sélectionner des gènes susceptibles d'être impliqués dans la mobilisation des minéraux de la coquille.

b) *Sélection des gènes candidats et séquence des amorces*

Les gènes candidats (Tableau I) sont présents dans la CAM et surexprimés au stade ED15 par rapport à ED11 (d'après les résultats de séquençage obtenus au laboratoire avant mon arrivée). Certains de ces gènes sont susceptibles de lier le calcium, et donc de potentiellement intervenir dans le transport des minéraux de la coquille vers l'embryon ou décrits pour être impliqués dans l'ossification (*CALB39*, *CASR*, *MGP*, *S100A14*, *TGM4*). D'autres gènes peuvent contribuer à acidifier le milieu pour solubiliser la coquille (*ATP6V0A4*, *CA2*, *LOC776719*). Dans le but d'étudier l'expression de ces différents gènes (Tableau I), des amorces spécifiques avaient été conçues à l'aide du site Primerblast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Tableau I). Ces couples d'amorces ont été choisis en fonction de différents critères qui permettront d'envisager ultérieurement des analyses quantitatives d'expression par PCR en temps réel (spécificité pour la séquence génique à amplifier, couple d'amorces situé sur deux exons différents, température d'hybridation, taille du produit de PCR, et faible probabilité à former des dimères d'amorces).

Tableau I : Gènes candidats, résultats RNA Seq et amorces utilisées pour les réactions de PCR : s=amorce sens ; as=amorce anti-sens.

Symbol du gène	Nom de la protéine	Fonction	Localisation cellulaire	Ratio ED15/ED11	Séquence amorce (5'-3')	Tm (°C)	Taille produite de PCR (pb)
ATP6V0A4	ATPase H+ transporting V0 subunit a4	Excretion, ossification, perception sensorielle du son, acidification vacuolaire	Membrane, endosomes, composant de l'intégrité	2.5	s : TTCGTGCCACAGTGATATCCC	60	172
					as : ACCTTGATCTCCCAGGACCA	60	
CA2	carbonic anhydrase 2	Activité arylestérase, carbonate deshydratase et hydrolase; liaison aux ions zinc; transport CO2 ; sécrétion; régulation pH intracellulaire et du transport transmembranaire de dipeptides	Cytoplasme, membrane	7.0	s : ATCGTCAACAACGGGCACTCCTTTC	54	101
					as : TGCACCAACCTGTAGACTCCATCC	54	
CAB39L	calcium binding protein 39 like	Active la protéine sérine/thréonine kinase	Cytosol	2.3	s : GTGGGACCACAGACAAGGAG	60	180
					as : GGCTTCGTGTGCCAATTTGT	60	
CASR	calcium sensing receptor	Importation/Régulation du Ca2+ (homéostasie) ; régulation positive de l'activité ATPase	Cytoplasme, membrane	3.7	s : TCTTTGAGGAGGTTGGGCAC	60	192
					as : AGTCCACACACTCGAAGCAG	60	
LOC779719	V-type proton ATPase catalytic subunit A-like	Liaison à l'ATP; activité ATP synthase et ATPase de transport de protons (mécanisme de rotation)	Membrane plasmique et vacuolaire	5.2	s : ATCCTTCTATAGCGTGCGG	60	159
					as : TCCAGACCCCAAAAACACCTG	60	
MGP	matrix Gla protein	Liaison au calcium ; développement du cartilage , différenciation cellulaire et ossification	Extracellulaire	107	s : GCTATGAGTCCCACGAGAGC	60	158
					as : CCTCTGACGTTCTCTGAGGTG	60	
S100A14	S100 calcium binding protein A14	Liaison aux protéines dépendantes du calcium, aux ions calcium et aux récepteurs de chimokines. Régulation de la chimiotaxie des granulocytes et des monocytes ; réponse aux lipopolysaccharides	Extracellulaire, composant de l'intégrité membranaire, région péri-nucléaire	3.0	s : ATACCTGACCCCAACGAGA	60	155
					as : CATCCCCCATCATGTCCCAG	60	
TGM4	transglutaminase 4	Liaison aux ions métalliques; activité protéines-glutamine gamma-glutamyltransférase. Réticulation peptidique	GlgI, matrice extracellulaire contenant du collagène	197.4	s : AGCCCTGTTCCCTGCTACAAG	60	193
					as : GTGTTGTACGCATCCCGTGTG	60	

c) Dilution des échantillons d'ARN

D'après les résultats du RNA-Seq, certains gènes candidats s'expriment très fortement au niveau de la CAM. De ce fait, dans le but d'éviter d'obtenir un signal saturé par la migration des produits de PCR obtenus par amplification de ces gènes, des dilutions des échantillons d'ARN purs ont été réalisées afin d'obtenir une concentration de solution de travail à 200 ng/μl. Pour chaque stade, 10 échantillons ont été utilisés avec un sex-ratio équilibré afin d'éviter un biais potentiel lié au dimorphisme sexuel (Tableau II).

Tableau II : Echantillons utilisés pour les réactions de PCR

	Femelles	Mâles
ED11	11 ; 26 ; 29 ; 39 ; 41	64 ; 70 ; 79 ; 88 ; 102
ED15	14 ; 16 ; 24 ; 38 ; 44	67 ; 72 ; 76 ; 86 ; 93

2. RT-PCR

a) Reverse transcriptase (RT)

Dans le but d'obtenir l'ADNc permettant d'amplifier la séquence génomique des gènes candidats par PCR, une transcription inverse à partir des échantillons d'ARN à 200 ng/μL a été réalisée.

(1) Préparation du Mix de dénaturation :

Une solution de dénaturation a été préparée avec 500 g/L d'oligoDT, 0,4 nM de dNTP mix, 200 ng/μL d'ARN totaux et de l'eau Dnase et Rnase free qsp 12 μL. A l'aide d'un thermocycleur, ces échantillons ont été chauffés à 65 °C pendant 5 min et ont ensuite été placés dans la glace afin d'éviter une renaturation.

(2) Préparation du Mix de RT :

En parallèle, un mix de RT composé de 5X First Stand buffer, DDT 0,03 M et 1 μL d'eau Dnase et Rnase free a été préparé et 7 μL de ce mix ont été ajoutés dans chaque échantillon qui ont ensuite été mixés délicatement et chauffés à 42 °C pendant 2 min dans le thermocycleur.

Par la suite, 1 μL de SuperScript II Reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) a été ajouté dans chaque échantillon. Puis les échantillons ont de nouveau été placés dans le thermocycleur :

- Synthèse ADNc : 42 °C pendant 50 min
- Arrêt de la synthèse : 70 °C pendant 15 min

- Refroidissement : 15 °C – infini

(3) Dilution des produits obtenus :

Les ADNc ainsi obtenus, ont été dilués au 1/10 et placés à -20 °C. Dans le cas où certains gènes étudiés seraient trop peu exprimés et que nous aurions besoin d'échantillons plus concentrés, 10 µL de chaque ADNc ont été conservés « purs » à -20 °C.

(4) Contrôle des RT :

Un contrôle par PCR avec le gène de ménage *GAPDH* (gène ubiquitaire) a été réalisé dans le but de vérifier l'efficacité des RT. Le protocole de PCR est le même que celui présenté en B.2.b « Polymérase Chain Reaction » (Tableau III). La migration des produits de PCR sur gel d'agarose 2 % en présence de GelRed a été effectuée pendant 45 min à 100 V.

Tableau III : Amorces utilisées pour le contrôle des RT.

Gène	Amorce	Séquence (5'-3')	Tm (°C)	Taille produit de PCR (pb)
<i>GAPDH</i>	Sens	AGGCGAGATGGTCAAAGTCGGAGT	54	176
	Anti-sens	TGCCCTTGAAGTGTCCGTGTGT	52	

b) Polymérase Chain Reaction (PCR)

La PCR a été réalisée sur deux pools d'échantillons correspondant aux stades ED11 (échantillons 11, 26, 29, 39, 41, 64, 70, 79, 88, 102, Tableau II) et ED15 (échantillons 14, 16, 24, 38, 44, 67, 72, 76, 86, 93, Tableau II). Ces pools d'échantillons d'ADNc obtenus par transcription inverse des ARN totaux, ont été amplifiés par PCR. Pour ce faire, une solution de mix contenant 2X de Dream Taq PCR Master Mix (Thermofisher, Waltham, Massachusetts, États-Unis), 0,5 µM de chaque amorces (sens et anti-sens) spécifiques des différents gènes étudiés (Tableau I) et de l'eau milliQ stérile qsp 24 µL a été préparée. Puis, 1 µL de solution de chaque pools d'ADNc (pool d'échantillons ED11 ou pool d'échantillon ED15) a été ajouté au 24 µL de mix. Le tout a été placé dans le thermocycleur :

- 1 cycle de 3 min à 95 °C
- 40 cycles :
 - 30 sec à 95 °C
 - 30 sec à 60 °C
 - 30 sec à 72 °C
- 1 cycle de 15 min à 72 °C
- 1 cycle à 15 °C

3. Gel d'agarose et visualisation des résultats

Pour chaque gène candidat testé, un gel d'agarose à 2% a été préparé avec du tampon TAE 1X et du gel Red (agent intercalant de l'ADN) à raison de 1 µL pour 80 mL de gel, et 5 µL des produits de PCR ont été déposés. Le marqueur de taille utilisé est le Trackit 100 pb (Thermofisher, Waltham, Massachusetts, États-Unis). La migration a été faite pendant 35 min à 100 V. La révélation des gels a été réalisée à l'aide du lecteur Ultra-Violet BIO-PRINTCX4 Edge (Vilber, Marne-la-Vallée, France).

III. Résultats-Discussion

A. Analyse des embryons

L'analyse de la minéralisation des os longs de l'embryon de poulet, qui sont les premiers à se minéraliser, a été réalisée à partir d'images microscopiques d'embryons colorés au bleu alcian et au rouge alizarine aux stades ED11 et ED15. Les os des ailes et des pattes ont été étudiés pour le stade ED11. Seules les ailes ont été étudiées pour ED15.

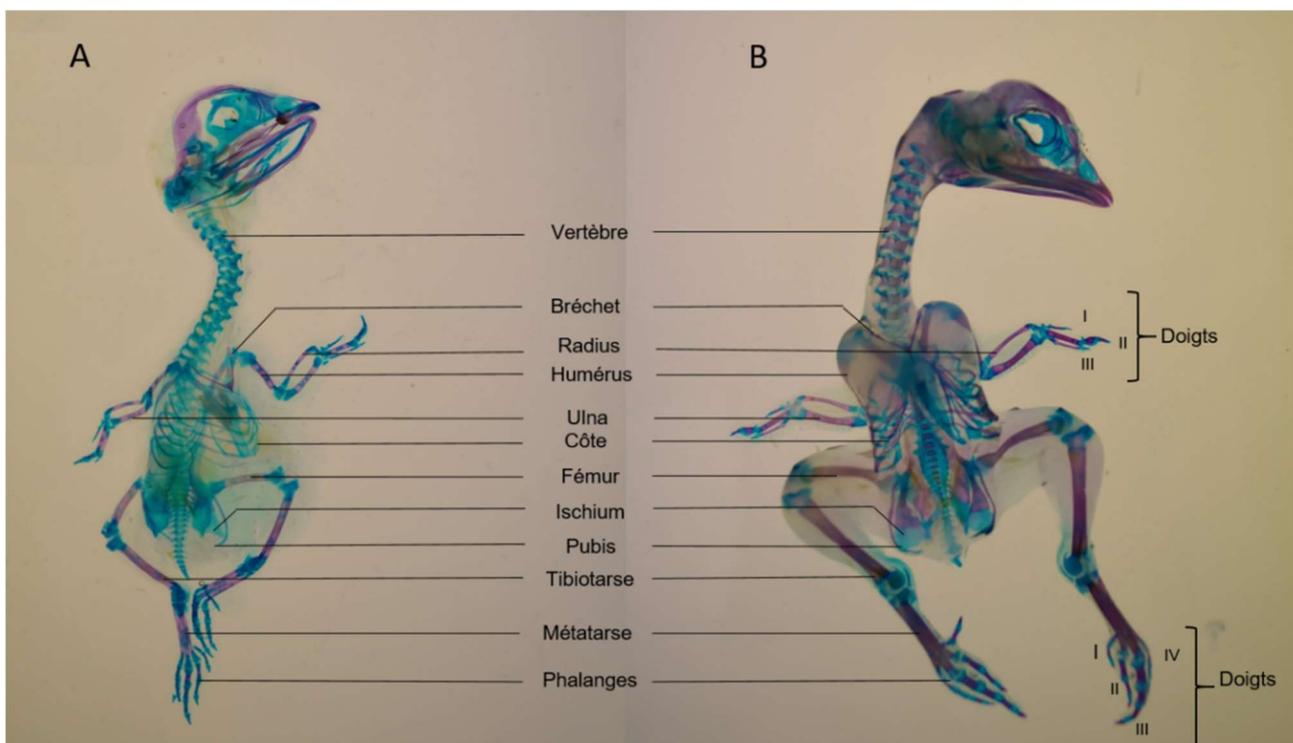


Figure 3 : Anatomie du squelette de l'embryon de poussin aux stades ED11 (A) et ED15 (B) : Coloration au bleu alcian = cartilage ; Coloration au rouge alizarine = parties minéralisées. (D'après Bellairs and Osmond, 2014) © Sophie Réhault-Godbert, INRAE.

Les images faites à la lumière blanche permettent la visualisation du cartilage marqué au bleu alcian et des parties minéralisées marquées au rouge alizarine. Ces marquages montrent que la délimitation entre l'os minéralisé et le cartilage n'est pas nette : il y a superposition de ces deux éléments à chaque extrémité de la partie minéralisée (Figure 4, A et E). Ces images ont également été analysées en utilisant les filtres noir et blanc (Figure 4, B et F) afin de pouvoir quantifier la surface totale du membre étudié. Enfin, des images en Texas Red permettant de quantifier seulement la partie minéralisée de l'os (rouge alizarine) ont été analysées (Figure 4, C et G). À partir de ces dernières et du logiciel Image J, il a été possible de délimiter ces zones et de mesurer leur surface (Figure 4, D et H).

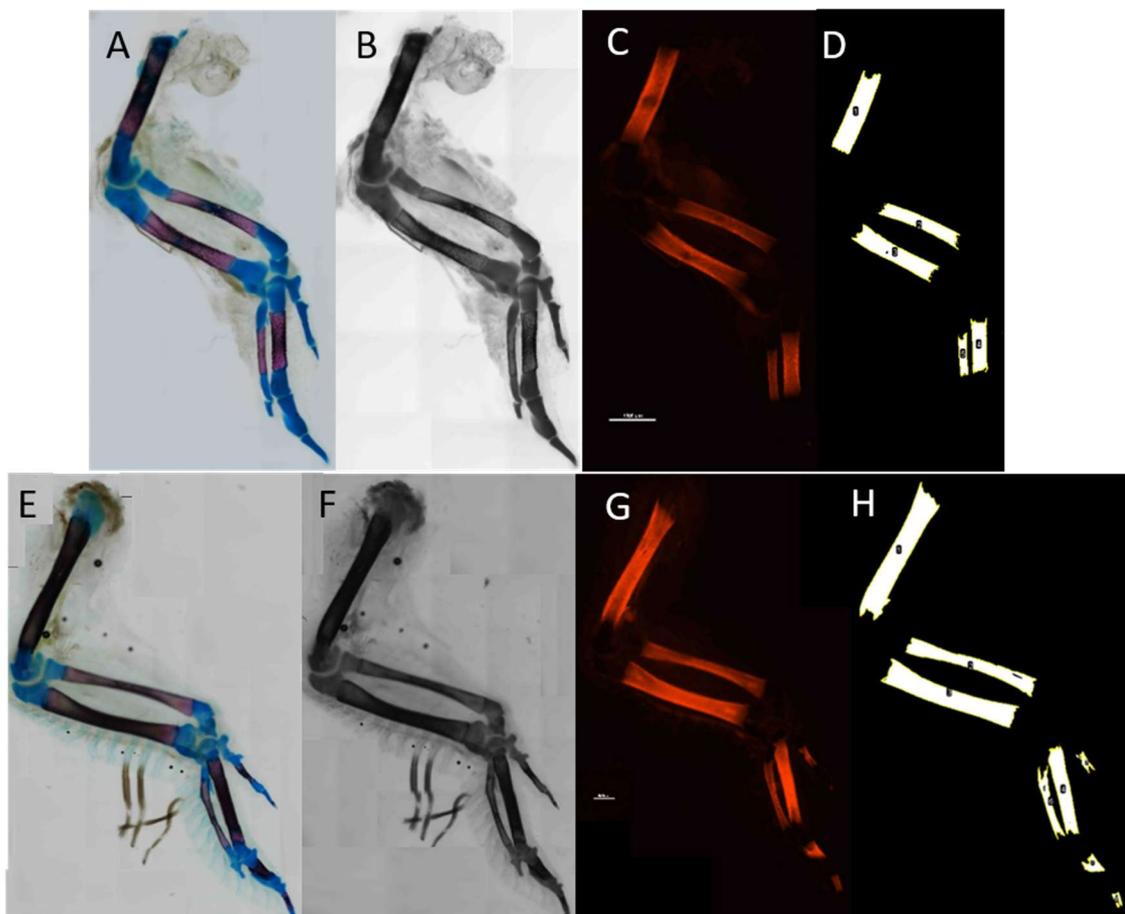


Figure 4 : Images microscopiques des ailes gauches du stade ED11 (A, B, C et D) et du stade ED15 (E, F, G et H) : *Toutes les images ont été prises en 4X. (A, D) Coloration au bleu alcian (cartilage) et au rouge alizarine (parties minéralisée) ; (B, E) Noir et blanc ; (C, F) Épifluorescence TexasRed et (D, H) Surface délimitée par le logiciel ImageJ à partir de l'image en TexasRed. Echelle = 1000 μ m.*

Dans un premier temps, la taille des os (partie minéralisée + partie cartilagineuse) a été déterminée. On observe, pour chaque os indépendamment, peu de variation de la taille

entre les ailes droite et gauche (Figure 5). En revanche, on observe d'une manière générale une plus grande variabilité de la taille de l'aile gauche (orange clair). La taille des os de l'aile est 1,5 fois plus importante pour les embryons du stade ED15 par rapport aux ED11, ce qui confirme la croissance de l'embryon entre les deux stades.

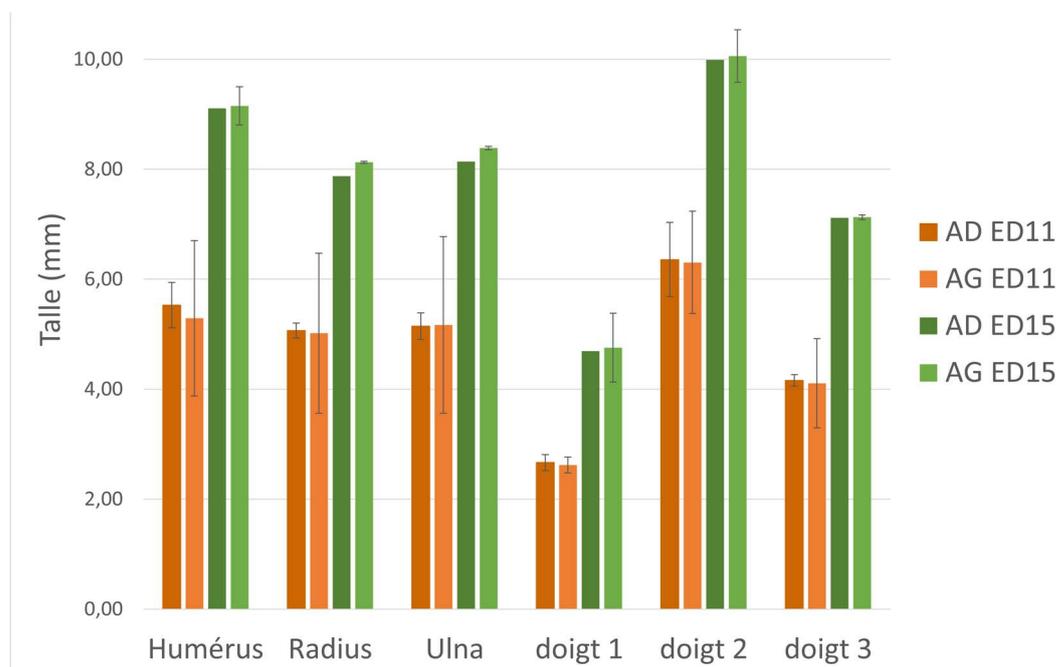


Figure 5 : Taille totale des os constituant l'aile au stade ED11 (orange) et ED15 (vert) : Pour ED11 n=8 ; pour ED15 n= 3. Les résultats correspondent à la moyenne des échantillons par stade \pm l'écart type.

Par la suite, la surface totale de la partie minéralisée ainsi que de la partie cartilagineuse a été mesurée. Les ailes des échantillons ED11 montrent que la proportion de cartilage (61%) est plus importante que la portion minéralisée (38%) tandis que c'est la partie minéralisée (55%) qui est dominante dans l'aile des embryons du stade ED15 (Figure 6).

Pour ce qui est des pattes, 53% correspond à du cartilage et 47% est minéralisé au stade ED11. La quantification de la minéralisation des pattes au stade ED15 n'a malheureusement pas pu être réalisée

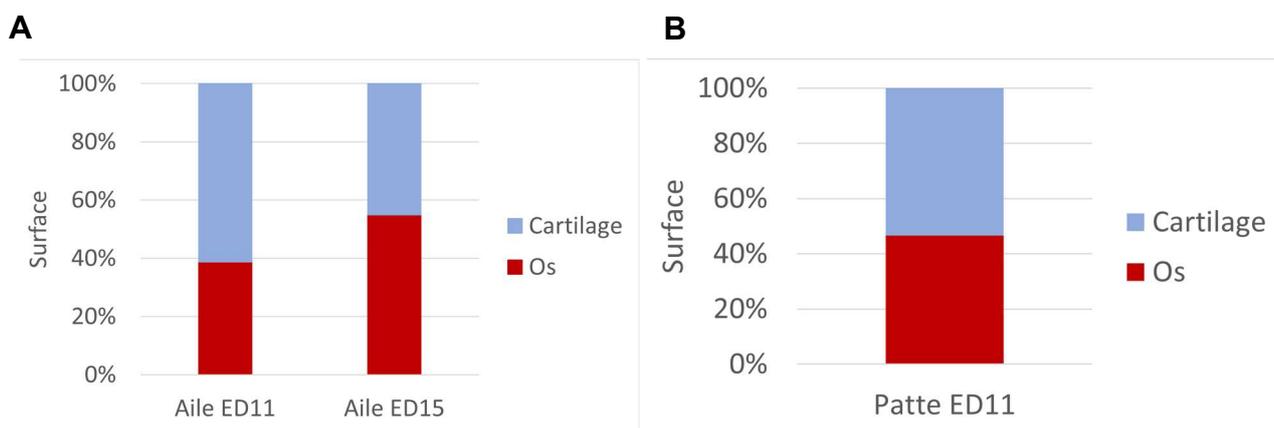


Figure 6 : Proportion des parties minéralisées (rouge) et cartilagineuses (bleu) des ailes aux stades ED11 et ED15 (A) et des pattes au stade ED11 (B) : *Seuillage sur image en noir et blanc à l'aide du logiciel ImageJ. (A) : pour ED11 n=6 ; pour ED15 n= 3. (B) n=6*

Afin de déterminer la cinétique de minéralisation des os de l'aile, la surface de leur partie minéralisée a été déterminée (Figure 7). Ces résultats confirment les résultats précédents (Figure 6, A). En effet, la surface des os de l'aile augmente entre les deux stades étudiés. L'humérus, l'ulna, le radius ainsi que les doigts II et III augmentent d'un facteur 3,5 entre les stades ED11 et ED15. Le doigt I est très peu minéralisé à ED11 (5988 mm²) comparé au stade ED15 (57933 mm²).

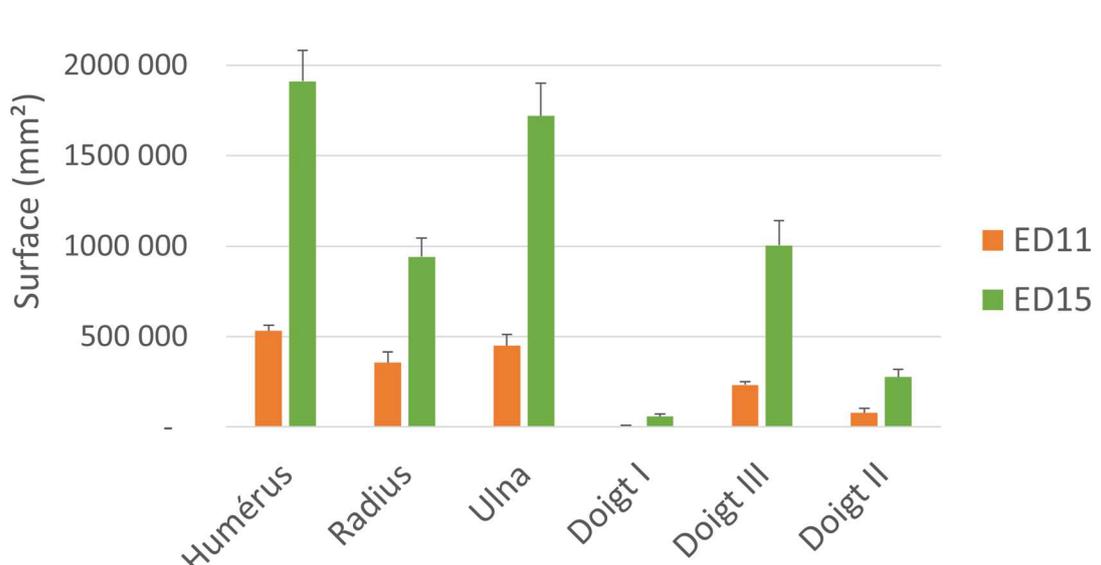


Figure 7 : Quantification de la surface minéralisée des os de l'aile à ED11 (orange) et ED15 (vert) : *Seuillage sur image Texas Red à l'aide du logiciel ImageJ. Pour ED11 n=8 ; pour ED15 n= 3.*

L'observation de la quantification de la minéralisation des ailes des embryons colorés au bleu alcian et au rouge alizarine montre que la portion minéralisée est plus importante pour les embryons ED11 que ED15 (Figures 6 (A) et 7). De même, une augmentation d'un facteur 1,5 de la taille de l'os est observée en comparant les deux stades (Figure 5). Cette augmentation de la calcification osseuse a été décrite comme étant en lien avec les activités de décarboxylation de la phosphatase alcaline osseuse et du citrate, tous deux ayant une activité ostéoblastique. Ces activités commencent à augmenter autour de ED10-12, atteignent un pic à ED19 puis diminuent. Elles se sont révélées fortement corrélées à l'activité de liaison du calcium dans la membrane chorioallantoïque (Kubota et al., 1981). A partir du stade embryonnaire ED14 jusqu'à ED19, les os longs de poulet doublent à peu près leur longueur, leur épaisseur et leur quantité totale de minéraux pour accompagner la croissance rapide de l'embryon (Bellairs and Osmond, 2014; Yair et al., 2012). Ces modifications structurelles nécessitent un transport massif de calcium à travers l'important système vasculaire de la CAM, depuis la coquille (Yair and Uni, 2011).

Nos résultats sont donc cohérents avec ce qui a déjà pu être décrit dans la littérature et sont à mettre en lien avec la différenciation cellulaire et la maturation du développement de la CAM entre ED11 et ED15. Malheureusement, nous n'avons pas pu quantifier la minéralisation sur l'ensemble du squelette compte-tenu de plusieurs problèmes techniques (taille des embryons, taille des images, etc.). Il serait donc intéressant de pouvoir le faire afin d'avoir une vision globale de la minéralisation du squelette au cours du développement et d'inclure des stades intermédiaires afin d'avoir une idée plus précise de la cinétique de minéralisation au cours du développement embryonnaire.

B. Etude de l'expression des candidats

La confirmation que la minéralisation du squelette de l'embryon augmente entre les stades ED11 et ED15 a permis de valider les stades de prélèvement pour une étude expressionnelle de la membrane chorioallantoïque. Les membranes ont été prélevées et les ARN extraits selon le protocole indiqué dans le Matériel et Méthodes (2. B. 1.). A partir de ces ARN extraits, nous avons alors réalisé une transcription inverse pour obtenir l'ADN complémentaire (B.2).

1. Contrôle de l'efficacité des RT

Afin de vérifier l'efficacité des RT, le gène de ménage GAPDH a été amplifié par PCR en point final. La migration des produits de PCR montre un signal intense à 174 pb dans

tous les puits excepté pour le puits correspondant au témoin négatif (Figure 8, T-). Ce signal correspond bien à la taille attendue (Tableau I). Un deuxième signal, moins intense à 91 pb est observé pour tous les échantillons ainsi que pour le témoin négatif : il s'agit très probablement d'un dimère d'amorces (= hybridation des amorces entre elles).

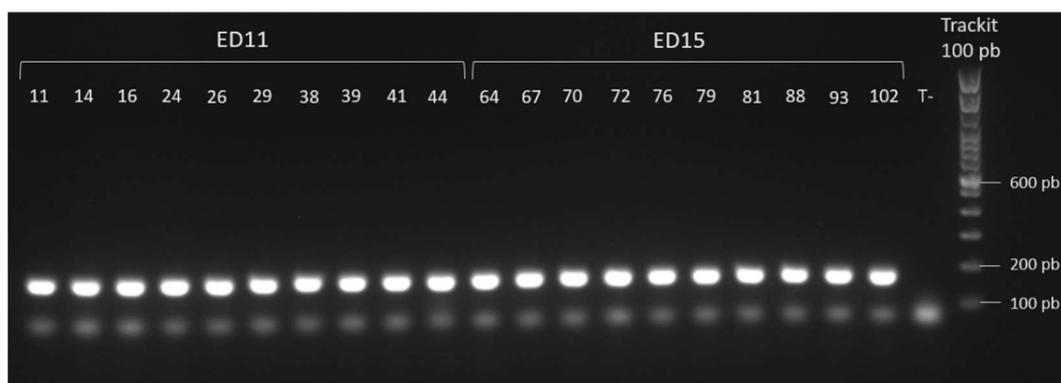


Figure 8 : Migration sur gel d'agarose 2% des produits de PCR obtenus pour le gène *GAPDH* : Gel d'agarose 2% révélé sous UVs par la présence de l'agent intercalant *GelRed*. 5 μ l d'échantillons de PCR dans chaque puits. Pistes 11 à 102, produits de PCR obtenus ; Piste T-, témoin négatif ; Marqueur de poids moléculaire = Trackit 100 pb.

Le signal de 174 pb semble constant au sein des échantillons. Ce gel contrôle montre que tous les échantillons contiennent de l'ADN et témoigne de l'efficacité de la transcription inverse.

2. Gènes candidats

Par la suite, des PCR ont été réalisées sur un pool d'échantillons ED11 et un pool d'échantillons ED15 afin de déterminer l'expression de 8 gènes candidats (Tableau I).

Un signal peu intense d'environ 90 pb est observé dans le témoin négatif ainsi que dans les puits correspondant aux échantillons pour tous les gènes testés, exceptés les puits ED11 des gènes *ATP6V0A4* et *MGP* (Figure 9). Ce signal correspond aux dimères d'amorces qui n'ont pas réagi avec le gène cible. En plus de ce signal, chaque échantillon possède une bande plus intense caractéristique du produit de PCR. En effet, pour chaque couple d'amorce, le produit de PCR a une taille définie (Tableau I). Pour certains gènes, le signal obtenu pour l'échantillon ED15 semble pour plus intense que pour ED11. C'est le cas des gènes *CA2* (100 pb), *CASR* (195 pb), et *TGM4* (192 pb). Les autres gènes que sont *ATP6V0A4* (167 pb), *CAB39L* (170 pb), *LOC776719* (159 pb), *MGP* (151 pb) et *S100A14* (164 pb) donnent à priori des signaux de même intensité pour les deux stades étudiés.

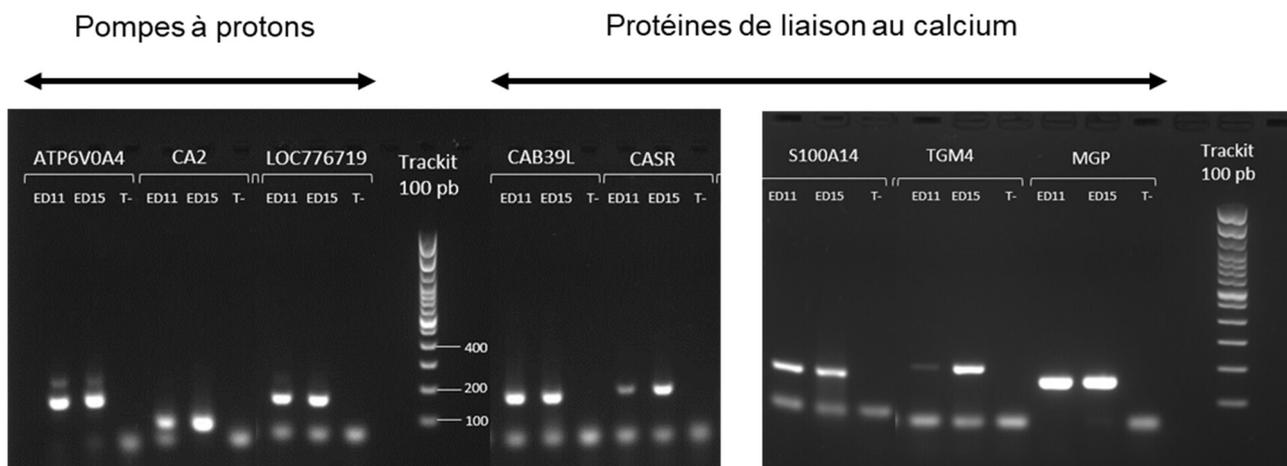


Figure 9 : Migration sur gel d'agarose 2% des produits de PCR obtenus pour les gènes candidats : Gel d'agarose 2% révélé sous UVs par la présence de GelRed. 5 μ l d'échantillons de PCR dans chaque puit. Piste T- témoins négatif ; Marqueur de poids moléculaire = Trackit 100 pb.

Les migrations des produits de PCR obtenues pour les différents gènes candidats (Tableau I) permettent de déterminer si ces gènes sont exprimés ou non dans la CAM à différents stades (ED11 et ED15). Sur chacun des gels réalisés, le puits correspondant au témoin négatif ne comprend pas de signal majoritaire correspondant à l'amplification d'une séquence spécifique d'un gène. Cette absence de signal signifie que la solution du mix de PCR n'est pas contaminée, la migration des produits de PCR peut donc être analysée. En plus de cela, la migration des produits de PCR montre, pour chaque gène, excepté *ATP6V0A4*, un seul signal majoritaire à la taille attendue (Tableau I). Cela signifie que les amorces utilisées pour les réactions de PCR sont bien spécifiques de la séquence du gène étudié. Les amorces nouvellement conçues sont donc validées et utilisables à posteriori, pour des analyses par PCR en temps réel. Il est prévu également un séquençage du produit de PCR pour vérifier que le produit d'amplification correspond bien au gène cible.

Pour le gène *ATP6V0A4*, la bande correspondant au dimère d'amorce est présente ainsi que la bande majoritaire de la taille attendue (167 pb) (Tableau I). Il y a cependant un troisième signal de 205 pb, moins intense que celui à 167 pb. Cela signifie que les amorces utilisées s'hybrident également sur une autre séquence de poids moléculaire plus important. Pour notre analyse, nous nous focaliserons sur la bande la plus intense (167 pb) même si ces résultats suggèrent qu'il faudra très certainement concevoir un autre couple d'amorces pour pouvoir envisager des analyses quantitatives de l'expression de ce gène.

a) Gènes potentiellement impliqués dans la déminéralisation de la coquille

La liste des gènes candidats impliqués dans la déminéralisation de la coquille comprend trois gènes : *ATP6V0A4*, *CA2* et *LOC776719*. Seul le gène *CA2* montre une surexpression marquée à ED15 sur gel (Figure 9). La surexpression du gène *CA2* au cours du développement embryonnaire confirme les différences d'expression observées par RNAseq entre ces deux stades (Tableau I). La protéine *CA2* étant connue pour jouer un rôle dans la solubilisation de la coquille d'œuf (Gabrielli and Accili, 2010), le profil d'expression obtenu dans la figure 9 signifie que son activité est susceptible d'augmenter entre les jours 11 et 15 d'incubation. La présence d'un produit de PCR pour *ATP6V0A4* et *LOC776719* confirme l'expression de ces deux gènes dans la CAM à ces deux stades. Ces résultats suggèrent un rôle de ces deux protéines au niveau de la CAM et potentiellement dans la minéralisation puisque *ATP6V0A4* est décrite pour participer à l'ossification (<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A1D5PCU0>, (Tableau I). En revanche, la technique de PCR en point final ne permet pas de quantifier l'expression et de confirmer une régulation de l'expression de ces deux gènes entre les deux stades.

b) Gènes potentiellement impliqués dans la liaison au calcium

Six gènes potentiellement impliqués dans la liaison au calcium ont été sélectionnés : *CAB39L*, *CASR*, *S100A14*, *TGM4* et *MGP*.

Pour le gène *CAB39L*, chaque échantillon donne un produit principal de 170 pb (Figure 9). Cette taille correspond à la taille attendue pour l'amplification du gène *CAB39L* (Tableau I). La même intensité de signaux est observée pour les produits de PCR quel que soit le stade d'incubation des échantillons. Or, la quantification faite par le RNA-Seq montre que la teneur en *CAB39L* est plus faible à ED11 qu'à ED15 (Tableau 1). Pour ce gène, la PCR en point final ne permet pas de montrer des différences d'expression entre les deux stades.

Le gène *CASR* code un récepteur couplé aux protéines G qui permet de maintenir l'homéostasie du calcium en détectant ses variations de concentration extracellulaire (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q5TLZ3>). Ce dernier semble plus exprimé à ED15 qu'à ED11 (Figure 9). L'augmentation de l'expression de cette protéine est cohérente avec les fluctuations de concentrations en ions calcium attendues localement, résultant de la dissolution de la coquille.

Le résultat obtenu par PCR point final pour *S100A14* ne permet pas de distinguer de différence d'expression entre ED11 et ED15, bien que le gène soit surexprimé plus de 3 fois à ED15 par rapport à ED11 d'après les résultats de RNA-seq (Tableau I). Il existe peu d'information sur les fonctions de la protéine *S100A14* (<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A3Q2U4S3>) et son rôle dans la liaison et le transport du calcium reste à caractériser.

Comme pour le gène *CASR*, le gène *TGM4* (Figure 9) semble davantage exprimé à ED15 par rapport à ED11. En effet, le signal (192 pb) est plus beaucoup intense pour les échantillons du stade ED15 que ED11. Cette protéine est connue pour lier le calcium (<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A1D5P5P9>) mais elle jouerait un rôle également pour stabiliser les liaisons protéine-protéine. De manière intéressante, chez les autres espèces, elle est impliquée dans la reproduction (formation du bouchon vaginal chez la souris, <https://www.uniprot.org/uniprot/Q8BZH1>; expression spécifique de la prostate et formation du plasma séminal chez l'homme (Landegren et al., 2015)). Le rôle physiologique de cette protéine au sein de la CAM reste donc à caractériser.

Bien que les résultats de RNA-seq démontrent une surexpression du gène *MGP* à ED15 (Tableau I), il n'est pas possible de détecter une telle différence d'expression entre les deux stades après PCR en point final. Néanmoins, la détection de l'expression de ce gène pourrait être en lien avec la minéralisation de l'embryon. En effet, la protéine MGP lie le calcium et a été décrit pour réguler le développement du cartilage et la minéralisation osseuse (<https://www.uniprot.org/uniprot/O42413>).

IV. Conclusion

Une diminution du poids de la coquille de l'œuf a été relevé au cours du développement embryonnaire du poulet (Yair and Uni, 2011). Cette déminéralisation de la coquille a lieu lors de la deuxième moitié de l'incubation. En étudiant deux stades de cette deuxième moitié de développement embryonnaire (un stade précoce et un stade plus tardif), nous avons observé une forte augmentation de la minéralisation du squelette embryonnaire que nous avons pu partiellement quantifier, ainsi qu'une expression croissante de gènes de la CAM susceptibles de jouer un rôle dans ces processus (*CA2*, *CASR* et *TGM4*). Bien qu'aucune différence d'expression a été observée pour les autres candidats (*ATP6V0A4*, *LOC776719*, *CAB39L*, *S100A14* et *MGP*), tous sont exprimés et ont potentiellement un rôle dans la CAM. Cependant, hormis pour la protéine *CA2* (Gabrielli and Accili, 2010), leur lien

avec la décalcification de la coquille et la minéralisation du squelette de l'embryon reste à identifier.

V. Perspectives

Les échantillons utilisés dans l'étude de l'expression des gènes candidats ont été obtenus à partir de CAM broyées. La CAM ayant été broyée dans sa totalité, on ne connaît pas localisation cellulaire des candidats étudiés (épithélium chorionique, épithélium allantoïque ou mésoderme). Il serait intéressant de faire de l'immunohistochimie afin de visualiser où se situent les protéines codées par les gènes analysés dans cette étude (sous réserve que l'on ait des anticorps spécifiques). En effet, on s'attend à ce que les protéines impliquées dans la décalcification de la coquille, la liaison et le transport des ions calcium soient localisés au niveau de l'épithélium chorionique, en contact avec les membranes coquillières et la coquille.

En terme d'application pour la filière avicole, il serait intéressant d'étudier l'expression de ces gènes chez d'autres souches (pondeuses, label...) afin de voir s'il y a des différences d'expression. En effet, il a été montré que la sélection génétique intensive a pu conduire à l'apparition d'effets négatifs telle qu'une fragilisation du squelette des animaux d'élevage, en particulier des pattes et du bréchet (voir Figure 3), ce qui pose des problèmes de bien-être animal (Julian, 2005). L'hypothèse est que ces effets délétères pourraient déjà être présents dès le stade embryonnaire. Ils pourraient résulter d'une altération des structures extra-embryonnaires suite à des décennies de sélection intensive sur des critères de productivité. L'étude des acteurs cellulaires et moléculaires de la CAM impliqués dans la minéralisation du squelette de l'embryon permettra d'identifier s'il existe ou non une quelconque altération des fonctionnalités de cette structure, en comparant des œufs issus de souches de poules variées (sélectionnées *versus* rustiques).

VI. Références bibliographiques

- Bellairs and Osmond. 2014: Chapter 16, Skeleton and Muscles. In: Atlas of Chick Development - 3rd Edition, pp 103-112. Academic Press, Oxford, UK.
- Da Silva, M., Labas, V., Nys, Y., Réhault-Godbert, S., 2017 : Investigating proteins and proteases composing amniotic and allantoic fluids during chicken embryonic development. *Poult. Sci.* 96, 2931–2941.
- DeFouw, D.O., Rizzo, V.J., Steinfeld, R., Feinberg, R.N., 1989 : Mapping of the microcirculation in the chick chorioallantoic membrane during normal angiogenesis. *Microvasc. Res.* 38, 136–147.
- Gabrielli, M.G., Accili, D., 2010 : The chick chorioallantoic membrane : a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 940741.
- Gabrielli, M.G., Materazzi, G., Cox, J.V., Menghi, G., 2001 : Specialised cell types in the chorioallantoic membrane express carbonic anhydrase during chick embryogenesis. *J. Anat.* 198, 229–238.
- Julian, R.J., 2005 : Production and growth related disorders and other metabolic diseases of poultry--a review. *Vet. J. Lond. Engl.* 1997 169, 350–369.
- Kubota, M., Abe, E., Shinki, T., Suda, T., 1981 : Vitamin D metabolism and its possible role in the developing chick embryo. *Biochem. J.* 194, 103–109.
- Landegren, N., Sharon, D., Shum, A.K., Khan, I.S., Fasano, K.J., Hallgren, Å., Kampf, C., Freyhult, E., Ardesjö-Lundgren, B., Alimohammadi, M., Rathsmann, S., Ludvigsson, J.F., Lundh, D., Motrich, R., Rivero, V., Fong, L., Giwercman, A., Gustafsson, J., Perheentupa, J., Husebye, E.S., Anderson, M.S., Snyder, M., Kämpe, O., 2015 : Transglutaminase 4 as a prostate autoantigen in male subfertility. *Sci. Transl. Med.* 7, 292ra101.
- Lordelo, M., Fernandes, E., Bessa, R.J.B., Alves, S.P., 2017 : Quality of eggs from different laying hen production systems, from indigenous breeds and specialty eggs. *Poult. Sci.* 96, 1485–1491.
- Makanya, A.N., Dimova, I., Koller, T., Styp-Rekowska, B., Djonov, V., 2016 : Dynamics of the Developing Chick Chorioallantoic Membrane Assessed by Stereology, Allometry, Immunohistochemistry and Molecular Analysis. *PLOS ONE* 11, e0152821.
- Marshall, K.M., Kanczler, J.M., Oreffo, R.O., 2020 : Evolving applications of the egg: chorioallantoic membrane assay and ex vivo organotypic culture of materials for bone tissue engineering. *J. Tissue Eng.* 11, 2041731420942734.

- Rizzo, V., Kim, D., Durán, W.N., DeFouw, D.O., 1995 : Differentiation of the microvascular endothelium during early angiogenesis and respiratory onset in the chick chorioallantoic membrane. *Tissue Cell* 27, 159–166.
- Torres, C.A., Korver, D.R., 2018 : Influences of trace mineral nutrition and maternal flock age on broiler embryo bone development. *Poult. Sci.* 97, 2996–3003.
- Yair, R., Uni, Z., 2011 : Content and uptake of minerals in the yolk of broiler embryos during incubation and effect of nutrient enrichment. *Poult. Sci.* 90, 1523–1531.
- Yair, R., Uni, Z., Shahar, R., 2012 : Bone characteristics of late-term embryonic and hatchling broilers: bone development under extreme growth rate. *Poult. Sci.* 91, 2614–2620.

Résumé

Pour subvenir aux besoins de l'embryon, l'œuf possède tous les éléments nécessaires à son développement. Pour minéraliser son squelette, l'embryon puise le calcium dans la coquille *via* la membrane chorioallantoïque (CAM). Cette structure extra-embryonnaire participe ainsi à la déminéralisation de la coquille et permet le transport du calcium de la coquille vers l'embryon. Cependant, les acteurs moléculaires impliqués restent méconnus. Grâce à des approches de microscopie sur squelette d'embryons précolorés, nous avons quantifié la taille et la surface minéralisée des os, à deux stades de développement. Nous avons observé une minéralisation osseuse croissante qui correspond en outre à l'augmentation de l'expression de certains gènes dans la CAM (*CA2*, *CASR*, *TGM4*), tandis que d'autres sont exprimés aux deux stades (*ATP6V0A4*, *CAB39L*, *LOC776719*, *MGP*, *S100A14*). Ces expériences ont permis l'obtention de données préliminaires pour étudier plus précisément la cinétique et les mécanismes impliqués dans la minéralisation osseuse.

Mots-clés : embryon, *Gallus gallus*, coquille, membrane chorioallantoïque, squelette, minéralisation.

Abstract

To support embryonic growth, the egg must contain all the components required for its development. To assist skeleton's mineralization, the embryo mobilizes the calcium embedded in the eggshell, *via* the chorioallantoic membrane (CAM). Indeed, this extra-embryonic structure participate in the decalcification of the eggshell and contributes to the transport of calcium from the eggshell to the embryo. However, the molecular actors involved remain undefined. Thanks to microscopic approaches performed on pre-stained skeletons of embryos, we quantified the size and the surface area of mineralized bones, at two stages of development. We observed an increase in bone mineralization, which corresponds to the increase in the expression of candidates genes in the CAM (*CA2*, *CASR*, *TGM4*), while others are steadily expressed at the two stages (*ATP6V0A4*, *CAB39L*, *LOC776719*, *MGP*, *S100A14*). These experiments provided preliminary data that will help in further studying the kinetics and mechanisms involved in bone mineralization.

Keywords: embryo, *Gallus gallus*, eggshell, chorioallantoic membrane, skeleton, mineralization.