

Le poulet, modèle d'étude du développement du tube digestif

Florence BERNEX

**Maitre de Conférences ENVA
Doctorat Paris 6 & HDR Paris 12
Pathologiste vétérinaire**

Académie Vétérinaire de France - 26 Mai 2011



Le poulet, modèle d'étude du développement du tube digestif

1.! Le modèle aviaire

2.! Les chimères caille-poulet

3.! La transgénèse

4.! Les approches fonctionnelles

1 – Le modèle aviaire : une longue histoire

Le poulet de type Leghorn blanc



Romanoff (1960). The avian embryo. Macmillan company, New-York

Infrastructure et approvisionnement



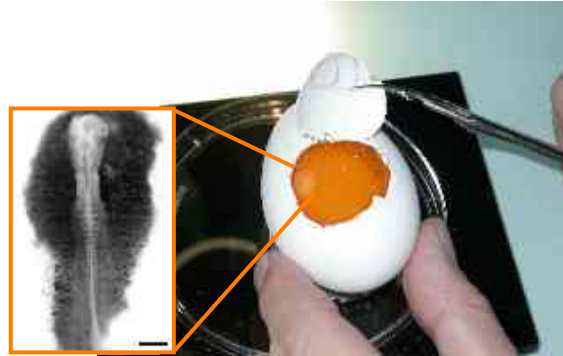
Un incubateur : 38°C, 35% d'humidité, ventilation, 180 oeufs.

Approvisionnement d'oeufs fécondés type Leghorn Blanc dans une ferme avicole.

Accès à l'embryon in vivo

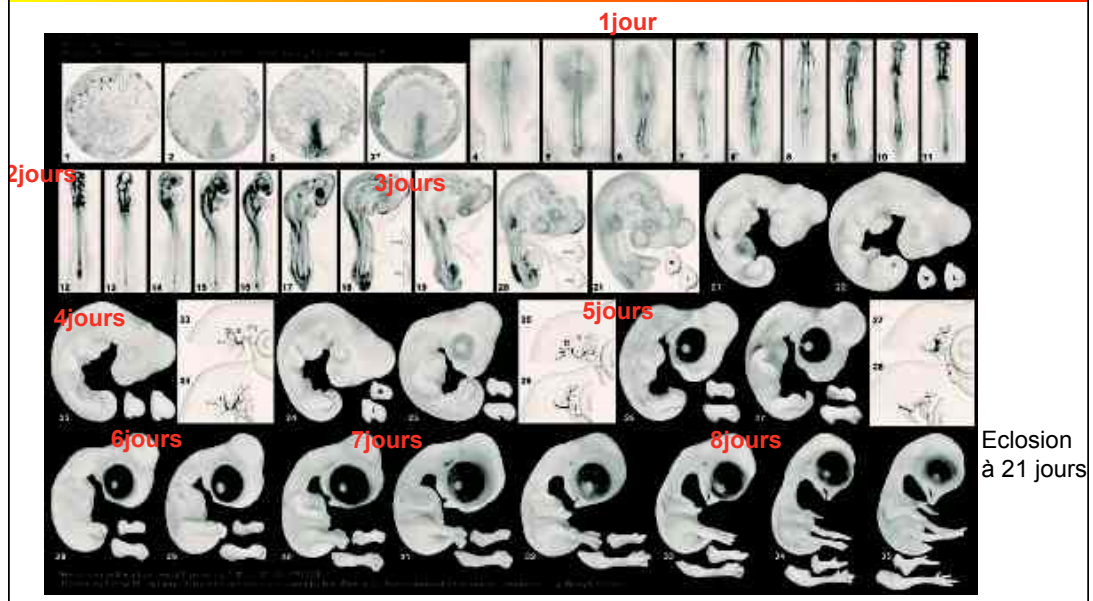


Elimination d'une partie de l'albumine

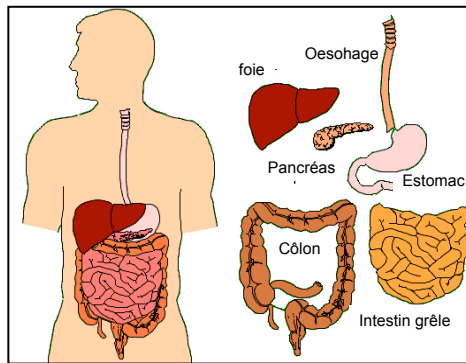


Ouverture de la coquille, accès à l'embryon

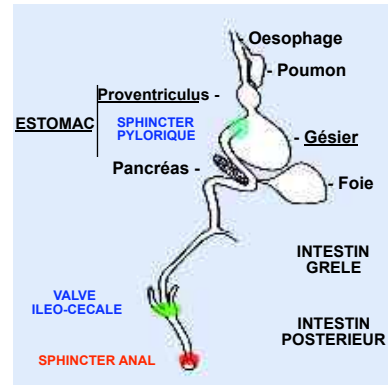
L'embryon de poulet, un modèle simple pour l'embryologie expérimentale



L'embryon de poulet, un modèle simple pour l'embryologie expérimentale



Tube digestif humain



Tube digestif de poulet

L'embryon de poulet, un modèle simple pour l'embryologie expérimentale

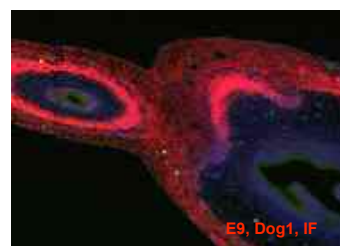
Manipulation chirurgicale

Marquages cellulaires

In toto

Sur coupes

Culture cellulaire



2 – Les chimères caille-poulet

Nicole le Douarin Institut d'embryologie de Nogent-sur-Marne

- Le poulet de type Leghorn blanc



- La caille commune.



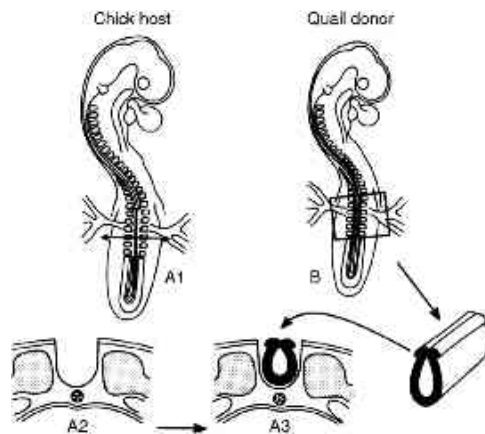
Romanoff (1960). The avian embryo. Macmillan company, New-York

Recombinaison caille-poulet: Identification de l'origine embryologique



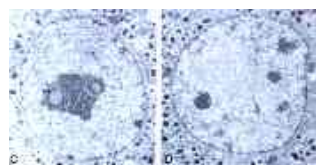
Photos L. Lecoin

Recombinaison caille-poulet: Identification de l'origine embryologique



Le Douarin N. *Develop. Growth Differ.* (2008) 50, S11-S28

Recombinaison caille-poulet: Identification de l'origine embryologique



Noyau de cellule de Caille ... et de Poulet



Neuroépithélium chimérique

Le Douarin N. *Develop. Growth Differ.* (2008) 50, S11-S28

Marqueur nucléaire naturel

- facile à visualiser sur préparation microscopique
- suivi du devenir cellulaire permanent
- Astucieuse façon de visualiser le génotype (coloration de Feulgen et Rossenbeck)

-> suivi du devenir cellulaire

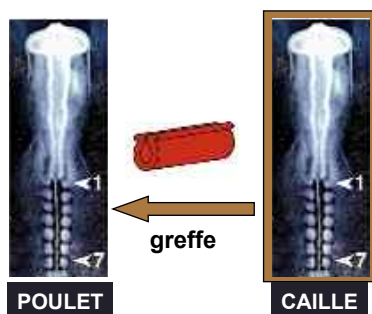
Recombinaison caille-poulet: Identification de l'origine embryologique



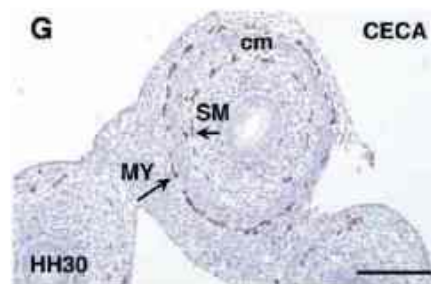
Immunochimie, anticorps monoclonal QCPN.
QCPN : quail non-chick peri-nuclear antigen

Le Douarin N. *Develop. Growth Differ.* (2008) 50, S11-S28

Recombinaison caille-poulet: Identification et devenir des cellules de la crête neurale



Détection avec anticorps monoclonal QCPN
Région caecale



Le système nerveux entérique est issu des
cellules de la crête neurale

Burns AJ et Le Douarin N, *Development*, 1998

Recombinaison caille-poulet, Identification et devenir des cellules de la crête neurale

Origine du système nerveux entérique

S1-S7

>S28

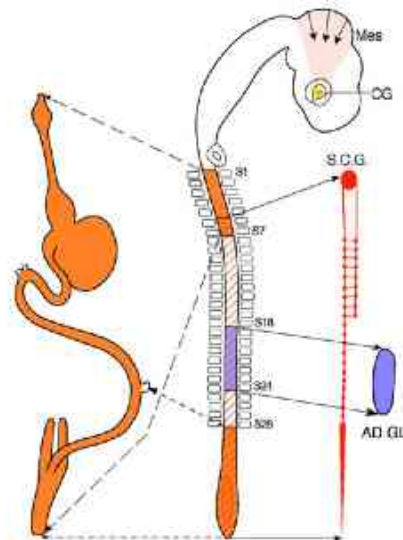
Médulosurrénale

S18 - S24

La chaîne des ganglions sympathiques

>S5

>AD. GL, adrenal gland;
CG, ciliary ganglia,
Mes, mesencephalon,
SCG, superior cervical ganglion.



Le Douarin N. *Mechanisms of Development* 121 (2004) 1089-1102

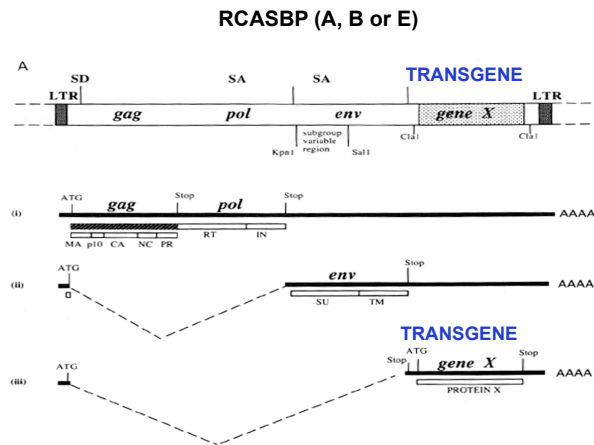
3 – La transgénèse chez le poulet

Par infection rétrovirale

Par électroporation

Transgénèse par infection rétrovirale

RCAS:
replication-competent avian
leukosis virus long terminal
repeat with splice acceptor



Ciblage du mésenchyme gastrointestinal par infection rétrovirale



Injection du rétrovirus dans l'embryon

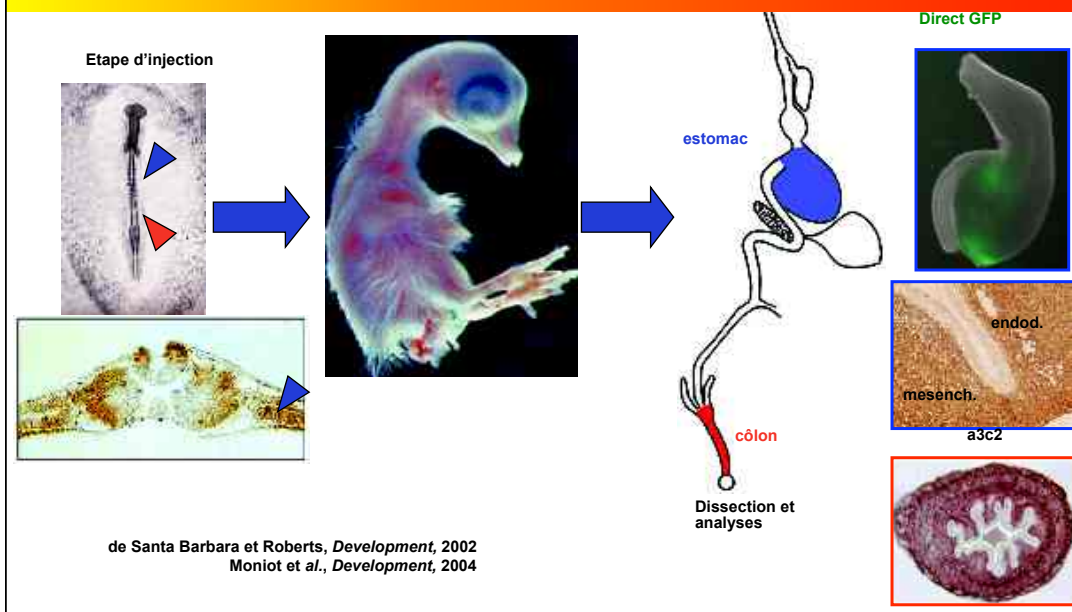


Isolement avec de l'adhésif

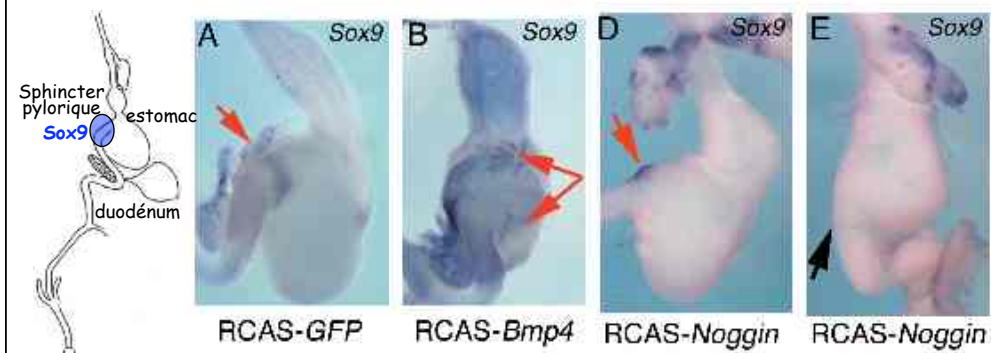


Retour dans l'incubateur pour suivre le développement de l'embryon sous l'effet du transgène

Ciblage du mésenchyme gastrointestinal par infection rétrovirale



Régulation de l'expression des gènes lors du développement de l'estomac



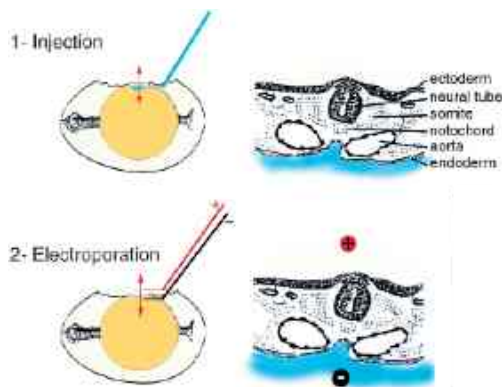
La voie BMP régule le développement du sphincter pylorique

Moniot et al. *Development*, 2004

Transgénèse par électroporation

Electroporation de l'endoderme

- ! 2 pulsations électriques de 50 msec et de 25 mV
- ! ADN plasmidique
 - ! Vecteur avec GFP
 - ! Gène d'intérêt couplé à un promoteur souvent le promoteur CAGGS (CMV enhancer + chicken beta-actin promoter)



Grapin-Botton A, Majithia AR, Melton DA. *Genes Dev.* 2001 Feb 15;15(4):444-54.

Transgénèse par électroporation

Electroporation : transfection des cellules de crête neurale (CCN).

(A) Embryon à E2.5. A E1.5, électroporation avec un vecteur d'expression GFP
Ov, vesicule auditive
Têtes de flèche, menant aux arcs branchiaux
Flèche; vers le TD antérieur
Ht, heart.

(B) Tube Neural tube disséqué d'un embryon électroporé et cultivé pendant 18 h.

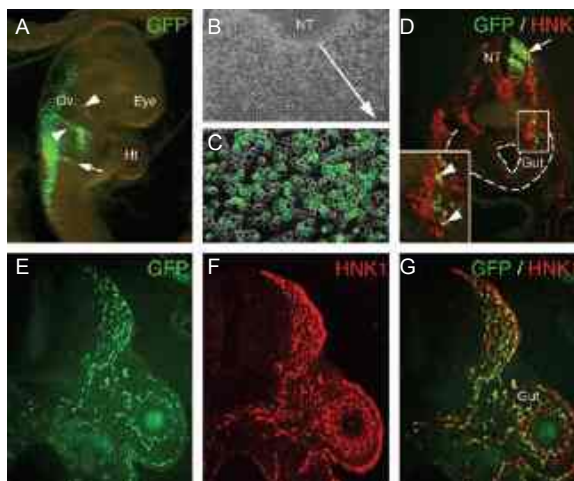
Sortie des CCN du tube neural (flèche)

(C) Majorité de cellules GFP-positives

(D) Cellules GFP-positives et HNK1-positives

Flèche, tube neural
Têtes de flèche, trajet dorsoventral des CCN vers le tube digestif

(E-G) Co-localisation des CCN GFP-positives et HNK-1-positives dans l'intestin



A. S. Wallace et al *Neurogastroenterol Motil* (2009) 21, 768–e49

4 – Les approches fonctionnelles

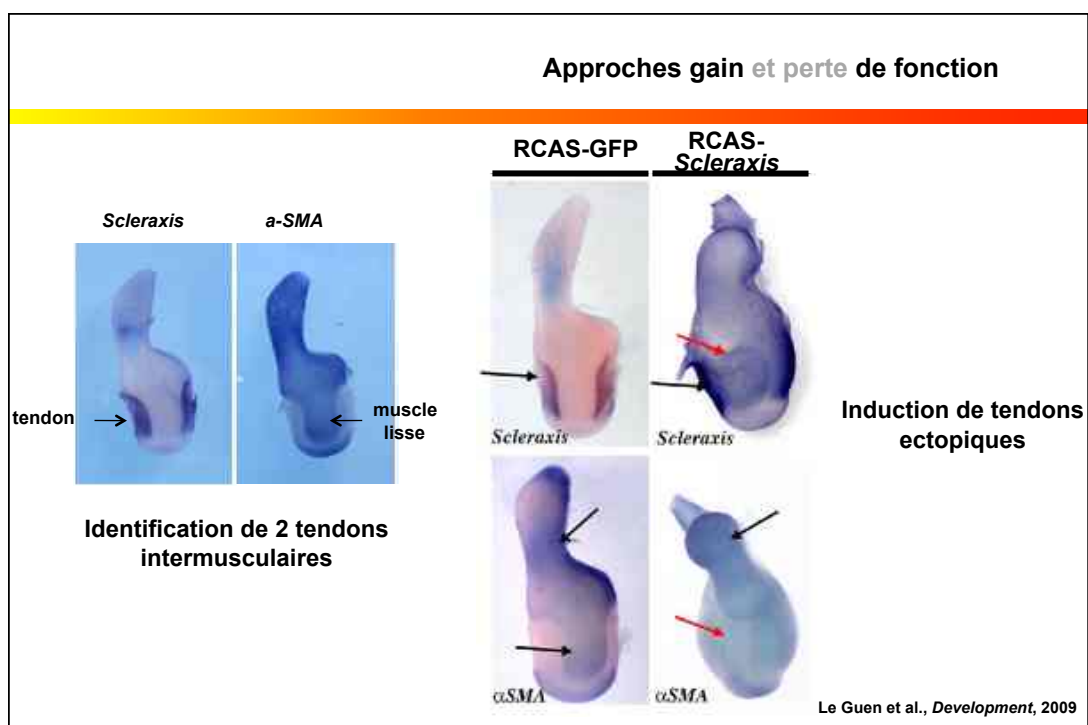
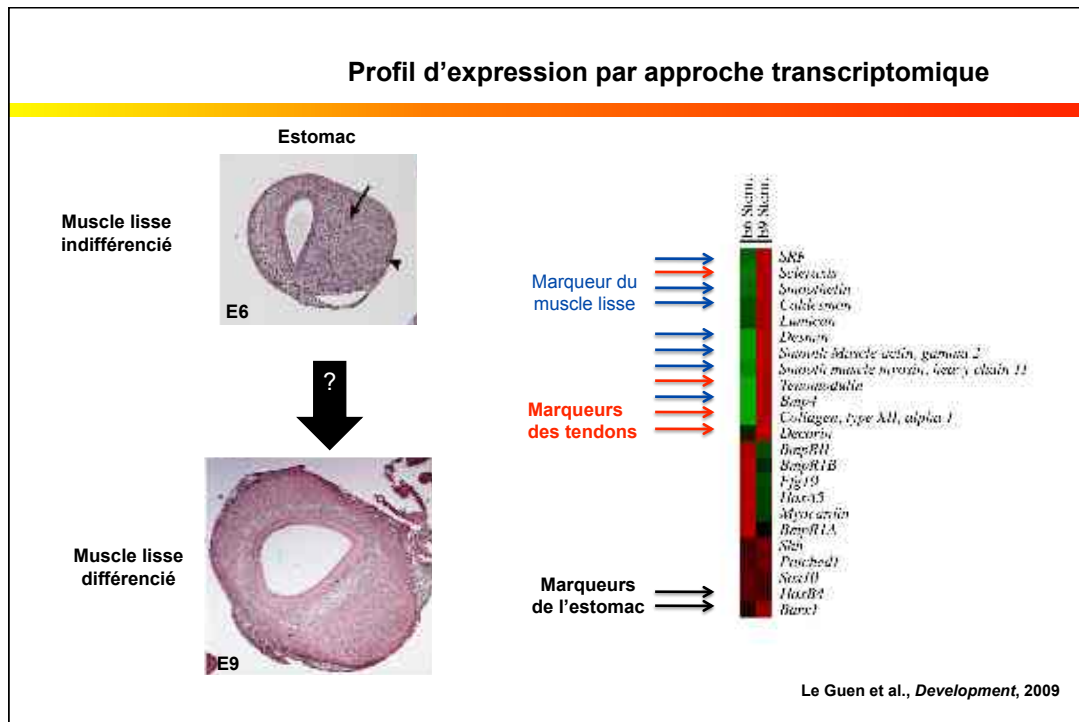
La transcriptomique

Les mutations gain de fonction et perte de fonction

La transcriptomique

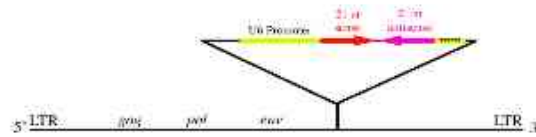
International Chicken Genome
Sequencing Consortium, 2004



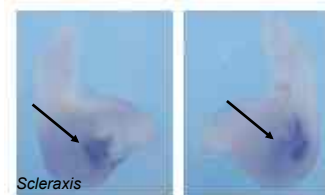


Approches gain et perte de fonction

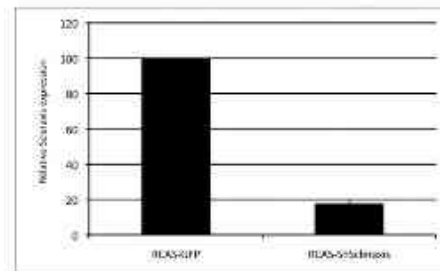
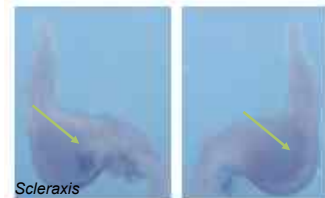
RCAS-shRNA *Scleraxis*



RCAS-GFP



RCAS-shRNA
Scleraxis



Inhibition de l'expression de
Scleraxis et des tendons

Le Guen et al., *Development*, 2009

Le poulet, modèle d'étude du développement du tube digestif

1.! Le modèle aviaire

2.! Les chimères caille-poulet

3.! La transgénèse

4.! Les approches fonctionnelles

Modèle assez complet !

The chick : a great model system becomes even greater, C.D. Stern, 2005



**PHYSIOLOGY
& EXPERIMENTAL MEDICINE**
HEART MUSCLES
MONTPELLIER



Inserm
Institut national
de la santé et de la recherche médicale



UM1
Université Montpellier



**la Région
Languedoc
Roussillon**

Pascal de Santa Barbara, CR1 INSERM

Sandrine Faure, CR1 CNRS

Caroline Rouleau, MCU-PH

Cécile Notarnicola, Postdoc

Sébastien Sagnol, Postdoc

Camille Boyer, Engineer

Annick Bourret, Technician

Ilona Hapkova, PhD Student

Jennifer McKey, M2 Student

Caroline Rico, M2 Student

