

# Utilisation de la microdissection laser pour étudier l'expression des gènes dans l'intestin chez le porc

*Philippe Pinton, Pascal Gourbeyre, Joëlle Laffitte, Isabelle P. Oswald*

*INRA, UMR1331, Toxalim*

# Objectif de l'étude

Dans une perspective européenne de diminution des traitements médicamenteux notamment antibiotiques, il est important de mieux comprendre les mécanismes de résistance aux agents pathogènes du porc en élevage.

Cette étude a été menée dans le cadre d'un projet ANR dont l'objectif était de mieux connaître les interactions entre le système immunitaire de l'hôte et le microbiote intestinal.

# Intestin et réponse immunitaire

Muqueuse intestinale :

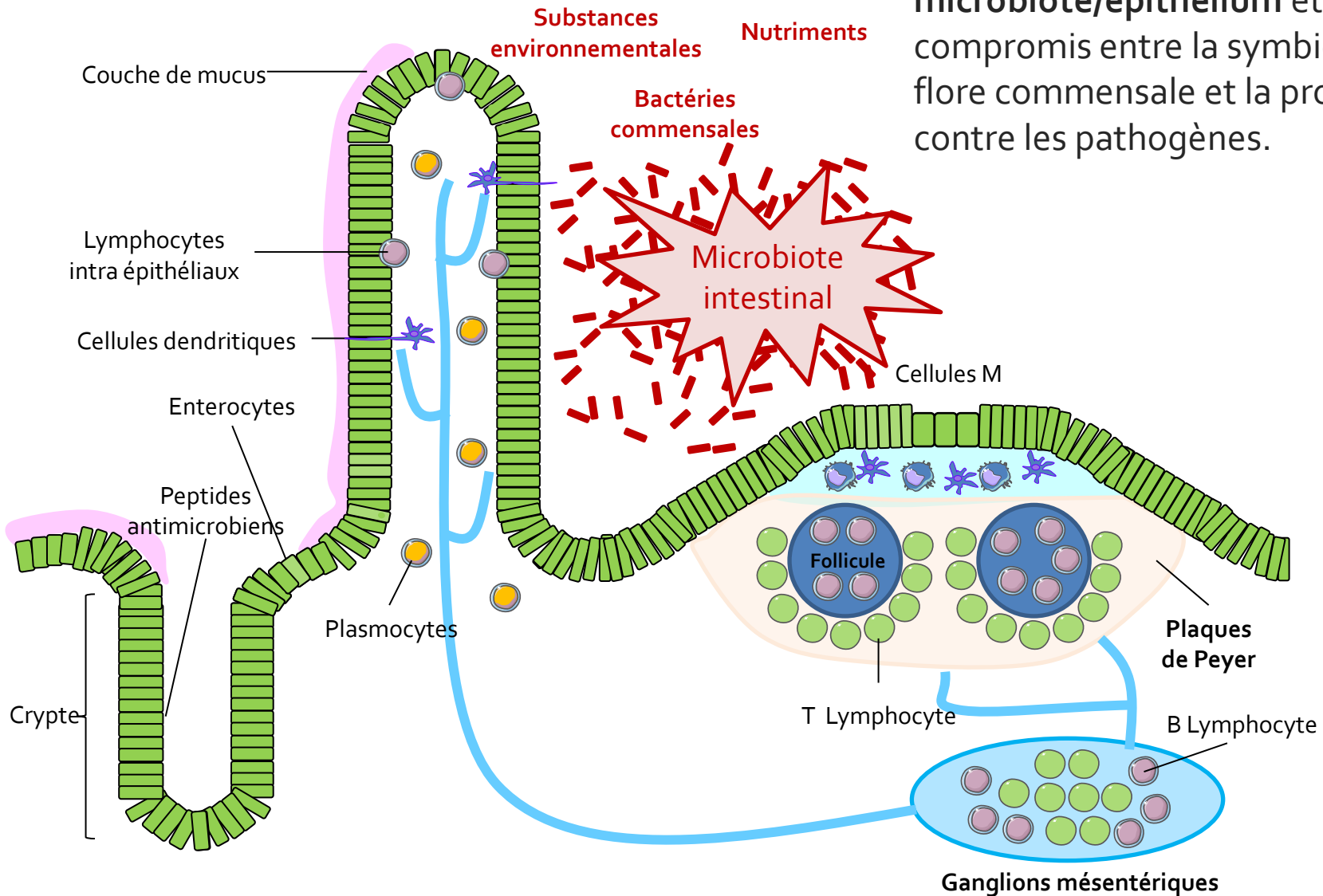
- lieu d'échanges sélectifs entre lumen et circulation générale
- site effecteur de la réponse immunitaire (interactions cellules épithéliales / cellules immunitaires)

Elle est constituée de plusieurs régions notamment :

- la ***lamina propria*** formée d'un tissu conjonctif chargé de cellules immunitaires
- l'épithélium formé de **villosités** avec des entérocytes et des cellules à mucus et de **cryptes** qui comprennent des cellules de Paneth produisant des peptides antimicrobiens et des cellules immatures, capables de se diviser puis de se différencier en migrant le long de la villosité pour assurer en 2 à 3 jours le renouvellement de l'épithélium intestinal.

# Intestin et réponse immunitaire

L'hôte doit **contrôler les interactions microbiote/épithélium** et assurer un compromis entre la symbiose avec la flore commensale et la protection contre les pathogènes.



# Intestin et réponse immunitaire

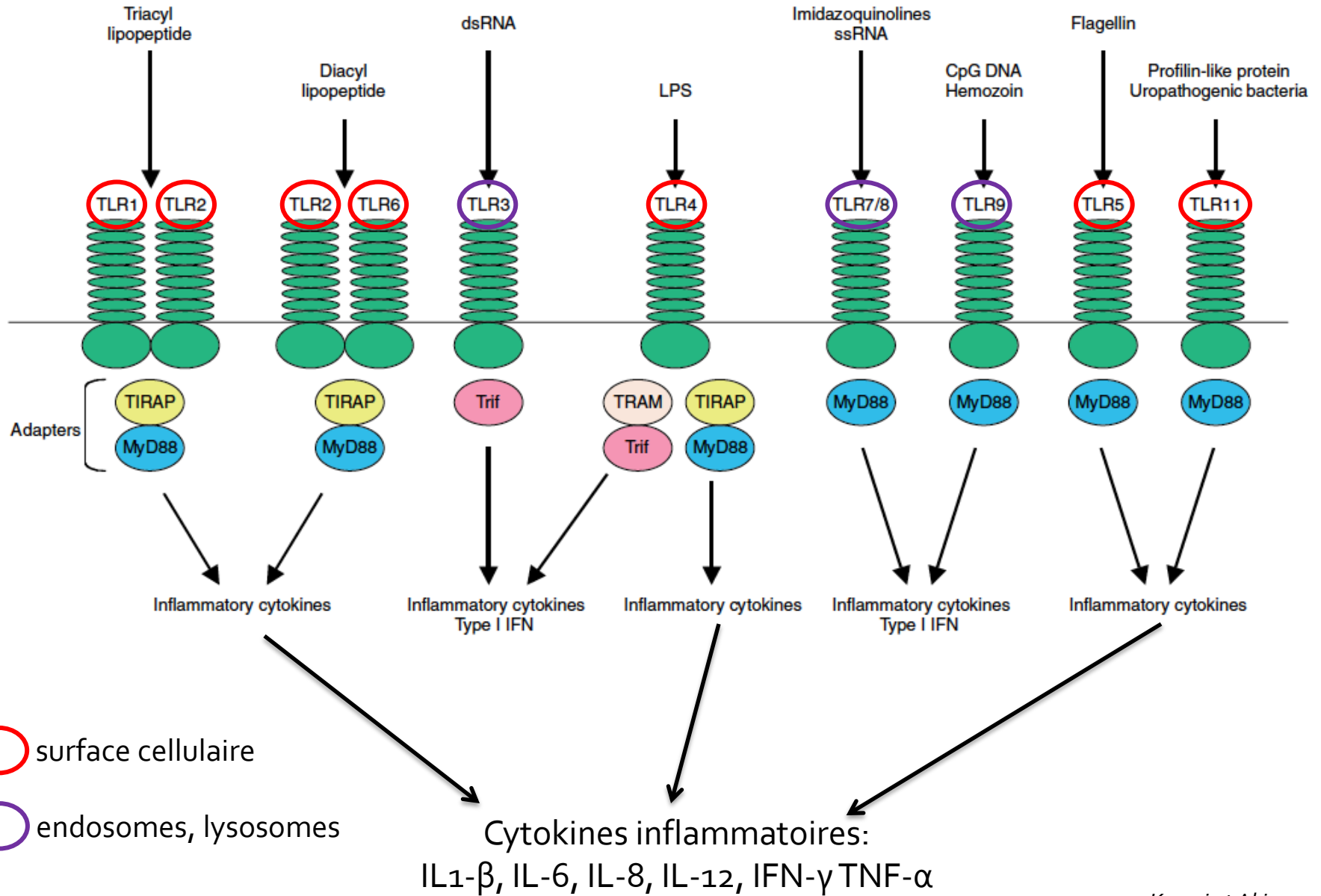
Les microorganismes portent des molécules du **non-soi**, les **Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP)**.

Ils interagissent avec des récepteurs du soi appelés **Pattern Recognition Receptors (PRR)** portés par les cellules intestinales et les cellules immunitaires.

Ces PRR sont de type **Toll-like receptors (TLR)** ou nucleotide oligomerisation domain (NOD) et apparaissent généralement sous forme d'homodimères. Ils peuvent être sécrétés, membranaires ou cytoplasmiques.

Plus de 10 **TLR** ont été identifiés ainsi que leurs **ligands**, les **molécules adaptatrices** et les voies de signalisation qu'ils activent pour **obtenir une réponse effectrice**, notamment par la production de **cytokines**, de **chimiokines** ou de **peptides antimicrobiens**.

# TLR et gènes cibles



# Données bibliographiques sur l'expression des TLR

L'expression des TLR a surtout été étudiée dans des contextes pathologiques ou infectieux

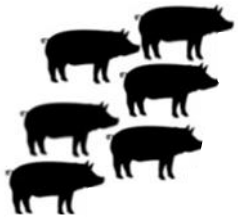
Peu de données existent sur l'expression dans les différents segments intestinaux chez l'animal sain

- **porc** : TLR<sub>1</sub> à <sub>10</sub> dans l'estomac, 3 segments intestinaux et ganglions mésentériques : l'effet est décrit en fonction de l'âge mais pas selon le segment (Uddin et al., 2013)
- **souris** : TLR<sub>2</sub> et TLR<sub>4</sub> dans l'estomac, 3 segments intestinaux, 3 segments côlon: TLR<sub>2</sub> est plus exprimé dans le côlon; TLR<sub>4</sub> montre un gradient d'expression avec un maximum dans le côlon distal (Ortega-Cava et al., 2003)

# Protocole expérimental

Pour mieux connaître les mécanismes de résistance du porc aux agents pathogènes, nous avons évalué le niveau d'expression des gènes de TLR, NOD et gènes cibles chez des porcs sains.

- **le long de l'axe cryptes villosités**
- le long du tractus digestif



6 porcs, 70 jours d'âge

- Autopsie
- Inclusion de fragments de jéjunum dans milieu d'enrobage (Tissue -Tek)
- Congélation dans isopentane refroidi dans l'azote liquide



# Protocole expérimental

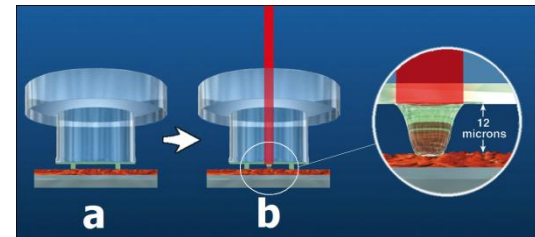
Utilisation de la technique de microdissection laser sur des coupes à congélation de jéjunum.

## Rappel du principe

Le système utilise un laser Infra Rouge qui active un film thermo-sensible au dessus des régions d'intérêt.

Le laser n'altère pas l'échantillon (qualité des acides nucléiques conservée)

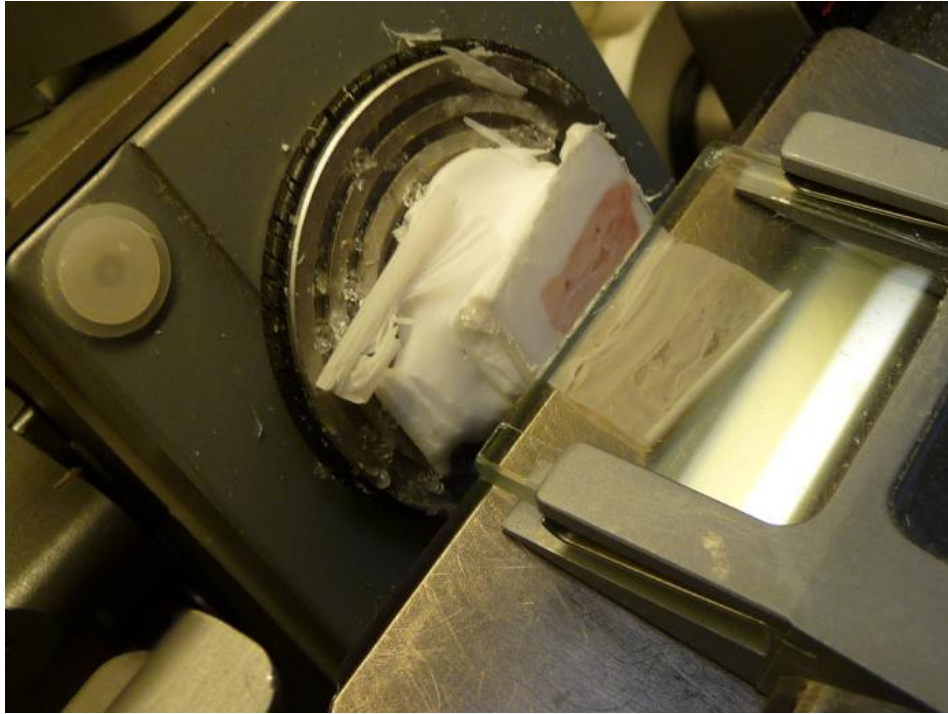
# Matériel



ALIMENTATION  
AGRICULTURE  
ENVIRONNEMENT

INRA

# Préparation des échantillons

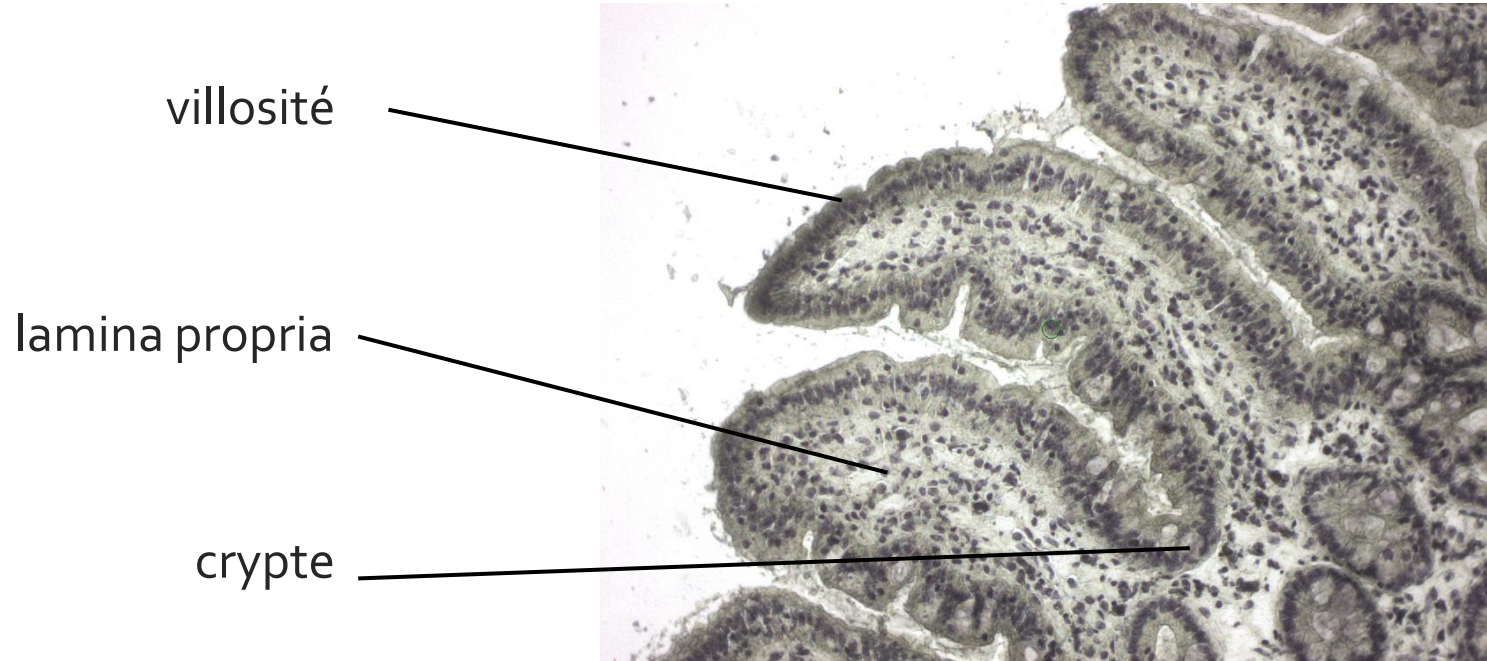


cryostat



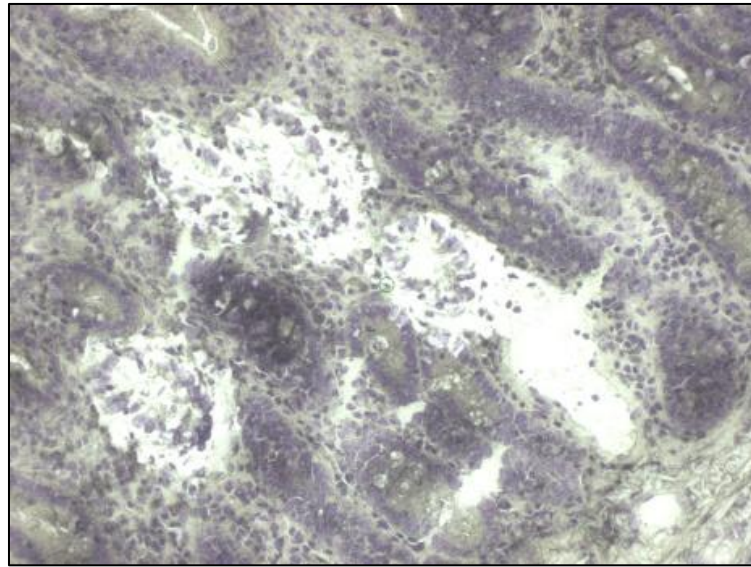
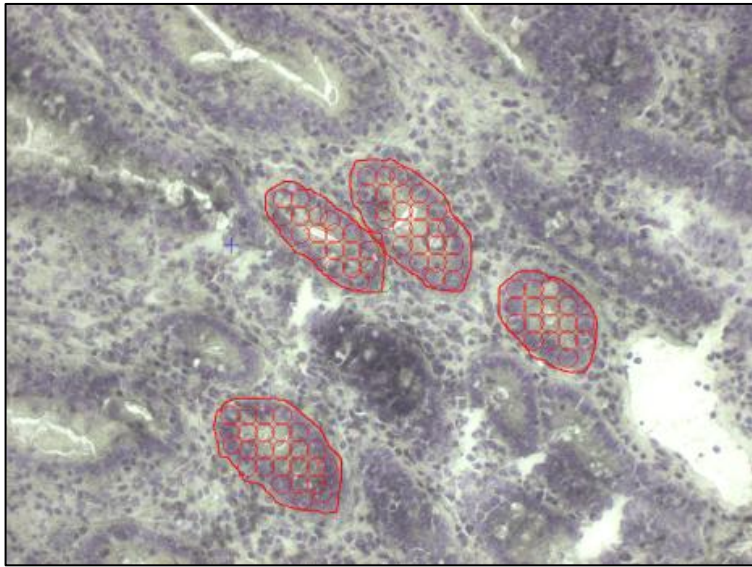
Coupes (12 $\mu$ m)

# Coupe d'intestin de porc

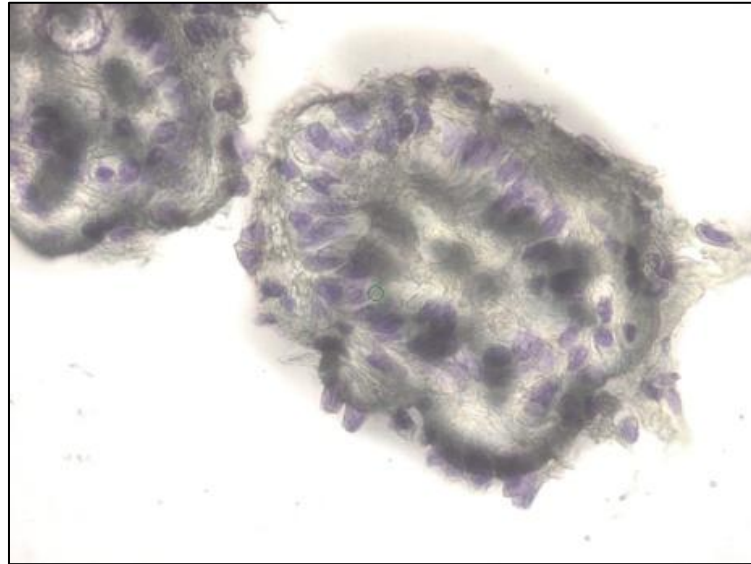




# Choix des régions et microdissection



lame

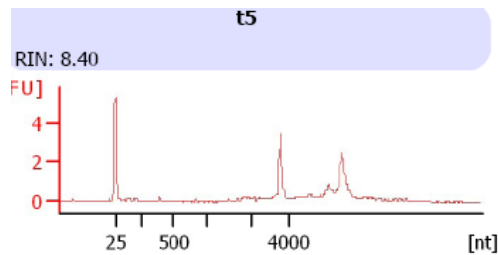


caps

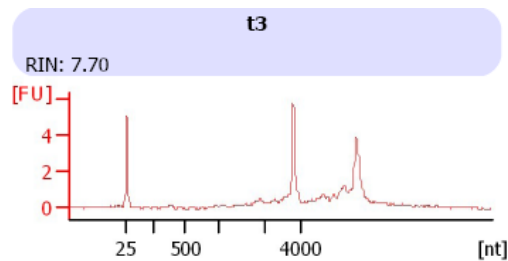
# Etapes clés

L'essentiel de la mise au point a porté sur :

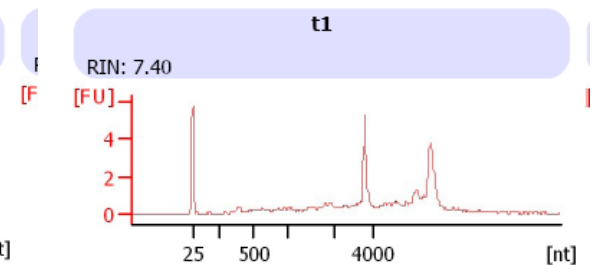
- la fixation avant coloration pour un arrachage spécifique des zones d'intérêt
- la coloration des lames
- le paramétrage de la puissance et de la durée d'impact du laser
- les conditions de conservation de l'ARN (1h sous vide et séquence de récolte sur 2h30 maximum )
- Qté ARN extrait : 200 à 400 ng/échantillon (2 à 3 mm<sup>2</sup>)



30 min



1h15



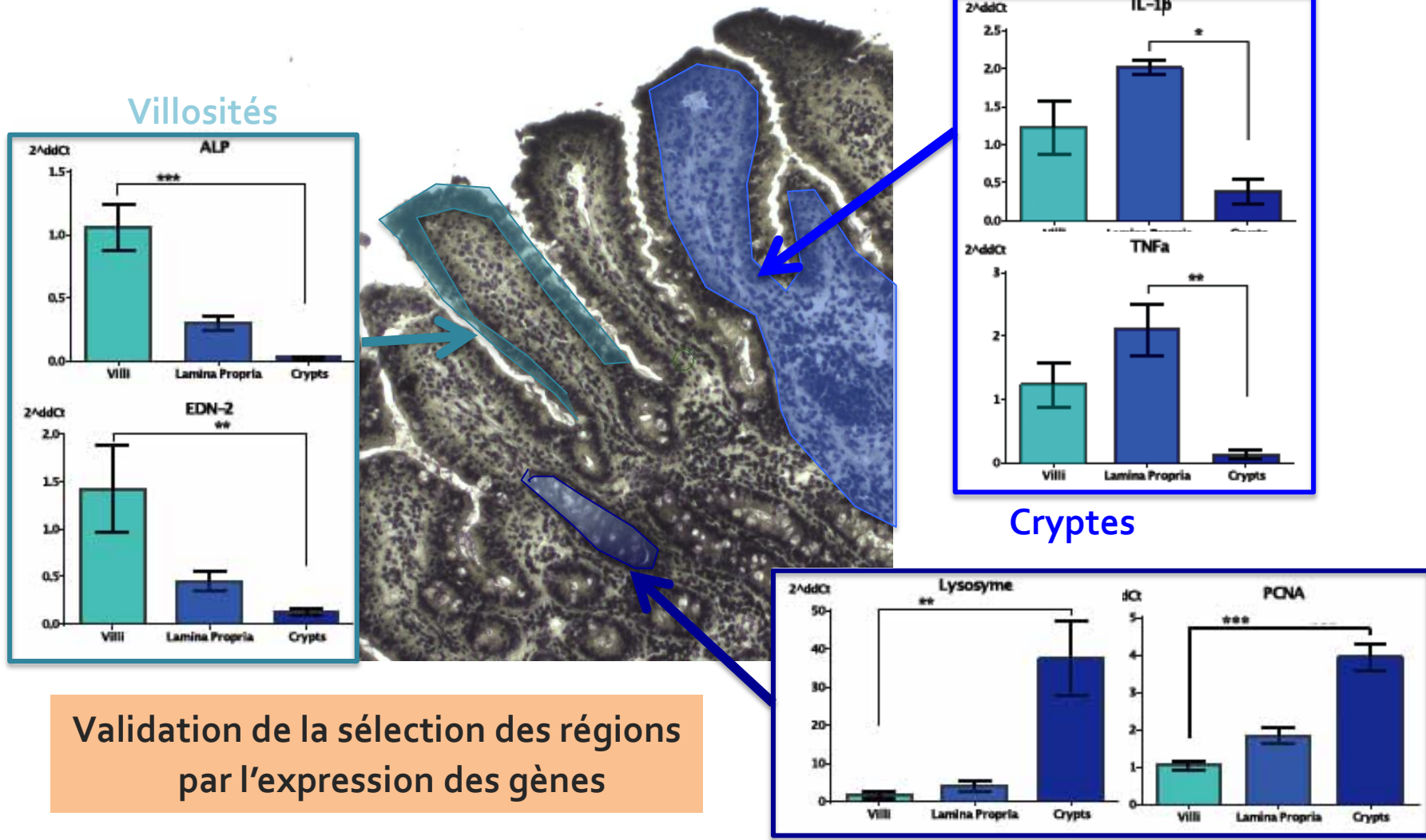
2h30

Qualité de l'ARN par mesure du RIN sur puce Agilent

# Microdissection des cryptes, villosités et lamina propria

Goubeyre et al, 2015

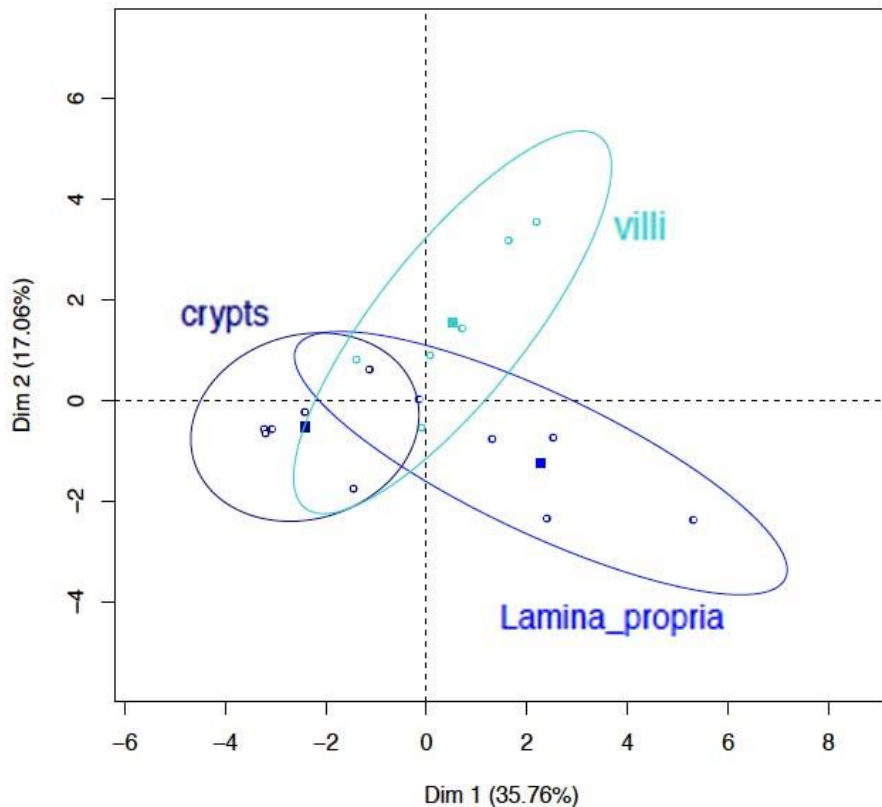
- coupes de jéjunum de 6 animaux
- sélection des régions villosité/crypte/lamina propria



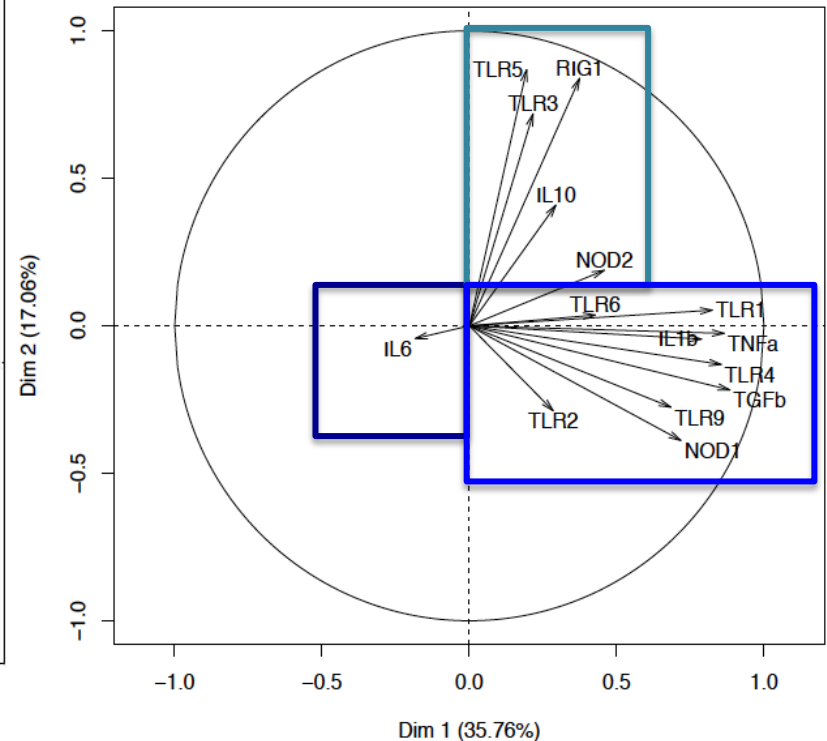
# Expression des gènes des récepteurs PRR et gènes associés

- Pattern recognition receptors (PRR) : TLR (1 à 10); NLR (NOD1 et 2, NALP3); RLR (RIG-I)
- Gènes cibles: IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$
- Cytokines anti-inflammatoires: IL-10, TGF $\beta$

Confidence ellipses around the categories of group



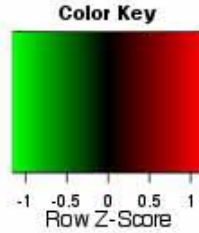
Variables factor map (PCA)



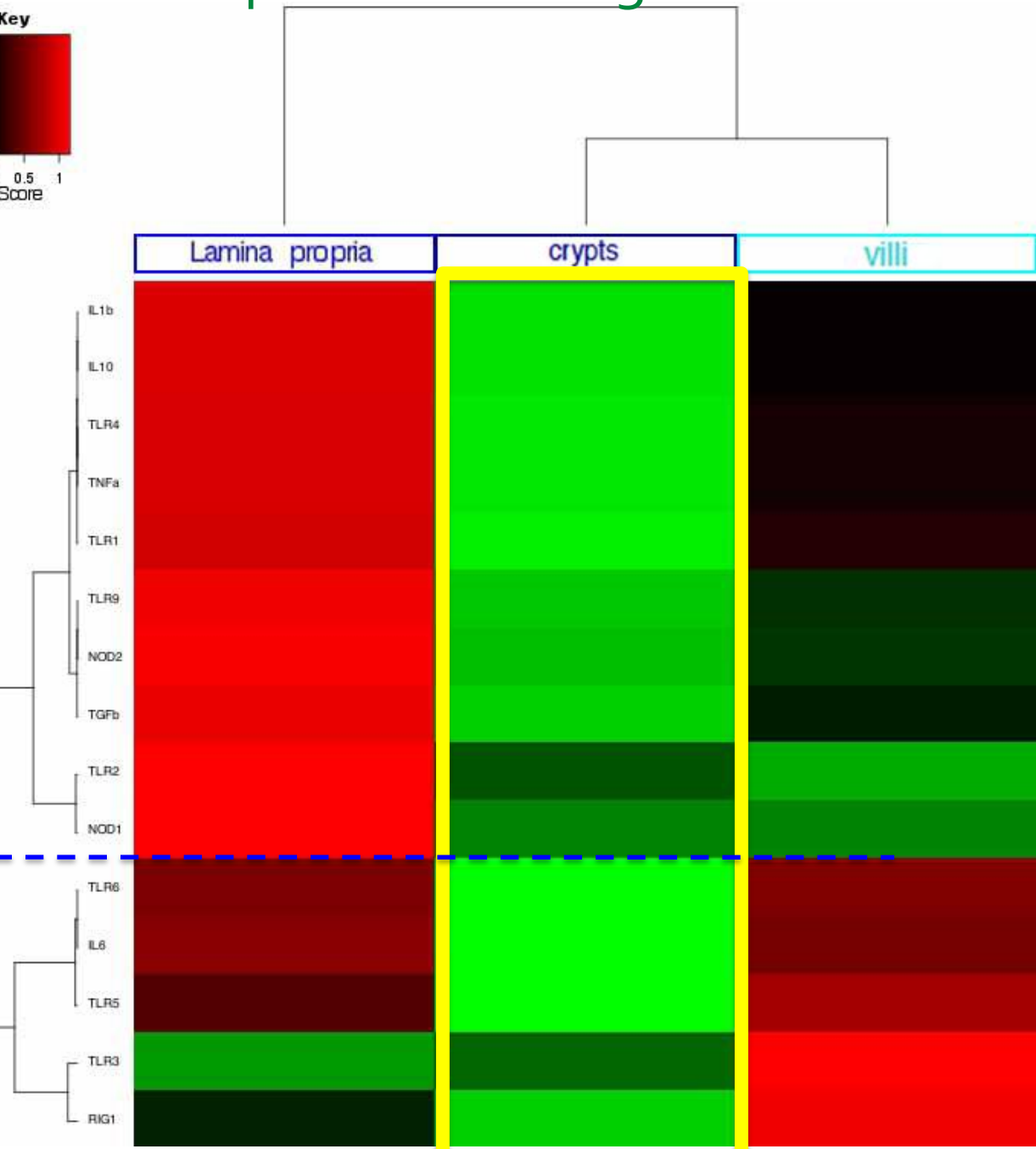
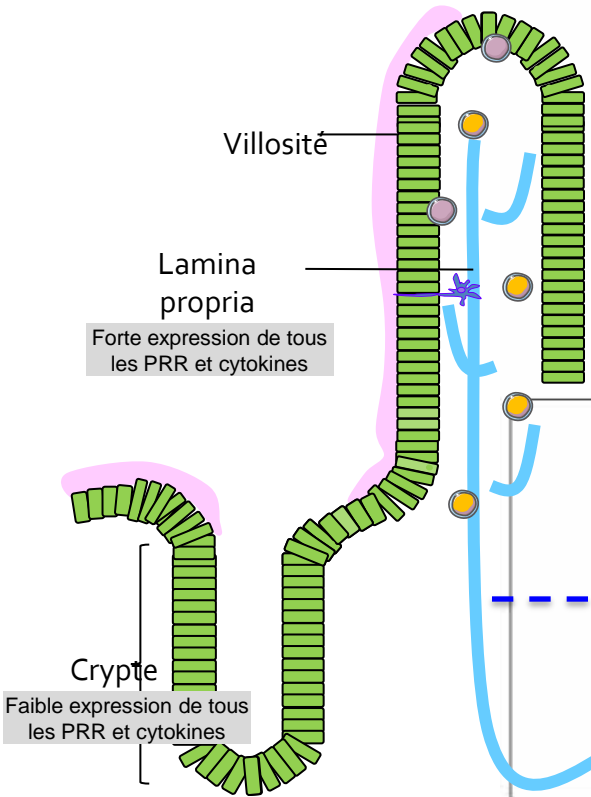
L'expression des gènes permet de discriminer les 3 tissus



# Expression des gènes des récepteurs PRR et gènes associés

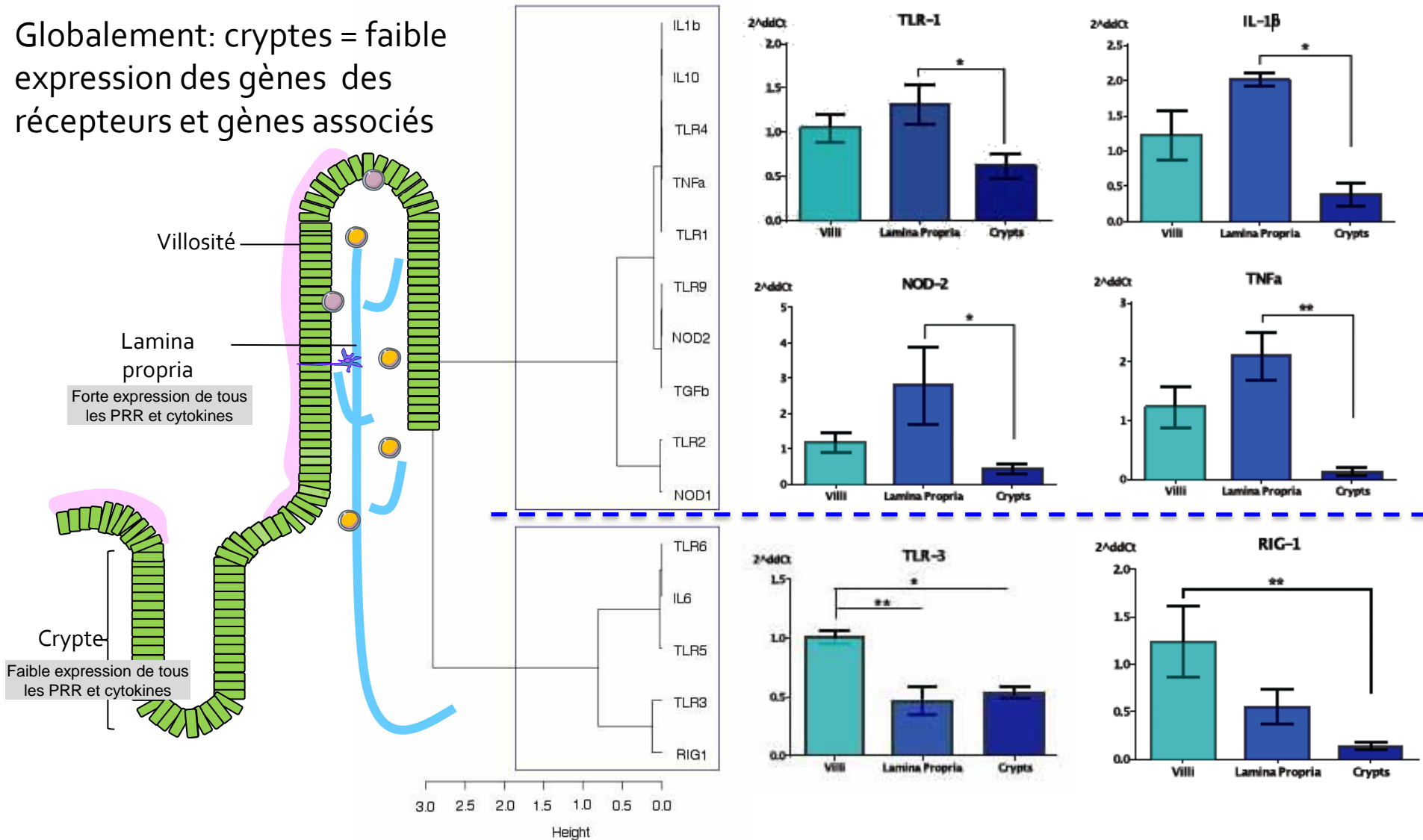


Globalement: cryptes = faible expression des gènes des récepteurs et gènes associés



# Expression des gènes des récepteurs PRR et gènes associés

Globalement: cryptes = faible expression des gènes des récepteurs et gènes associés



# Conclusion

Nous avons montré au cours de cette étude de faisabilité que la méthode de microdissection permettait de discriminer l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire selon des régions spécifiques choisies au sein de la muqueuse intestinale.

D'autres méthodes d'analyse pourront être envisagées en aval :

- étude de l'expression des gènes par microarray
- étude de l'expression de protéines sans à priori, avec méthode type analyse protéomique LC-MS/MS)

# Perspectives

L'objectif prioritaire de notre équipe est d'évaluer la toxicité de composés naturels toxiques produits par les moisissures : les mycotoxines.

Après leur ingestion, le tissu intestinal est la première cible de ces contaminants alimentaires.

La méthode de microdissection laser sera un outil privilégié pour évaluer l'impact sur des régions spécifiques de la muqueuse intestinale de l'exposition aux mycotoxines.

# Remerciements

## **Equipe Biosynthèse et Toxicité des Mycotoxines**

Pascal Gourbeyre  
Joëlle Laffitte  
Isabelle P. Oswald

## **Genephyse**

Agnès Bonnet  
Francis Benne

## **Plateforme FR AIB**

Yves Martinez

## **Plateforme transcriptomique (GeT - TRiX)**

Yannick Lippi



ALIMENTATION  
AGRICULTURE  
ENVIRONNEMENT

