

RELATIONS ENTRE PROTEINES DE LA MATRICE ORGANIQUE DE LA COQUILLE ET QUALITE DE L'ŒUF

Gautron Joël¹, Hincke Max², Garcia-Ruiz Juan-Manuel³, Vidal Mary-Laure¹, Nys Yves¹

¹ *Station de Recherches avicoles, 37380 Nouzilly, France*

² *Department of cellular and molecular medicine, University of Ottawa, Canada.*

³ *Instituto andaluz de Ciencias de la Tierra-CSIC. 18002 Granada, Spain*

Relations entre protéines de la matrice organique de la coquille et qualité de l'œuf

La coquille de l'œuf de poule contient des protéines qui ont fait l'objet d'un grand nombre d'études. Ces protéines et les gènes codant pour celles-ci ont été identifiés et caractérisés. Ces protéines participent à la défense naturelle de l'œuf contre la contamination bactérienne, de par leur rôle lors de la formation de la coquille et/ou de par leurs propriétés antibactériennes.

L'implication de ces protéines dans le contrôle de la minéralisation de la coquille est démontrée par différents éléments expérimentaux. Des protéines originales sont présentes uniquement dans la coquille et sont spécifiquement exprimées dans les tissus où elle se forme, certaines étant surexprimées lors de la calcification. Ces molécules interagissent in vitro avec la partie minérale de la coquille (carbonate de calcium) et modifient la cinétique de précipitation et la morphologie des cristaux, donc la microstructure de la coquille et, par conséquent, ses propriétés mécaniques. Nous avons également mis en évidence une modification de la composition des constituants organiques de la coquille en fonction du processus de calcification et établi une relation quantitative entre les protéines et la solidité de la coquille.

Des protéines connues pour leurs propriétés antibactériennes telles que le lysozyme et l'ovotransferrine sont aussi présentes dans la coquille de l'œuf. Récemment, nous avons mis en évidence une protéine, l'ovocalyxin-36, qui est reliée de par sa séquence protéique et sa structure génomique avec des familles de protéines (lipopolysaccharide binding proteins (LBP), bactericidal permeability increasing protein (BPI) and Plunc families proteins) ayant des propriétés antibactériennes utiles dans la défense contre les microorganismes. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que l'ovocalyxine-25 appartenait à la famille des inhibiteurs de protéases à sérine qui est connue pour être impliquée dans l'inhibition de la pénétration des microorganismes dans les tissus. Les protéines de la matrice de la coquille participeraient donc à la défense naturelle de l'œuf en consolidant cette structure mais également en préservant sa qualité hygiénique par leurs actions antibactériennes.

Relationships between eggshell matrix proteins and egg quality

The chicken eggshell proteins have been largely investigated during the last decade. Proteins and associated genes has been identified and characterised. Because of their role during eggshell formation and their anti-bacterial properties, eggshell proteins are thought to be important for the natural egg defences.

Various experimental evidences suggest a role for eggshell matrix proteins during mineralization. Indeed, these novel specific eggshell matrix proteins are only expressed in tissues where eggshell mineralization takes place and some are highly stimulated during shell formation. These proteins also interact in vitro with the shell mineral (calcium carbonate) and modify crystal morphology and resulting shell microstructure to influence mechanical properties of the shell. In addition, the matrix composition changes during various stages of eggshell calcification and is associated with the modified eggshell mechanical properties that are observed in different physiological states (age or molt).

Antibacterial proteins (lysozyme, ovotransferrine) are present in the eggshell. Recently, we cloned ovocalyxin-36, a novel eggshell protein which is related to lipopolysaccharide binding proteins (LBP), bactericidal permeability increasing protein (BPI) and the Plunc family of proteins. Another novel eggshell matrix protein (Ovocalyxin-25) has been cloned and characterized as a serine proteinase inhibitor which could inhibit bacterial penetration in tissues.

The chicken eggshell matrix proteins are therefore involved in natural egg defences by reinforcing the mineral structure, and by introducing antibacterial activity which preserves the hygienic quality of eggs.

INTRODUCTION

L'œuf de poule possède 2 systèmes naturels de défenses très performants. Le premier est une barrière physique, la coquille de l'œuf. En effet, l'intégrité de celle-ci empêche toutes pénétrations bactériennes dans l'œuf. L'œuf possède également des systèmes chimiques de défenses principalement dans le blanc d'œuf qui est constitué notamment de protéines qui possèdent des propriétés antibactériennes (bactériostatiques et bactéricides). Qu'ils soient chimiques ou physiques, ces systèmes de défenses mettent en jeu des protéines contenues dans les différents constituants de l'œuf.

Cette étude a pour but de décrire le rôle des protéines de la coquille de l'œuf dans la mise en place de ces systèmes.

STRUCTURE ET FORMATION DE LA COQUILLE

La coquille de l'œuf est une structure parfaitement ordonnée et structurée qui se forme dans l'utérus (Nys et al., 2004). La minéralisation a lieu en 19 heures environ dans un liquide acellulaire, le fluide utérin, qui baigne l'œuf au cours de sa formation. La calcification de la coquille se déroule selon 3 stades principaux. (i) Le stade initial (6 à 10 heures après l'ovulation du jaune) correspond à l'initiation (nucléation) de la minéralisation de la coquille sur des noyaux organiques (noyaux mamillaires) déposés en surface des membranes coquillières. (ii) au cours de la deuxième phase de croissance, il y a un dépôt rapide et intense de coquille (0,32 g/heure) pendant 12 heures qui aboutit à une structure calcifiée de 300 µm d'épaisseur environ. Puis au cours du stade terminal, (iii) 2 heures avant la ponte, la minéralisation de la coquille s'arrête pour faire place au dépôt de la couche la plus externe de l'œuf (la cuticule)

LA MATRICE ORGANIQUE

La coquille est majoritairement constituée de minéraux (carbonate de calcium sous forme de calcite) associés à un faible pourcentage de constituants organiques (3,5 %) qui sont répartis dans les membranes coquillières et les parties calcifiées de la coquille où elle est appelée matrice organique. Les protéines de la matrice ont fait l'objet d'un grand nombre d'études au cours de ces 10 dernières années. Ces molécules sont classées en 3 groupes (tableau 1).

Les protéines du blanc d'œuf présentes dans la coquille. Il s'agit de l'ovalbumine (Hincke 1995) du lysozyme (Hincke et al., 2000) et de l'ovotransferrine (Gautron et al., 2001a). L'utérus (organe de formation de la coquille) peut synthétiser ces protéines mais elles pourraient également résulter d'une diffusion passive le long de l'oviducte.

Le second groupe est constitué de protéines ubiquitaires présentes dans d'autres tissus et fluides.

Ainsi l'ostéopontine, une glycoprotéine phosphorylée présente dans l'os, les reins et de nombreuses sécrétions, a été identifiée dans la coquille (Pines et al., 1995). L'ostéopontine pourrait être un modulateur de la précipitation de carbonate de calcium. Récemment la clusterine, une protéine sécrétoire a aussi été identifiée dans la coquille et le blanc d'œuf. La clusterine agirait en empêchant la précipitation prématurée des composants de la matrice organique avant et pendant l'assemblage du réseau protéique nécessaire à la minéralisation ordonnée de la coquille (Mann et al., 2003).

Le dernier groupe est constitué de protéines spécifiques de la coquille de l'œuf et non identifiées au préalable. Ces protéines sont uniquement synthétisées par les tissus responsables de la formation de la coquille (utérus et isthme rouge). L'ovocleidin-17 est la première protéine de la coquille qui a été purifiée (Hincke et al., 1995). Son rôle n'est pas clairement établi. Elle pourrait agir comme protéine de structure de la matrice organique assemblée. L'ovocleidin-116 est observée dans toute la couche palissadique de la coquille (Hincke et al., 1999). Elle constitue le cœur protéique de protéoglycans et jouerait un rôle important lors de la formation de la coquille. L'ovocalyxine-32 est très abondamment sécrétée lors de la phase terminale de formation de la coquille et par conséquent, est majoritairement présente dans les couches les plus externes de la coquille (Gautron et al., 2001b). De ce fait, il a été suggéré que cette protéine serait associée à l'arrêt de la calcification.

Tableau 1 – Les différentes protéines identifiées dans la matrice organique de l'œuf de poule

Protéines du blanc d'œuf

Ovalbumine
Lysozyme
Ovotransferrine

Protéines ubiquitaires

Osteopontine
Clusterine

Protéines spécifiques

Ovocléidin-116
Ovocléidin-17
Ovocalyxine-36
Ovocalyxine-32
Ovocalyxine-25
Ovocalyxine-21

Récemment l'ovocalyxine-36, -25 et -21 ont également été clonées (Gautron et al., *en préparation*). L'ovocalyxine-36 est fortement exprimée durant la phase intense de calcification et est surexprimée après l'entrée de l'œuf dans l'utérus. L'ovocalyxine-25 possède des domaines fonctionnels analogues à ceux de la lustrine A, une protéine de la

couche nacréée des coquilles des mollusques et des perles (Shen et al., 1997). Comme pour la coquille, ces structures sont également formées selon des mécanismes de minéralisation en milieu biologique (biominéralisation).

ROLE DE LA MATRICE ORGANIQUE SUR LES PROPRIETES MECANIQUES DE LA COQUILLE

La matrice organique de la coquille de l'œuf de poule joue un rôle fondamental lors de la fabrication de la coquille et donc dans l'établissement de ses propriétés mécaniques. Cette hypothèse est confortée par des observations expérimentales :

(i) La coquille contient des protéines nouvelles, spécifiques de ce milieu et uniquement synthétisées par les tissus responsables de sa formation

(ii) Les études de régulation de l'expression des gènes codant pour ces protéines montrent que l'expression de ces protéines de la matrice est fortement stimulée lors de la maturité sexuelle et de la mise en place de l'oviducte mature et fonctionnel. De plus, les ARN messagers codant pour l'ovocalyxin-36, -21 et l'ovocleidin-116 sont surexprimés lors de la calcification de la coquille (figure 1).

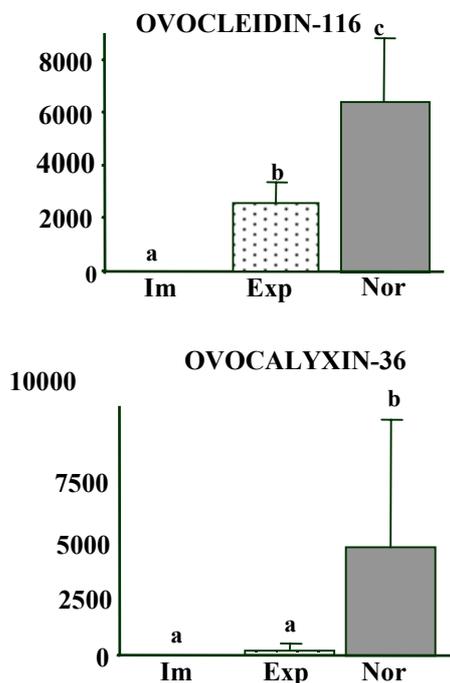


Figure 1 - Expression des ARNm codant pour l'ovocleidin-116 et l'ovocalyxine-36 dans des utérus de poule collectés chez des poulettes immatures (Im), chez des poules dont l'œuf a été expulsé par injection de prostaglandines avant la minéralisation (Exp) et chez des poules ayant un œuf en cours de calcification (Nor).

(iii) la composition de la matrice organique varie selon les différentes phases de calcification au cours de la formation de la coquille. Ainsi, à chaque stade de minéralisation de la coquille (initiation, croissance rapide, arrêt) correspond un profil protéique spécifique observé dans le fluide utérin (Gautron et al., 1997).

(iv) Les constituants organiques du fluide utérin interagissent *in vitro* avec la phase minérale de la coquille. La cinétique de formation de la calcite ainsi que la morphologie des cristaux de calcite sont fortement modifiées par la présence de constituants organiques extraits de la coquille (Gautron et al., 1996) et de fluide utérin (Dominguez-Vera et al., 2000) dans le milieu de formation. Un effet similaire est observé avec des protéines isolées de la coquille telles que le lysozyme et l'ovotransferrine (Hincke et al., 2000 ; Gautron et al., 2001a).

La nature des interactions qui se produisent entre les constituants de la matrice et le processus de minéralisation sont peu connues. De nombreux paramètres physiques (hydrophobicité, charge...) modifient les mécanismes d'adsorption ou de répulsion de ces protéines vis-à-vis de la calcite et par conséquent la morphologie des cristaux de calcite déposés sur la coquille (Nys et al., 2004). Ces modifications affectent la texture de la coquille (taille et orientation des cristaux) et donc les propriétés mécaniques de celle-ci. Cette hypothèse suppose l'existence d'une relation quantitative entre les protéines de la coquille et des variations de la qualité de la coquille. Ainsi Ahmed et al. (in press) ont utilisé le modèle de la mue pour obtenir des œufs qui proviennent des mêmes poules, avec des poids d'œufs et de coquilles identiques avant et après mue, mais qui présentent des coquilles différentes du point de vue de leurs propriétés mécaniques (faibles avant mue et fortes après mue). Ces auteurs ont ainsi pu montrer que certaines protéines spécifiques de la coquille se trouvaient en quantités plus importantes après la mue quand la qualité de la coquille était améliorée. A l'inverse, les protéines du blanc qui ne sont pas spécifiques du processus de minéralisation sont diminuées après la mue. Cette relation entre matrice organique de la coquille et sa solidité est attestée par la démonstration d'association entre du polymorphisme de gènes codant pour les protéines de la matrice (ovalbumine, ovocleidin-116, ostéopontine) et la solidité de la coquille (déformation, résistance à la rupture ou épaisseur) (Dunn, Bain, Gautron, Joseph, Edmond, Wilson, Schmutz, Preisinger, Nys, en préparation)

PROPRIETES ANTIBACTERIENNES DES PROTEINES DE LA MATRICE ORGANIQUE

Des protéines antibactériennes sont aussi présentes dans la matrice organique de la coquille. C'est le cas de l'ovotransferrine (Gautron et al., 2001a), un inhibiteur de la croissance des bactéries à coloration de gram négative par privation de fer, et du lysozyme (Hincke et al., 2000) qui hydrolyse la paroi des bactéries à coloration de Gram positive. Récemment, nous avons identifié deux protéines spécifiques de la coquille, l'ovocalyxine-36 et -25, qui présentent des caractéristiques connues pour conférer à ces protéines des propriétés antibactériennes. L'analyse des bases de données (blastp) a montré une homologie de séquence significative (E-value compris entre 10^{-4} et 10^{-28}) entre l'ovocalyxine-36 et les protéines LBP (lipopolysaccharide binding proteins), BPI (bactericidal increasing permeability proteins) et celles de la famille Plunc (Gautron et al., en préparation). Ces protéines sont connues pour être impliquées dans la défense précoce contre l'agresseur et pour participer à l'immunité passive. Les protéines LBP et BPI se lient aux lipopolysaccharides de la paroi des bactéries à coloration de Gram négative provoquant alors la mort des bactéries. Les protéines de la famille Plunc participent à la reconnaissance précoce des bactéries dans les voies respiratoires supérieures. Ces analogies sont confirmées par des analyses des domaines fonctionnels de la séquence qui montrent que l'ovocalyxine-36 possède 2 domaines fonctionnels identiques à ceux présents dans LBP et BPI.

L'analyse des séquences de l'ovocalyxine-25 indique la présence de 2 domaines : Un domaine WAP que l'on retrouve généralement dans de petites protéines qui contiennent 8 cystéines impliqués dans des ponts disulfures internes et le domaine appelé « Kunitz bovine pancreatic inhibitor ». Ces 2 domaines sont caractéristiques de certains inhibiteurs de protéases à sérine. Tout comme l'ovocalyxine-25,

la chéliomanine, une protéine de l'œuf d'une tortue marine de la mer rouge, contient ces 2 domaines (Kato et Tominaga, 1979). Les inhibiteurs de protéases sont associés à de nombreuses fonctions biologiques parmi lesquelles on trouve la capacité à limiter la virulence de certains microorganismes.

Ce rôle antibactérien a été confirmé par Mine et al. (2003) qui ont décrit une activité antimicrobienne de la matrice soluble de la coquille contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. Cet effet est obtenu à des concentrations faibles de matrice organique (25 µg/ml) pour lesquelles le lysozyme se trouve en quantité trop faible pour expliquer à lui seul l'effet obtenu. Ces données confirment que la matrice organique contient d'autres molécules antibactériennes telles que, par exemple, l'ovotransferrine l'ovocalyxine-36 et -25. Ces protéines antibactériennes n'expriment leur rôle protecteur que sous forme soluble aussi il est probable qu'elle agissent dans le fluide utérin lors de la calcification ou juste après la ponte avant que la coquille et ses pores soient déshydratés.

CONCLUSION

La coquille de l'œuf de poule est un milieu complexe qui contient un nombre important de protéines identifiées au cours des dix dernières années. Les observations expérimentales montrent que ces protéines participent à la mise en place de la structure minérale de la coquille et par conséquent, détermineraient ses propriétés mécaniques. Ces protéines agiraient également en tant qu'agent antibactérien dans le fluide utérin au cours de la formation de l'œuf, ou au cours des premières heures qui suivent la ponte.

L'identification de ces protéines et leur utilisation en tant que marqueurs biologiques potentiels des défenses naturelles de l'œuf ouvrent des perspectives de sélection de souches de poules pondeuses pondant des œufs plus résistants aux agressions bactériennes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahmed A., Rodriguez-Navarro A.B., Vidal M.L. Gautron J., Garcia-Ruiz J.M., Nys Y. 2004. Br. Poult. Sci., in press.
- Dominguez-Vera J.M., Gautron J., Garcia-Ruiz J.M., Nys Y., 2000. Poult. Sci., 79, 901-907.
- Gautron J., Bain M., Solomon S.E., Nys Y., 1996. Br. Poult. Sci., 37, 853-886.
- Gautron J., Hincke M.T., Nys Y., 1997. Connect. Tissue Res., 36(3), 195-210.
- Gautron J., Hincke M.T., Panhéleux M., Garcia-Ruiz J.M., Boldicke T., Nys Y., 2001a. Connect. Tissue Res., 42(4), 255-267
- Gautron, J., Murayama E, Vignal A., McKee M.D., Vidal M.L., Nys Y., Hincke M.T. 2005. En préparation .
- Gautron J., Hincke M.T., Mann K., Panhéleux M., Bain M., McKee M.D., Solomon S.E., Nys Y. 2001 b. J. Biol. Chem., 276, 39243-39252.
- Hincke M.T., 1995. Connect. Tissue Res., 31., 227-233.
- Hincke M.T., Tsang C.P., Courtney M., Hill V., Narbaitz R., 1995. Calcif. Tissue Int., 56, 578-583.
- Hincke M.T., Gautron J., Tsang C.P., McKee M. D., Nys Y. 1999. J. Biol. Chem., 274, 32915-32923.
- Kato, I. Tominaga, N. 1979. Fed. Proc. 38, 832-832
- Mann K., Gautron J., Nys Y., McKee M.D., Bajari T., Schneider W.J., Hincke M.T. (2003). Matrix Biology. 22 397-407.
- Mine Y., Oberle C., Kassaiy Z. 2003. J. Agric. Food Chem., 51, 249-253.
- Nys Y., Gautron J., Garcia-Ruiz J.M., Hincke M.T. 2004. C.R. Palevol, 3, 549-562.
- Pines M., Knopov V., Bar A., 1995. Matrix Biol., 14, 765-771.
- Shen X, Belcher A.M., Hansma P.K., Stucky G.D., Morse D.E. 1997. J. Biol. Chem., 272, 32472-32481.