

CARACTERISATION DES PROTEINES DE LA MEMBRANE VITELLINE, UNE STRUCTURE IMPORTANTE POUR LA QUALITE DES ŒUFS DE POULE

Brégeon Mégane¹, Labas Valérie², Combes-Soia Lucie², Chesse Magali¹, Rehault-Godbert Sophie¹, Guyot Nicolas¹

¹*Biologie des Oiseaux et Aviculture - BOA, INRA, Université de Tours -37380 Nouzilly*

²*PAIB, PRC, INRA, Université de Tours - 37380 Nouzilly, France*

megane.bregeon@inra.fr

RÉSUMÉ

La membrane vitelline (MV) de l'œuf, située à l'interface entre le blanc et le jaune de l'œuf, est formée de deux couches protéiques : les membranes vitellines interne (MVI) et externe (MVE). Elle possède un rôle majeur dans la fécondation, l'embryogenèse et la protection de l'embryon. Près de 140 protéines différentes composent la MV, cependant leur répartition dans les 2 couches et leur(s) rôle(s) physiologique(s) restent pour la plupart inconnus. L'objectif de cette étude est donc de déterminer la composition protéique de chacune des couches de la MV et d'en déduire des fonctions qui leur sont spécifiques. La MVE et la MVI ont été séparées à partir de MVs d'œufs frais et les protéines de ces deux couches ont été indépendamment solubilisées et analysées par SDS-PAGE. Les protéines ont ensuite été identifiées par spectrométrie de masse à haute résolution et leurs fonctions ont été attribuées à partir des annotations de l'ontologie des gènes. Au total, 23 protéines ont été identifiées à l'issue de ce travail préliminaire : 9 sont communes aux deux couches de la membrane, 8 sont attribuées à la MVE et 6 à la MVI. D'après ces données, la couche interne semble intervenir dans la fertilisation tandis que la couche externe semble avoir un rôle de protection.

ABSTRACT

Characterization of the proteins of the vitelline membrane, an important structure for the chicken egg quality. The vitelline membrane (VM), located between the albumen and the egg yolk, is composed of two protein layers: the inner (IVM) and the outer (OVM) vitelline membrane layers. VM has a major role in fertilization, embryogenesis and protection of the embryo. Nearly 140 different proteins make up this membrane, but their distribution in both layers and their physiological role remain mostly unknown. The aim of this study is to determine the protein composition of each layer and thus to propose assumptions regarding their specific functions. IVM and OVM were separated from the VM of fresh eggs, and the proteins from both layers were independently solubilized and analyzed by SDS-PAGE. The proteins were then analyzed by high resolution mass spectrometry and the functions of each of the identified proteins were awarded using annotations of the gene ontology. A total of 23 proteins were identified in this preliminary study: 9 are common to both layers of the VM, 8 are specific to the OVM and 6 are specific to the IVM. According to these data, the inner layer seems to be involved in the fertilization, while the outer layer seems to have a protective role.

INTRODUCTION

La membrane vitelline (MV) est une fine membrane acellulaire translucide située entre le blanc et le jaune, ayant une épaisseur de 10 μm environ (Bellairs, 1963). Elle est composée de deux couches protéiques : la membrane vitelline interne (MVI) en contact avec le jaune, synthétisée au niveau de l'ovaire, et la membrane vitelline externe (MVE) en contact avec le blanc, sécrétée au niveau de l'infundibulum (Bain, 1969). Cette membrane est composée de nombreuses protéines. Une analyse protéomique de la MV a déjà en effet permis de mettre en évidence 137 protéines différentes, avec des niveaux d'abondance variables (Mann, 2008), mais la répartition de ces protéines entre les deux couches n'est pas connue. Les mécanismes d'élaboration des deux couches la constituant restent également à caractériser.

La MV joue un rôle crucial dans le maintien de la qualité sanitaire et dans les caractéristiques technologiques de l'œuf de consommation. Pour l'œuf à couver, elle est essentielle à la fécondation, au bon développement embryonnaire tout en assurant une protection de l'embryon. La MV limite les échanges entre le blanc et le jaune et constitue l'ultime barrière contre la pénétration bactérienne dans le jaune, milieu hautement favorable à la croissance des microorganismes. C'est une barrière de protection à la fois physique et chimique car elle contient de nombreuses protéines antimicrobiennes, telles que le lysozyme, l'ovotransferrine ou la bêta-défensine 11 aviaire (Mann, 2008). La MV fait donc partie des différents systèmes de défense de l'œuf qui contribuent à la qualité sanitaire des œufs de consommation et à couver. La MV a également une fonction importante dans l'industrie des ovoproduits. En effet, la qualité de séparation du blanc et du jaune dépend principalement de l'intégrité structurale de la MV. Sa solidité permet de limiter le taux de contamination du blanc par le jaune lorsque les casseries d'œufs cherchent à fabriquer du blanc pâtissier. Compte-tenu de l'effet négatif du jaune, même à l'état de trace, sur les propriétés moussantes du blanc d'œuf (Wang et Wang, 2009) et sur ses capacités à résister à l'invasion microbienne, la résistance de la MV est donc un paramètre critique pour la maîtrise de la qualité du blanc d'œuf. Enfin, la MV assure plusieurs fonctions physiologiques dans la reproduction aviaire. Tout d'abord, elle permet l'interaction entre l'ovocyte et les spermatozoïdes (Okumura *et al.*, 2004). Pendant les premiers jours d'incubation, elle est impliquée dans la protection de l'embryon (contre le pH alcalin du blanc et les éventuelles contaminations microbiennes) et dans le développement embryonnaire précoce (New, 1959). Enfin, elle sert de matrice pour la croissance du sac vitellin, une annexe extra-embryonnaire vascularisée qui entoure progressivement le jaune tout en dégradant la MV (Haas *et al.*, 1976).

La MV est une partie de l'œuf qui reste relativement peu étudiée. Le maintien de sa structure et de ses

propriétés physiques et fonctionnelles répond cependant à des enjeux d'ordre sanitaire et économique, aussi bien pour la filière de l'œuf de consommation (œuf coquille, ovoproduits) que celle de l'œuf à couver. L'objectif de ce travail consiste à étudier et comparer les protéomes des deux couches de la MV (MVE et MVI), afin de mieux comprendre sa structure en lien avec ses propriétés physiques et fonctionnelles.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1 Prélèvement des membranes vitellines

Des jaunes d'œufs, prélevés à partir d'œufs frais de poules pondeuses ISA Brown âgées de 60 semaines (Hendrix ISA, Ephrata USA) ont été plongés dans un tampon Tris-HCl 10 mM (pH 8) réfrigéré à 4°C. La MV a été prélevée sur les jaunes en immersion à l'aide de pinces. Elle a été lavée dans 3 bains de tampon Tris-HCl 10 mM (pH 8), puis étalée dans une boîte de pétri contenant un tampon Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM (pH 8), où les deux couches ont été séparées au moyen de pinces fines, sous une loupe binoculaire. Des pools de 10 MVI indépendantes et des pools de 10 MVE ont été réalisés pour l'analyse des profils protéiques par SDS-PAGE et pour l'analyse protéomique préliminaire.

1.2 Solubilisation et analyse SDS-PAGE des protéines

Les échantillons ont été lyophilisés, réduits en poudre et solubilisés à l'aide du surfactant ProteaseMax (Promega) 0,2%, urée 8 M, sous agitation constante pendant 50 min à 4°C, selon les recommandations du fournisseur (1 mg de protéines dans 400 μL de surfactant). La concentration en protéines des échantillons a été mesurée à l'aide du kit de dosage « DC Protein Assay » (Biorad) en utilisant une gamme d'albumine sérique bovine. Les protéines de la MVE et de la MVI ont été analysées par SDS-PAGE sur gel à 15% d'acrylamide en conditions dénaturantes. Dix microgrammes de protéines ont été déposées par puits. La migration a été réalisée pendant 20 min à 80 V dans le gel de concentration puis pendant 1,5 h à 120 V dans le gel de séparation. La détection des protéines a été réalisée au bleu de Coomassie.

1.3 Analyse protéomique des membranes

Les protéines ont été analysées par GeLC-MS/MS. Brièvement, 10 μg de protéines ont été inclus dans un gel d'acrylamide 10% sans fractionnement. Cette approche permet l'obtention d'une bande unique, permettant l'analyse d'une seule bande contenant toutes les protéines soit de la MVE, soit de la MVI. Cette bande a été découpée puis les protéines ont été digérées « in-gel » par la trypsine bovine à 12.5ng/ μL (Sequencing grade, Roche diagnostics, Paris, France) durant toute une nuit. Les digestats ont été dessalés et

concentrés en ligne par une précolonne Acclaim PepMap100 C18 trap puis séparés sur une colonne analytique phase inverse Acclaim PepMap C18 (ThermoFisher) avec un débit de 300 nL/min (équilibration de la colonne avec 96% de solvant A (0.1% acide formique/2% acétonitrile) et 4% de solvant B (80% acétonitrile/15,9% H₂O/0,1% acide formique), gradient de 4 à 60% B en 180 min et palier à 99% de B pendant 10 min). Les peptides ont été analysés par un spectromètre de masse LTQ Velos Orbitrap (Thermo Electron, US) (acquisition des données faite de façon automatique entre les modes MS à haute résolution (R 60000) et MS/MS (fragmentation à basse résolution)). Les données MS et MS/MS, ont été confrontées à la taxonomie chordata de la banque NCBI grâce au serveur Mascot v2.6 (Matrix Science) via le logiciel Proteome Discoverer v2.1 (ThermoFisher) (5 ppm de précision de masse sur MS et 0.8Da sur MS/MS, modifications post-traductionnelles prises en compte : carbamidométhylation, N-terminal acétylation et oxydation des méthionines). Les données obtenues ont été intégrées au logiciel Scaffold (v 4.8.4, Proteome Software) et l'abondance relative (%) des protéines au sein de chaque échantillon a été établie sur la base du score Exponentially modified protein abundance index (EmPAI). A partir de ces données, une liste de protéines candidates a été établie, avec au moins deux peptides uniques et 95% de probabilité d'identification pour les protéines et les peptides dans le logiciel Scaffold.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Afin de caractériser aussi précisément que possible le contenu en protéines de chacune des deux couches de la MV, la séparation des deux membranes (MVE et MVI) et l'extraction des protéines à partir de ces membranes ont d'abord été mises au point en jouant sur le pH, la concentration saline et le type de tampon. Cette mise au point était nécessaire pour trouver les conditions permettant d'obtenir le maximum d'information dans chacune des couches de la MV. Les protéines solubilisées à partir de la MVE et de la MVI ont ensuite été analysées par SDS-PAGE, montrant des profils protéiques différents entre les deux couches de la MV (Figure 1). La MVE présente deux protéines majeures, avec des masses apparentes de 14 kDa et 16 kDa, et plusieurs protéines de plus hauts poids moléculaires (>40kDa) en plus faible abondance apparente. Deux protéines majeures sont identifiées à 15 kDa et 14 kDa dans la MVI, ainsi qu'une multitude de protéines moins abondantes avec des masses >30 kDa.

Les protéines extraites à partir de la MVE et de la MVI ont été concentrées en une seule bande dans un gel SDS-PAGE, digérées par la trypsine et les peptides ont été analysés par nanoLC-MS/MS. Cette approche a permis d'identifier 23 protéines majeures

différentes au sein de la MV. Certaines protéines ont été détectées uniquement dans la MVE ou dans la MVI, tandis que d'autres ont été identifiées dans les deux couches (Tableau 1). Chacune des deux couches de la MV semble posséder des protéines ayant des fonctions spécifiques. En effet, la MVI contient des protéines « Zona pellucida » (ZP1, ZP3) qui ne sont pas retrouvées au sein de la MVE. Ces protéines sont impliquées dans l'interaction entre l'ovocyte et le spermatozoïde. Par exemple, ZP3 serait impliquée dans la réaction acrosomique (événement clé lors de la fécondation, Okumura *et al.*, 2004). ZP1 joue un rôle dans l'activation des spermatozoïdes lors de l'interaction spermatozoïde-ovocyte (Okumura *et al.*, 2004). Nos données confirment donc le rôle de la MVI dans la fécondation (Howarth, 1990), et révèlent la présence d'autres protéines dont la fonction reste à caractériser. En effet, 4 protéines identifiées uniquement au sein de cette couche ont des fonctions liées au métabolisme (ATP1A1, APOB, GPX3 et ACTG1), ce qui pourrait être lié au fait que la MVI est le support de croissance du sac vitellin (Yoshizaki *et al.*, 2000). La MVI contient également 5 protéines antimicrobiennes (LYZ, TF, AvBD11, BPIFB2, VMO1), également retrouvées dans la MVE. La présence de ces protéines laisse ainsi penser que la MVI pourrait également jouer un rôle antimicrobien, ou qu'il s'agit d'une contamination de la MVI par de la MVE lors de la séparation des deux couches. En ce qui concerne la composition en protéines de la MVE, sur 17 protéines identifiées, 8 sont décrites comme jouant un rôle antimicrobien (LYZ, TF, OVALX, AvBD11, BPIFB2, VMO1, BMSP, PTN). Trois d'entre elles (OVALX, PTN, BMSP) sont identifiées uniquement dans cette couche. Cette richesse en protéines antimicrobiennes laisse penser que la MV joue un rôle dans la défense contre les contaminations microbiennes (Tableau 1). La MVE est également composée d'inhibiteurs de protéases (TIMP3, SPIK5), alors qu'aucun d'eux n'est retrouvé au sein de la MVI. La couche externe pourrait également jouer un rôle dans le développement embryonnaire et la croissance cellulaire car elle contient des protéines intervenant dans ces fonctions (PTN, OLFML3, BPIFB2).

Cette étude a également permis de montrer que sur les 23 protéines identifiées, 9 sont retrouvées à la fois dans la MVE et dans la MVI (Tableau 1). Il est à noter que la MVI et la MVE sont étroitement associées et qu'au cours de la séparation des membranes, des résidus de MVE ont pu rester accrochés à la MVI et inversement. De même, malgré les nombreux lavages, des protéines du blanc demeurent possiblement associées à la MVE et des protéines du jaune à la MVI. Afin de s'en affranchir, il serait intéressant de prélever et d'analyser le contenu en protéines de la MVI au niveau des follicules, où elle ne s'est pas encore trouvée en

contact avec la MVE. En effet, la MVI est synthétisée au niveau de l'ovaire tandis que la MVE est sécrétée et déposée sur la MVI dans l'oviducte au niveau de l'infundibulum, après l'ovulation.

Certaines protéines identifiées dans cette étude n'ont pas été identifiées dans le protéome de la MV réalisé par Mann en 2008. Il s'agit de : GPX3, PTN et BMSP (Tableau 1). La détection de ces trois protéines est probablement liée à l'évolution du contenu des bases de données de protéines entre ces deux études espacées de 10 ans. GPX3 est spécifique à la MVI et pourrait protéger les cellules et les enzymes des dommages oxydatifs en catalysant la réduction du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes lipidiques par le glutathion. PTN et BMSP ont été identifiées uniquement dans la MVE. Elles possèdent un rôle antimicrobien (Guyot et al., 2016) et PTN, qui est également un facteur de croissance, pourrait être impliquée dans le développement embryonnaire et notamment le développement du sac vitellin.

L'expression de différents gènes codant des protéines identifiées dans cette étude par l'approche protéomique sera examinée dans différents tissus de la poule pondeuse (oviducte, ovaire, foie) par RT-qPCR, afin de préciser la spécificité et le lieu de synthèse des protéines de la MV. Pour les constituants de la MVI, il sera notamment intéressant d'étudier les cellules de la granulosa car elles sont en contact direct avec la MVI, mais aussi les cellules de la thèque et du foie, responsables de la synthèse des protéines du jaune et

de certains constituants de la MV) (Nishio, 2014 ; Bausek et al, 2000).

La MVE étant sécrétée au niveau de l'infundibulum, ce tissu a également été prélevé ainsi que du magnum (segment de l'oviducte responsable de la synthèse des protéines du blanc).

CONCLUSION

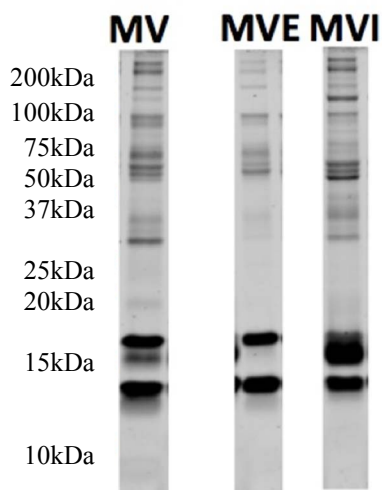
Cette étude préliminaire a permis de caractériser pour la première fois la composition en protéines majeures de la MVE et de la MVI. Certaines protéines ont été identifiées pour la première fois au sein de la MV. Les données générées suggèrent à la fois des fonctions communes et d'autres distinctes entre les deux couches de la MV. Cette première approche sera complétée par une analyse protéomique plus exhaustive qui permettra d'identifier un nombre plus important de protéines (analyse en plusieurs bandes), et par une étude expressionnelle par RT-qPCR afin de préciser les sites de synthèse des constituants. De nombreuses connaissances originales et fondamentales seront générées sur la formation de l'œuf et la reproduction aviaire. Ce projet contribuera également à terme, à fournir des éléments nouveaux qui pourront servir de base à l'élaboration d'une stratégie visant à renforcer ou à préserver la qualité de la MV (ex : identification de marqueurs de solidité de la MV utilisables en sélection) dont l'enjeu pour la filière « œufs » est particulièrement important, tant pour la qualité sanitaire que pour la mise en œuvre industrielle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Back J F, Bain J M, Vadehra D V and Burley R W, 1982. *Biochim Biophys Acta* 705(1), 12-19.
- Bain J and Hall M, 1969. *Aust J Biol Sci*, 22(3), 653-665
- Bausek N, Waclawek M, Schneider WJ, Wohlrab F, 2000. *J Biol Chem*, 275(37):28866-72
- Bellairs R, Harkness M and Harkness R D. 1963. *J Ultrastructure Research*, 8(3-4), 339-359.
- Da Silva, M., S. Beauclercq, G. Harichaux, V. Labas, N. Guyot, J. Gautron, Y. Nys, and S. Rehault-Godbert. 2015. *Biol. Reprod.* 93:71-77.
- Guyot N, Labas V, Harichaux G, Chessé M, Poirier JC, Nys Y, Réhault-Godbert S. *Sci Rep.* 2016 Jun 13;6:27974.
- Haas HJ, Spratt NT Jr., 1976. *Anat Rec.* 184(2):227-31.
- Howarth B Jr. 1990. *Poult Sci* ,69 1012—1015
- Hughey VL and Johnson E A, 1987. *Appl Environ Microbiol.* 53(9): 2165-2170.
- Kido, S, Doi, Y, Kim, F, Morishita E, Narita H, Kanaya S ,Ooi T, 1995. *J Biochem.* 117(6), 1183-1191
- Maehashi, K., Ueda, M., Matano, M., Takeuchi, J., Uchino, M., Kashiwagi, Y., and Watanabe, T. 2014. *J. Agric. Food Chem.* 62, 5156-5162
- Mann K. 2008. *Proteomics*, 8(11): 2322-32.
- New D A T, Development, 1959 7: 146-164
- Nishio S, Kohno Y, Iwata Y, Arai, M, Okumura H, Oshima K, et al (2014). *Biol Reprod*, 91(5).
- Okumura H, Kohno Y, Iwata Y, Mori H, Aoki N, Sato C, Kitajima K, Nadano D, 2004. *Biochem J.* 384(Pt1):191-9.
- Rehault-Godbert, S., Labas, V., Helloin, E., Herve-Grepinet, V., Slugocki, C., Berges, M., Bourin, M.-C., Brionne, A., Poirier, J.-C., Gautron, J., Coste, F., and Nys, Y. 2013. *J. Biol. Chem.* 288, 17285-17295
- Saxena, I., and S. Tayyab. 1997. *Cell. Mol. Life Sci.* 53:13-23.
- Valenti P, Antonini G, Von Hunolstein C, Visca P, Orsi N, Antonini E. 1983. *Int J Tissue React.* 5(1):97-105.
- Wang G, Wang T. 2009. *J Food Sci.* 74(2):C147-56
- Yoshizaki N, Yamaguchi W, Ito S, Katagiri C. 2000. *Zoological Science* 17(6):751-758.

Figure 1. Caractérisation des protéines de la membrane vitelline de l'œuf de poule

Analyse SDS-PAGE (15% acrylamide en conditions dénaturantes, 10 µg de protéines par puits) des protéines de la MV (MVE+MVI), de la MVI et de la MVE d'œufs frais.

**Tableau 1.** Identification des protéines de la membrane vitelline

Fonction supposée à partir de publications ou de Uniprot.org et localisation (MVE vs MVI) des 23 protéines identifiées

Protéines identifiées	Nom des protéines	Fonction résumée	Site d'identification
OLFML3	Olfactomedin 3	Développement embryonnaire	MVE
PIGR	Polymeric immunoglobulin receptor	Récepteur des immunoglobulines	
TIMP3	Metalloproteinase inhibitor 3	Inhibiteur de métalloprotéases	
BMSP	Bêta-microséminoprotéine-like	Protéine antimicrobienne (Guyot <i>et al.</i> , 2016)	
PTN	Pléiotrophine	Protéine antimicrobienne (Guyot <i>et al.</i> , 2016) et facteur de croissance	
OVALX	Ovalbumin-related protein X	Protéine antimicrobienne (Réhault-Godbert <i>et al.</i> , 2013)	
SPIK5	Ovoinhibiteur	Inhibiteur de protéases à sérine (Saxena et Tayyab, 1997)	
RARRES2	Retinoic acid receptor responder protein 2	Régulation du processus catabolique des lipides	
LYZ	Lysozyme	Protéine antimicrobienne (Huguey <i>et al.</i> , 1987)	MVE/MVI
VMOI	Vitelline Membrane Outer layer protein 1	Protéine antimicrobienne (Guyot <i>et al.</i> , 2016)	
OVAL	Ovalbumin	Source d'acides aminés pour l'embryon (Da Silva <i>et al.</i> , 2015)	
AvBD11	Bêta-défensine aviaire 11	Protéine antimicrobienne (Guyot <i>et al.</i> , 2016)	
HEP21	Hen egg protein 21	Régulation négative du complexe d'attaque membranaire	
LOC771972			
WFDC2	WAP four-disulfide core domain protein 3	Inhibiteur d'endopeptidases	
BPIFB2	Protéine Tenp	Développement embryonnaire, famille de protéines BPI/LBP (Maehashi <i>et al.</i> , 2014)	
TF	Ovotransferrine	Protéine antimicrobienne (Valenti <i>et al.</i> , 1983)	MVI
ZP3	Zona pellucida sperm-binding protein 3	Rôle dans la fertilisation (Okumura <i>et al.</i> , 2004)	
ZP1	Zona pellucida sperm-binding protein 1	Rôle dans la fertilisation (Okumura <i>et al.</i> , 2004)	
ACTG1	Actin, gamma 1	Motilité cellulaire	
GPX3	Glutathione peroxidase 3	Réponse au stress oxydatif	
APOB	Apolipoprotein B	Intervient dans le métabolisme lipidique	
ATP1A1	ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit alpha 1	Transport d'ATP	