

ETUDE COMPARATIVE DE LA STRUCTURE ET DE LA MATRICE ORGANIQUE DE COQUILLES D'OEUF DE DIFFÉRENTES ESPÈCES D'OISEAUX DOMESTIQUES

Panhéleux Marina¹, Bain Maureen², Fernandez Maria S.³, Gautron Joël¹, Arias José³, Solomon Sally², Hincke Max⁴, Nys Yves¹

¹Station de Recherches Avicoles, INRA, 37380 Nouzilly, ²Dep. Anatomy, University of Glasgow, Scotland, ³Fac. Veterinary, University of Chile, Chile, ⁴University of Ottawa, Canada.

Résumé

La coquille de l'oeuf, constituée de carbonate de calcium intimement liée à une matrice organique, est ancrée sur les membranes coquillières. La matrice organique déterminerait la structure de la coquille et, par conséquent, ses propriétés mécaniques. Nous avons analysé les profils électrophorétiques des extraits solubles des matrices organiques de coquilles de huit espèces aviaires domestiques et réalisé des analyses structurales et immunohistologiques de ces coquilles afin de mettre en évidence leur particularités et analogies biochimiques et structurales. La structure est identique entre espèces mais chacune présente des formes et tailles de cônes mamillaires propres. L'ovocléidine (protéine spécifique de la coquille), l'ovalbumine et des protéoglycans riches en dermatan sulfate sont révélés chez la plupart des espèces. L'ovotransferrine et l'ostéopontine (protéine de l'os) ne sont observées que chez la poule, et la caille, le lysosyme chez la poule. Des variations de composition organique coïncident avec celles de structure et correspondent assez bien avec la classification taxonomique. Cette relation structure-matrice organique reste à définir.

Introduction

La qualité de la coquille reste une préoccupation majeure en production d'oeuf car un défaut de celle-ci reste la principale origine du déclassement des oeufs. Nous nous intéressons aux mécanismes de minéralisation de la coquille afin de rechercher de nouvelles causes responsables de la détérioration de la solidité de la coquille. La partie minérale de la coquille est constituée de carbonate de calcium associé à une matrice organique. Cette dernière est impliquée dans le contrôle du processus de minéralisation de nombreux autres tissus calcifiés (Addadi et al, 1985). Les constituants organiques de la coquille influenceraient la morphologie et l'orientation des cristaux de calcite et, par conséquent, sa structure et ses propriétés biomécaniques. Des protéines ont été identifiées chez la poule telles que l'ovocléidine (Hincke et al, 1995), l'ovalbumine (Hincke, 1995) et l'ostéopontine (Pines, 1994). Deux autres protéines majeures du blanc d'oeuf sont également présentes chez la poule : le lysozyme et l'ovotransferrine (Hincke, Gautron et Nys, communication personnelle). La présence de protéoglycans soupçonnés d'intervenir dans le contrôle de la calcification est également établie (Arias et al, 1992). La présence de ces différents constituants organiques a été recherchée au sein des matrices des différentes espèces d'oiseaux domestiques. Parallèlement a été réalisée une analyse structurale des différentes coquilles par microscopie électronique à balayage ainsi qu'une analyse tridimensionnelle de la surface interne de la coquille avec un rayon laser. L'objectif

du travail a été d'établir une éventuelle universalité de distribution de constituants organiques et le parallèle avec l'organisation structurale.

Matériels et méthodes

Cette étude concerne des coquilles d'oeufs de différentes espèces d'oiseaux domestiques : la poule pondeuse, la poule reproductrice, la dinde, la cane pékin, la pintade, l'oie, la caille et la faisane. Les protéines sont extraites de la matrice organique de la coquille selon deux méthodes. La première méthode (Gautron et al, 1996) emploie l'EDTA 0,5 M comme agent de déminéralisation tandis que la seconde méthode utilise l'acide acétique. La solubilisation des protéines est ensuite réalisée avec du chlorure de guanidinium 4M. Des électrophorèses de ces extraits solubles sont réalisées en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) sur un gel de 4 à 20 % d'acrylamide. Les protéines sont colorées au bleu de Coomassie ou transférées sur membrane de nitrocellulose. La détection de protéines particulières à l'aide d'anticorps spécifiques de poule a été réalisée selon la technique du western blotting. Pour l'analyse immunohistochemique de la matrice organique des coquilles, les coquilles des différentes espèces sont fixées, décalcifiées et incluses dans une résine. Une coupe est ensuite incubée avec un anticorps spécifique. L'immunoréactivité est visualisée par microscopie à fluorescence. L'analyse structurale est réalisée par microscopie électronique à balayage (SEM) complétée par une

analyse tridimensionnelle de la surface interne de la coquille au rayon laser.

Résultats et discussion

La figure 1a présente les profils électrophorétiques des matrices organiques des oiseaux domestiques étudiés. En fonction des particularités observées d'une espèce à l'autre, nous pouvons les classer en quatre catégories principales : 1 : poule pondeuse, poule reproductrice, caille et faisan, 2 : dinde, 3 : oie et cane, 4 : pintade. Ces résultats sont globalement en accord avec la classification taxonomique des oiseaux de Sibley et Monroe (1990) : la poule, la caille, le faisan et la dinde appartiennent à la même famille des phasianidae (ordre des galliformes). A l'exception de la dinde, on retrouve bien des analogies migratoires entre ces espèces. La pintade appartient également à l'ordre des galliformes mais à la famille des numididae ce qui explique son profil migratoire particulier. Enfin, la proximité phylogénique de l'oie et la cane pékin (ces deux espèces appartiennent à l'ordre des ansériformes) explique probablement leurs profils similaires. Plusieurs protéines de la matrice organique de la coquille de poule ont déjà été identifiées. Les résultats obtenus pour la poule pondeuse (figure 1a) confirment les observations préalables (Gautron et al, 1996). L'ovocleidin, l'ovalbumine et l'ostéopontine correspondent respectivement aux bandes de 17, 45 et 54 kDa. Nous confirmons l'existence dans la matrice organique de poule de lysozyme (15 kDa) et d'ovotransferrine (78kDa). Le tableau 1 regroupe les observations, chez les autres espèces, de bandes révélés par des anticorps spécifiques de ces protéines de poule. L'usage d'anticorps hétérologues ne permet de conclure que dans le cas de réponse positive car une absence de réponse peut résulter de la non reconnaissance de la protéine d'une autre espèce. Deux protéines sont presque unanimement représentées : l'OC 17 et l'ovalbumine. L'ovocleidin (17 kDa) est la seule protéine spécifique du processus de minéralisation de la coquille d'oeuf de poule qui a été purifiée (Hincke et al, 1995). Sa présence au sein des diverses matrices (7/8 espèces testées figure 1-b) confirme l'importance de cette protéine dans le phénomène de biominéralisation. L'ovalbumine a pu être mise en évidence chez toutes les espèces aviaires étudiées. Des espèces telles que l'oie et la cane présentent de faibles signaux en western blotting. Ces deux oiseaux sont plus éloignées phylogéniquement de la poule (comparativement aux autres espèces), l'anticorps de poule les révèle donc plus difficilement. Cette protéine majoritaire dans le blanc d'oeuf a été localisée dans le noyau mamillaire (Hincke, 1995) et est majoritaire dans le fluide utérin initial (Gautron et al., 1996). Elle pourrait donc intervenir lors de l'initiation de la calcification. La non reconnaissance du lysozyme dans la plupart des espèces peut s'expliquer par des différences de séquences en acides aminés entre espèces et sera à rechercher par des anticorps homologues.

L'ovotransferrine est présente dans la matrice de la poule pondeuse, reproductrice et de la dinde mais n'est pas révélée chez les autres espèces. Nous avons utilisé un anticorps monoclonal. Sa spécificité vis à vis d'une région particulière de l'ovotransferrine peut expliquer l'absence de réaction croisée observée chez les autres espèces (Mason et al, 1995). Dans notre étude, l'anticorps réagit aussi bien avec l'ovotransferrine de poule (pondeuse et reproductrice) que celle de dinde et caille. L'ostéopontine a été identifiée dans l'utérus de poule (Pines, 1994). De même que pour l'ovotransferrine, elle est présente dans les matrices organiques de coquilles de poule pondeuse, poule reproductrice et caille ; espèces proches dans la classification taxonomique. Au sein d'une même famille phylogénétique, les homologies de séquences sont plus nombreuses aussi la reconnaissance des protéines est plus probable.

Les analyses immunohistochimiques des coquilles décalcifiées apportent des informations complémentaires (tableau 2). Le dermatan sulfate n'est présent que dans la couche palissadique en accord avec les observations antérieures de Arias et al. (1992) et est observé pour la majorité des espèces (6/7 espèces testées). Le keratan sulfate est localisé dans les noyaux mamillaires de toutes les espèces excepté la pintade et la cane qui eux possèdent du chondroïtin sulfate à ce niveau.

Les différences, entre les espèces, de composition protéique et de distribution et nature de protéoglycans pourrait expliquer une part des différences d'organisation structurale observées dans la couche mamillaire des coquilles des oiseaux étudiés. L'organisation structurale globale est identique entre espèces (nucléation en un site particulier puis croissance calcique en cône jusqu'à la fusion de ceux-ci pour former la couche palissadique) mais l'analyse structurale de la surface interne de coquille, réalisée en microscopie électronique à balayage, révèle des différences entre poule-dinde, oie et pintade. La morphologie de la couche mamillaire de la coquille d'oeuf de dinde (figure 2) ressemble fortement à celle de la poule pondeuse. Les "capuchons" mamillaires (zone d'ancrage de la coquille sur la membrane coquillière externe) sont bien définis et recouvrent complètement la base des cônes. L'oie présente des noyaux mamillaires de grande taille, une confluence entre cônes et une large zone de contact avec les membranes (empreintes bien visibles). Les cônes, chez la pintade, ont une zone de contact étroit avec les membranes mais sont plus pointus et, vers l'intérieur, plus "bouffants" que ceux de poules. La comparaison des relevés topographiques obtenus par rayons laser confirme les variations de densité des noyaux mamillaires entre espèces telles que l'oie et la dinde. La coquille de caille est la seule à posséder des noyaux multinucléés.

En conclusion, cette étude comparative, bien que partielle, démontre l'universalité de constituants organiques de la coquille (ovocleidine, ovalbumine, dermatan sulfate) et l'existence de modifications de

composition organique et structurale dont le déterminisme reste à définir.

Remerciements : Ce travail n'aurait pas été possible sans le don d'anticorps par le Dr Paraf (Nouzilly), le Dr Pines (Israël) et le Dr Bödicke (Allemagne). Nous les remercions vivement. La collaboration entre les équipes a été mise en place dans le cadre des programmes : Ecos conicyt et Alliance.

Références

Addadi L., Weiner S., 1985. Proc. Natl. Acad. Sci., (U.S.A.), 82, 4110-4114.
Arias J.L., Carrino D.A., Fernandez M.S., Rodriguez J.P., Dennis J.E., Caplan A.I., 1992. Archiv. Biochem. Bioph., 298 (1), 293-302.

Gautron J., Bain M., Solomon S., Nys Y., 1996. Brit. Poult. Sci., 37, 853-866.
Hincke M.T., Tsang C.P.W., Courtney M., Hill V., Narbaitz R., 1995. Calcif. Tissue Int., 56, 578-583.
Hincke M. T., 1995. Connective Tissue Research, 3, 227-233.
Mason A. B., Kenney C. J., Mitter M. K., Woodworth R. C., Patel K. J., 1995. Comp. Biochem. Physiol., 112 A, 347-354.
Pines M., Knopov V., Bar A., 1994. Matrix Biology, 14, 765-771.
Salomon S.E., 1991. Egg and Eggshell quality. Wolfeed, UK.
Sibley C. G., Monroe B. L. Jr, 1990. In : Distribution and Taxonomy of birds of the world. Yale University Press, New Haven of London, pp 940.

TABLEAU 1 : Recherche de la présence d'une protéine particulière (technique immunologique du "western blotting". met. 1 : extraction à l'EDTA, met. 2 : extraction à l'acide acétique).

protéine	poule pondeuse		poule reproductrice		dinde		cane pékin	
	met. 1	met. 2	met. 1	met. 2	met. 1	met. 2	met. 1	met. 2
OC 17	+	+	+	+	+	+	+	+
ovalbumine	+	+	+	+	+	+	+	+
lysozyme	+	+	-	-	-	-	-	-
ovotransferrine	+	+	+	+	+	+	-	-
ostéopontine	+	+	+	+	-	-	-	-

protéine	pintade		oie		caille		faisan	
	met. 1	met. 2	met. 1	met. 2	met. 1	met. 2	met. 1	met. 2
OC 17	+	+	+	+	-	-	+	+
ovalbumine	+	-	+	+	+	+	+	+
lysozyme	-	-	-	-	-	-	-	-
ovotransferrine	-	-	-	-	+	+	-	-
ostéopontine	-	-	-	-	+	+	-	-

TABLEAU 2 : Recherche de la présence de différents protéoglycans par immunohistochimie. DS = dermatan sulfate, KS = keratan sulfate, C6S = chondroïtin sulfate. mam.= couche mamillaire, palis= couche palissadique. (1) : localisation entre les couches, (2) : localisation dans la partie supérieure de la région.

	poule pondeuse		dinde		cane pékin		pintade	
	mam.	palis.	mam.	palis.	mam.	palis.	mam.	palis.
DS		+		+		+(1)		+
KS	+		+					
C6S					+	+	+	+(1)

protéoglycans	oie		caille		faisan	
	mam.	palis.	mam.	palis.	mam.	palis.
DS		+(1)				+
KS	+	+	+		+(2)	
C6S				+		+(1)

FIGURE 1-a : Profils électrophorétiques des matrices organiques de différentes espèces aviaires

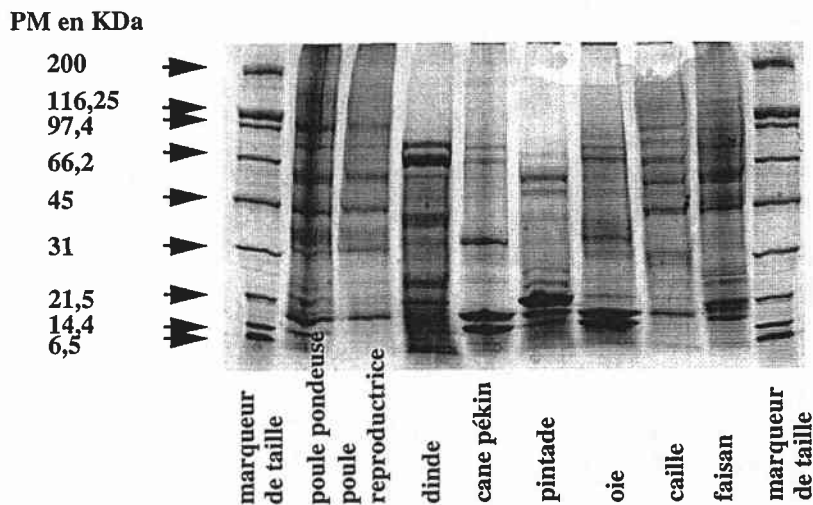


FIGURE 1-b : Révélation de la présence de différentes protéines

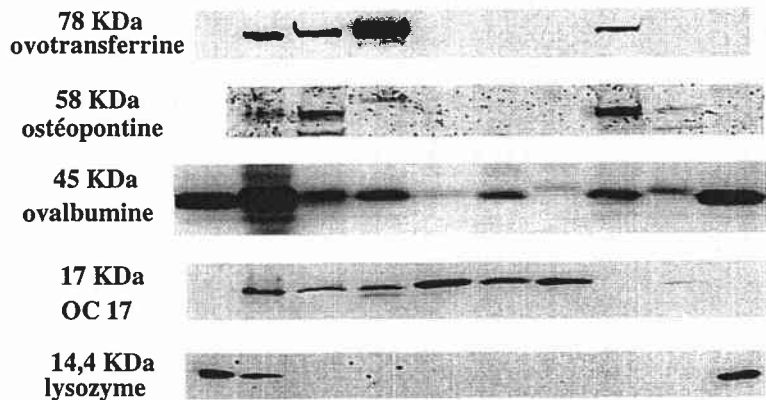


FIGURE 2 : Observation de la coquille de l'oeuf (interne) en microscopie électronique à balayage (grossissement : 720) ; a : dinde, b : caille, c : oie, d : pintade.

