

IDENTIFICATION DE VESICULES EXTRACELLULAIRES IMPLIQUEES DANS LA MINERALISATION DE LA COQUILLE DE L'ŒUF DE POULE

L. Stapane¹, N. Le Roy¹, J. Ezagal¹ et J. Gautron¹

I.BOA, INRA, Université de Tours, Centre Val de Loire, 37380 Nouzilly, France

lilian.stapane@inra.fr

RÉSUMÉ

La coquille d'œuf constitue une barrière physique contre les chocs mécaniques et la pénétration microbienne. Son intégrité est cruciale pour assurer la qualité hygiénique de cet ingrédient de base de la consommation humaine et limiter le nombre d'œufs déclassés pour défaut de coquille. Dans ce contexte, nous caractérisons différents marqueurs qui influencent l'ultrastructure de la coquille et déterminent sa solidité. Ces marqueurs constituent des candidats biologiques utilisables en sélection génomique pour renforcer la solidité de la coquille. La coquille est constituée à 95 % d'une phase minérale de carbonate de calcium (calcite) et à 3,5 % d'une matrice organique principalement constituée de protéines. La formation de la coquille résulte d'un processus de biominéralisation contrôlé et extracellulaire qui a lieu dans l'utérus. Ce processus implique un fluide dans lequel baigne l'œuf lors de la formation de la coquille et une forme transitoire de carbonate de calcium amorphe (ACC). Cette forme transitoire serait stabilisée et transportée par des vésicules extracellulaires du fluide utérin jusqu'au site de la minéralisation. Ce travail vise à mettre en évidence et caractériser le rôle des vésicules extracellulaires dans le processus de minéralisation. Dans un premier temps, la RT-qPCR en temps réel a permis de quantifier l'expression de gènes cibles vésiculaires dans différents tissus. Les résultats confirment une forte expression des acteurs moléculaires clefs de ce système (*edil3*, *anxa1*, *anxa2*) au niveau des régions de l'oviducte impliquées dans la formation de la coquille. Dans un second temps, une analyse par microscopie électronique à transmission a été couplée à une analyse élémentaire sur le fluide utérin collecté pendant la minéralisation. Les vésicules extracellulaires (~300 nm) ont pu être visualisées ainsi que le carbonate de calcium qu'elles contiennent. Des Western Blots ont permis de confirmer la présence d'un des acteurs clefs dans les vésicules purifiées. Les résultats de cette étude montrent pour la première fois l'implication du transport vésiculaire du calcium dans la biominéralisation de la coquille d'œuf.

ABSTRACT

Identification of extracellular vesicles involved in the biomineralization of the hen eggshell.

The eggshell is a crucial barrier against mechanical stresses and microbial attacks. Its integrity is essential to maintain the hygienic quality of this basic human food and to restrict the growth of downgraded eggs. In such a context, we are looking for markers specific to eggshell strength, in order to optimize egg quality. The eggshell is made of a mineral (calcite, calcium carbonate) phase (95%) and an organic matrix (3.5%) mostly containing proteins. The eggshell formation arises from an extra-cellular biomineralization process, which takes place in a fluid that contains eggshell precursors and involves a transient phase of calcium carbonate (ACC). This ACC could be stabilized and carried to the mineralization site through extracellular vesicles. This work aims at exploring the presence and the role of extra-cellular vesicles in the process of eggshell mineralization. In a first approach, we assessed, by real time qRT-PCR, the expression of vesicular target genes in several tissues. The results confirmed a high expression of target genes (*edil3*, *anxa1*, *anxa2*) in the portions of the oviduct where mineralization takes place. In a second approach, observation by electronic microscopy coupled with elementary analysis of the uterine fluid collected during eggshell biomineralization highlighted the presence of extracellular vesicles (~ 300 nm) containing calcium carbonate. Finally, a Western Blot analysis confirmed the presence of a key protein in the purified vesicle fraction. The results of this study shows for the first time the involvement of extra-cellular vesicle in the transport of calcium carbonate for the biomineralization of the hen eggshell.

INTRODUCTION

La coquille d'œuf constitue une barrière physique contre les chocs mécaniques et la pénétration microbienne. Son intégrité est cruciale pour assurer la qualité hygiénique de cet ingrédient de base de la consommation humaine et limiter le nombre d'œufs déclassés pour défaut de coquille. La qualité de la coquille a été fortement améliorée grâce à la sélection de pondeuses aux coquilles renforcées. Cette sélection a porté principalement sur la masse de coquille. Elle n'est cependant pas le seul critère déterminant sa qualité. En effet, à masse égale, les coquilles peuvent présenter des ultrastructures différentes qui déterminent leurs propriétés mécaniques (Nys et al., 2004). Pour obtenir de nouveaux gains en terme de sélection et de génétique, les acteurs moléculaires impliqués dans les processus qui déterminent la texture et la solidité de la coquille devront être pris en compte. Dans ce contexte, nous étudions les mécanismes de minéralisation pour caractériser les acteurs moléculaires influençant l'ultrastructure de la coquille et potentiellement utilisables en sélection génomique.

La coquille est constituée à 95 % d'une phase minérale de carbonate de calcium (calcite) et à 3,5 % d'une matrice organique principalement constituée de protéines (Nys et al., 1999). La formation de la coquille dans l'utérus de la poule résulte d'un processus de biominéralisation contrôlé et extracellulaire. Le fluide utérin baigne l'œuf lors de la formation de la coquille et joue un rôle central dans ce processus, apportant les précurseurs organiques et minéraux et régulant le processus de calcification. Une étude récente a démontré le rôle clef du carbonate de calcium amorphe (ACC) dans la synthèse de la coquille de l'œuf de poule et mis en évidence son ultrastructure (Rodríguez-Navarro et al., 2015). L'ACC constitue une forme transitoire instable vers la forme cristalline stable. L'ACC correspond à une réserve temporaire de calcium soluble fournissant les ions nécessaires durant la minéralisation rapide et permettant une cristallisation dans des conditions physiologiques (Ziegler, 1994). Cette forme amorphe de carbonate de calcium est plus soluble mais moins stable que la forme cristalline (Brecevic and Nielsen, 1989 ; Addadi et al., 2003). En conditions physiologiques l'ACC doit être stabilisée, ce qui nous a logiquement conduit au questionnement sur le mécanisme de maintien de cette forme dans le fluide utérin de la poule. Une hypothèse indiquant le rôle de vésicules extracellulaires stabilisant cette forme amorphe a émergé en confrontant des données vésiculaires obtenues *in vitro* (Tester et al., 2011), et *in situ* sur des systèmes de minéralisation d'invertébrés et osseux (Flores et Livingston, 2017 ; Vidasky et al., 2015 ; Balcerzak et al., 2008 ; Hasegawa et al., 2017 ; Mahamid et al., 2011). Des observations au microscope de la jonction

utérovaginale et de la coquille montrent un nombre important de vésicules (Wyburn et al., 1973 ; Dennis et al., 1996 ; Chien et al., 2009 ; Waqas et al., 2016). Des données transcriptomiques récentes de notre équipe montrent qu'un nombre important de gènes est impliqué dans le transport vésiculaire dans l'utérus de poule (Gautron, 2018). L'ensemble de ces observations conforte l'hypothèse de la nécessité que l'ACC soit stabilisé dans des vésicules pour qu'il permette l'élaboration de la structure cristalline de la coquille. Ces vésicules permettraient de stabiliser et de transporter l'ACC jusqu'aux sites de nucléation situés au niveau de noyaux mamillaires présents sur les membranes coquillières de l'œuf.

A partir de données transcriptomiques utérines obtenues dans notre équipe et de données bibliographiques sur l'implication de vésicules dans la minéralisation des systèmes osseux (Shapiro et al., 2015), nous avons évalué le rôle potentiel d'acteurs protéiques préalablement identifiés dans le système vésiculaire utérin. Ce travail vise donc à mettre en évidence et à caractériser le rôle de vésicules extracellulaires dans le processus de minéralisation de la coquille de l'œuf de poule.

1. MATERIELS ET METHODES

Les différentes expériences ont été réalisées en respectant les "European Communities Council Directives" sur le bien-être des animaux. Le protocole d'expérimentation a été validé par le Comité d'éthique d'expérimentation animale de Val de Loire (comité d'éthique national pour l'expérimentation animale n°19) et le ministère sous #16099-015902. Des poules (ISA-Hendrix, 35 semaines au prélèvement), ont été sacrifiées durant la phase active de minéralisation. Plusieurs tissus (os, duodénum, rein, foie) et segments d'oviducte (magnum, isthme blanc, isthme rouge, utérus), ont été collectés et directement plongés dans l'azote liquide. Les tissus ont été conservés à -80°C en cryo-tubes jusqu'à l'extraction des ARNs (RNA now™).

Du fluide utérin a été recueilli par l'induction de l'expulsion de l'œuf par injection de 50 µg de prostaglandine-F2α durant la phase de minéralisation (Gautron et al., 1997). Une partie du fluide utérin a été diluée dans du tampon phosphate (PBS, 5 : 1 (v : v)) et immédiatement utilisée pour la purification des vésicules extracellulaires. Le reste du fluide utérin a été déposé dans l'azote liquide de manière à obtenir des billes cryo-conservées pour l'analyse au microscope. Afin de contrôler le profil protéique du fluide récolté, une aliquote a été collectée et diluée dans du tampon Laemmli pour électrophorèse SDS-PAGE.

Les vésicules extracellulaires ont été purifiées du fluide utérin par un système de centrifugations en

série. Le fluide utérin dilué dans du PBS a d'abord été centrifugé à 100 g pendant 15 min puis à 12 000 g pendant 15 min pour éliminer les débris cellulaires. Après ces étapes, deux centrifugations successives de 90 min à 100 000 g ont été effectuées afin de culoter les vésicules. Le culot vésiculaire a ensuite été suspendu dans du PBS et conservé à -20°C jusqu'à son analyse par Western Blot.

Le fluide utérin et la fraction vésiculaire ont été dilués dans du tampon Laemmli et soumis à une électrophorèse SDS-PAGE en gel de polyacrylamide à 12 %. Les protéines séparées ont été transférées sur membranes de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées avec un anticorps anti-EDIL3 (rabbit polyclonal; SAB2105802, Sigma-Aldrich) puis un anticorps secondaire Alexa Fluor® 680 (Invitrogen) avant d'être révélées à l'aide d'un imageur à infrarouge (LI-COR Odyssey® imaging system).

Les ARNs totaux ont été extraits à partir des tissus congelés et ont ensuite été soumis à un traitement à la DNase du kit TURBO DNA-free™ (Invitrogen) permettant d'éliminer l'ADN génomique restant. La concentration des ARNs a été mesurée par absorption à 260 nm au NanoDrop™. Les ADNc ont été synthétisés en utilisant des Oligo(dT)™ (Promega) et une transcriptase inverse Superscript II™ (Promega). L'expression des gènes a été évaluée par High Throughput quantitative PCR (Fluidigm Biomark HD) sur les ADNc. Les ADNc ainsi que les couples d'amorces permettant d'amplifier une portion des gènes cibles vésiculaires *edil3*, *anxa1*, *anxa2* et *pdc6ip* ont été utilisés pour analyser l'expression quantitative de ces gènes pour chaque tissu et segment d'oviducte. L'expression des gènes est exprimée en quantité relative de chaque transcript cible normalisée par la moyenne de quantité de transcripts de huit gènes de ménage par l'intermédiaire du logiciel GenNorm. Les niveaux d'expression des gènes étudiés ont été comparés dans différentes situations physiologiques, à l'aide d'une analyse de variance suivie d'une comparaison par paire (Tukey).

Une bille de fluide utérin prélevée durant la minéralisation de la coquille a été déposée congelée sur une grille en Nickel pour observation en microscopie électronique. La préparation a été contrastée avec de l'acétate d'uranyle aqueux 2% et immédiatement observée au microscopie électronique à transmission (TEM-1400 Plus electron microscope-JEOL). Une analyse élémentaire a été réalisée avec le mode STEM du microscope électronique de manière à obtenir une cartographie des éléments chimiques présents dans les vésicules observées.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Surexpression de gènes vésiculaires dans les segments de l'oviducte responsables de la minéralisation

L'expression de 4 gènes vésiculaires cibles (*edil3*, *anxa1*, *anxa2* et *pdc6ip*) a été mesurée (i) dans les régions de l'oviducte impliquées dans la minéralisation de la coquille (isthme rouge et utérus) et dans la formation des membranes coquillières (isthme blanc), (ii) dans l'os et (iii) dans d'autres tissus et segments non impliqués dans la minéralisation (duodénum, rein, foie et magnum).

On observe une surexpression des 4 gènes vésiculaires dans les segments de l'oviducte impliqués dans la formation de la coquille (isthmes rouge et blanc, utérus ; Tableau.1). Le gène *edil3* est surexprimé dans les trois segments de l'oviducte impliqués dans la formation de la coquille. Le niveau d'expression d'*Anxa1* est maximum dans l'isthme rouge, qui est le lieu de l'initiation de la minéralisation. Ce niveau reste élevé dans l'isthme blanc, lieu de formation des membranes coquillières et plus faiblement dans l'utérus, l'os et le magnum (lieu de formation du blanc). *Anxa2* est exprimé à un niveau comparable à celui d'*Anxa1*, avec toutefois une expression maximum dans l'utérus et l'isthme rouge, mais aussi dans le duodénum. Le gène marqueur vésiculaire *pdc6ip* est exprimé dans l'ensemble des tissus et segments testés et on note une surexpression dans l'utérus et l'isthme rouge (p-value < 0.05). Ces résultats ainsi que les données bibliographiques montrant la présence des protéines ANXA1, ANXA2 et PDCD6IP dans les vésicules de l'os (Shapiro et al., 2015), confortent l'hypothèse de l'implication de vésicules extracellulaires dans la minéralisation de la coquille. La base de donnée Vesiclepedia, qui recense les protéines vésiculaires les plus fréquemment retrouvées (www.microvesicles.org/), mentionne la protéine PDCD6IP comme étant le plus important marqueur vésiculaire. Sa surexpression dans l'utérus et l'isthme rouge confirmerait donc l'implication du transport vésiculaire lors de la formation de la coquille.

Ces données et des éléments bibliographiques nous ont permis de proposer des rôles pour les protéines EDIL3, ANXA1 et ANXA2. EDIL3 présente des domaines fonctionnels qui lui permettraient de se lier à la fois aux phospholipides de la vésicule et au calcium. Elle participerait à l'adressage des vésicules au niveau des sites de nucléation de la minéralisation. Les protéines ANXA1 et ANXA2 joueraient le rôle de canaux permettant l'entrée de calcium dans les vésicules (Rojas et al., 1992 ; Kirsch et al., 2000). Ce système vésiculaire minéralisant nécessite que le gaz carbonique du fluide utérin alimente la vésicule en carbonate. L'anhydrase carbonique CA4 pourrait intervenir dans ce phénomène (Sauer et al., 1994).

Ainsi, il est possible que le carbonate de calcium vésiculaire soit formé sous forme amorphe et que les vésicules endossent le rôle de stabilisateurs lors de son acheminement jusqu'au site de minéralisation.

2.2 Identification et composition des vésicules extracellulaires dans le fluide utérin

Afin de vérifier cette hypothèse, la présence de vésicules a été explorée dans le fluide utérin, par microscopie électronique à transmission. Les images obtenues ont permis de visualiser des vésicules extracellulaires en nombre important. Les vésicules observées possèdent une taille moyenne de ~ 300 nm (Figure 1A). L'aspect morphologique de ces vésicules est comparable à celui des vésicules identifiées dans l'os (Thouverey et al., 2009).

Des Western Blots réalisés avec des anticorps spécifiques ont confirmé la présence d'EDIL3 au niveau de la fraction vésiculaire (Figure 1B).

La présence de calcium intra-vésiculaire a été recherchée par analyse élémentaire couplée à la microscopie électronique à transmission. La cartographie d'élément obtenue démontre clairement la présence de calcium intra-vésiculaire. On observe également la présence d'oxygène et de carbone dans les vésicules.

CONCLUSION

A travers différentes approches, cette étude a permis de mettre en évidence le rôle de vésicules extracellulaires dans le transport de carbonate de calcium sur le site de la minéralisation de la coquille de l'œuf de poule. Les mesures d'expression génique confirment une activité vésiculaire sur le site de la minéralisation, et les résultats des Western Blots et de l'analyse élémentaire démontrent la présence de carbonate de calcium et de matière organique dans les vésicules extracellulaires. Ces vésicules contiendraient de l'ACC, qui serait stabilisé par la matrice organique. Ces vésicules seraient adressées au site de minéralisation de par leur liaison à EDIL3. Des analyses complémentaires seront nécessaires pour confirmer la forme carbonate de calcium identifiée dans les vésicules, la présence d'autres acteurs protéiques et ainsi valider cette hypothèse de transport sur le site de minéralisation par l'intermédiaire de protéines guides. Les protéines ainsi identifiées pourront être confrontées aux protéomes des vésicules de l'os (Balcerzak et al., 2008 ; Rosenthal et al., 2011).

A terme, les données obtenues permettront sur la base de leur polymorphisme, la sélection de marqueurs biologiques de la minéralisation. Leur potentiel d'utilisation en sélection génomique devra être exploré par des études d'association.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient, l'université François Rabelais de Tours, la région Centre Val de Loire, la plateforme IBiSA de Microscopie Electronique de l'Université de Tours pour son expertise et l'UE PEAT pour le soin et la prise en charge des animaux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Addadi L., Raz S., Weiner S., 2003. *Adv Mater*, (15), 959-70
- Balcerzak M., Malinowska A., Thouverey C., Sekrecka A., Dadlez M., Buchet R., Pikula S., 2008. *Proteomics*, (8), 192-205
- Brechevic L., Nielsen A.E., 1989. *J Cryst Growth*, (98), 504-10
- Dennis J.E., Xiao S.Q., Agarwal M., Fink D.J., Heuer A.H., Caplan A.I., 1996. *J Morphol*, (228), 287-306
- Flores R.L., Livingston B.T., 2017. *Bmc Evol Biol*, (1), 17-125
- Gautron J., Hincke M.T., Nys Y., 1997. *Connect Tissue Res*, (36), 195-210
- Gautron J., 2018. *Compte rendu de fin de projet, ANR IMPACT*, 17p
- Hasegawa T., Yamamoto T., Tsuchiya E., Hongo H., Tsuboi K., Kudo A., Abe M., Yoshida T., Nagai T., Khadiza N., Yokoyama A., Oda K., Ozawa H., de Freitas P.H.L., Li M., Amizuka N., 2017. *Jpn Dent Sci Rev*, (53), 34-45
- Kirsch T., Harrison G., Golub E.E., Nah H.D., 2000. *J Biol Chem*, (275), 35577-83
- Mahamid J., Sharir A., Gur D., Zelzer E., Addadi L., Weiner S., 2011. *J Struct Biol*, (174), 527-35
- Nys Y., Hincke M.T., Arias J.L., Garcia-Ruiz J.M., Solomon S.E., 1999. *Poult Avian Biol Rev*, (10), 143-66
- Nys Y., Gautron J., Garcia-Ruiz J.M., Hincke M.T., 2004. *Cr Palevol*, (3), 549-62
- Rodriguez-Navarro A.B., Marie P., Nys Y., Hincke M.T., Gautron J., 2015. *J Struct Biol*, (190), 291-303
- Rojas E., Arispe N., Haigler H.T., Burns A.L., Pollard H.B., 1992. *Bone Miner*, (17), 214-8
- Rosenthal A.K., Gohr C.M., Ninomiya J., Wakim B.T., 2011. *Arthritis Rheum-Us*, (63), 401-11
- Sauer G.R., Genge B.R., Wu L.N., Donachy J.E., 1994. *Bone Miner*, (26), 69-79
- Shapiro I.M., Landis W.J., Risbud M.V., 2015. *Bone*, (79), 29-36
- Tester C.C., Brock R.E., Wu C.H., Krejci M.R., Weigand S., Joester D., 2011. *Crystengcomm*, (13), 3975-8
- Thouverey C., Bechhoff G., Pikula S., Buchet R., 2009. *Osteoarthr Cartilage*, (17), 64-72
- Vidavsky N., Masic A., Schertel A., Weiner S., Addadi L., 2015. *J Struct Biol*, (192), 358-65
- Waqas M.Y., Yang P., Ahmed N., Zhang Q., Liu T., Li Q., Hu L., Hong C., Chen Q., 2016. *Poultry Sci*, (95), 2112-9
- Wyburn G.M., Johnston H.S., Draper M.H., Davidson M.F., 1973. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*, (58), 143-51
- Ziegler A., 1994. *J Struct Biol*, (112), 110-6

Tableau 1. Mesure de l'expression de gènes vésiculaires dans plusieurs tissus et dans différents segments de l'oviducte.

Les valeurs d'expression ne partageant aucune lettre sont significativement différentes ($P < 0.05$).

Genes	Tissus				Segments de l'oviducte			
	Os	Duodenum	Rein	Foie	Magnum	Isthme blanc	Isthme rouge	Utérus
<i>edil3</i>	0.1875	0	0.00125	0	0	0.825	1.101	0.737
Stat.	B	B	B	B	B	A	A	A
<i>anxa1</i>	0.2046	0.0015	0.0093	0.0004	0.1936	2.19	3.338	0.891
Stat.	CD	D	D	D	CD	B	A	C
<i>anxa2</i>	0.3068	0.5208	0.0062	0.0009	0.543	1.208	2.884	1.904
Stat.	CD	CD	D	D	CD	BC	A	AB
<i>pdc65ip</i>	0.2128	1.1499	0.7271	0.4929	0.777	0.842	1.454	2.03
Stat.	E	BC	CDE	DE	CD	CD	B	A

Figure 1. Transport vésiculaire impliqué dans la biominéralisation de la coquille d'œuf de poule.

A. Image de microscopie électronique des vésicules du fluide utérin avec coloration à l'acétate d'uranyle aqueux à 2 %. **B.** Western Blot avec l'anticorps anti-EDIL3 testé sur la fraction vésiculaire isolée du fluide utérin.

