

RÔLE FONCTIONNEL DE LA MATRICE ORGANIQUE DE LA COQUILLE DE L'OEUF LORS DE SA MINÉRALISATION.

Gautron J¹., Bain M²., Solomon S.E²., Nys Y¹.

¹INRA, Station de Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly, FRANCE

²Dep. of Anatomy, Univ. of Glasgow, Bearsden Road, Glasgow G61 1QH, ECOSSE

Résumé

L'addition, à un milieu hypersaturé en calcium et bicarbonates, d'extraits solubilisés de la matrice organique de la coquille ou de constituants du fluide utérin, milieu où se forme la coquille de l'oeuf, modifie *in vitro* la morphologie des cristaux de calcite. Cette observation confirme l'hypothèse d'un rôle actif des constituants organiques de la coquille dans le processus de minéralisation.

Introduction

La coquille de l'oeuf a une ultrastructure parfaitement organisée, révélée par de nombreuses observations en microscopie électronique (Solomon, 1991). Le dépôt de carbonate de calcium sous la forme de calcite dans l'utérus est contrôlé dans l'espace par les membranes coquillières de l'oeuf sur lesquelles s'ancre, en des sites déterminés, la partie minérale. La précipitation a lieu dans le fluide utérin, milieu acellulaire hypersaturé en calcium et bicarbonates (Nys et al., 1991). De plus, il contient des précurseurs de la matrice organique de la coquille (Gautron et Nys, 1993).

La trame organique de l'os ou de la dent est essentielle dans la mise en place de ces tissus calcifiés car elle détermine leur morphologie et leurs propriétés mécaniques. Par analogie, il est supposé que les constituants organiques de la coquille de l'oeuf, bien que présents en faible quantité, interviendraient dans le déterminisme spatial et temporel de la coquille de l'oeuf. Cette hypothèse est étayée par la mise en évidence de molécules à affinité pour le calcium, présentes dans des extraits solubles de la coquille (Abatanlego et al., 1978 ; Hamm et al., 1979) et dans le fluide utérin (Hamm et al., 1979 ; Gautron et Nys, 1993). De plus ces mêmes constituants ralentissent la précipitation spontanée de carbonate de calcium *in vitro* à partir d'un milieu hypersaturé en ces minéraux (Arias et al., 1993 ; Gautron et al., 1993 ; Gautron et Nys, 1993). Pour démontrer l'interaction entre trame organique et phase minérale, nous avons étudié les conséquences de l'introduction d'extraits organiques de coquille ou de fluide utérin sur la morphologie des cristaux de carbonate de calcium précipités *in vitro*.

Matériel et méthodes

Les poules ISA brown ont été élevées en cages individuelles équipées d'un dispositif automatique d'enregistrement de l'heure d'oviposition. Le prélèvement prématuré des oeufs lors des phases d'initiation, de dépôt intense et de fin de la calcification de la coquille, est obtenu par injection IV de 100 µg de prostaglandines (PGF 2α). Le fluide utérin est alors recueilli par gravimétrie sous huile de paraffine. Une partie des échantillons a été dialysée contre de l'eau distillée avec une membrane Spectrapor de point de coupure de 12-14 kDa, afin de ne conserver que les macromolécules.

La matrice organique a été solubilisée à partir de coquilles d'oeufs selon la procédure de Gautron (1994). Les cristaux de calcite ont été préparés, en présence ou absence de constituants organiques, par précipitation spontanée *in vitro* à partir de solutions hypersaturées par rapport au produit de solubilité de la calcite (Albeck et al., 1993). La morphologie des cristaux, recouverts d'or-palladium, a été observée en microscopie électronique à balayage (SEM).

Résultats et discussion

L'observation en microscopie électronique des coquilles d'oeufs, expulsés prématurément (fig. 1), est en accord avec les travaux antérieurs (Solomon, 1991) et concorde avec la détermination des stades physiologiques de formation de la coquille estimés à partir de l'heure d'oviposition de l'oeuf précédent. Lors de la première phase, il y a initiation de la calcification en surface des membranes coquillières, autour des noyaux mamillaires (fig. 1a,b,c). La croissance des cristaux vers l'extérieur est à l'origine de cônes inversés qui se joignent pour constituer la couche palissadique, au cours de la phase intense de calcification (fig. 1d). le stade terminal se

distingue essentiellement par un accroissement de l'épaisseur de la couche palissadique et, parfois, par la présence de la couche de cristaux verticaux, témoin de la phase d'arrêt de calcification.

Le fluide utérin recueilli est riche en calcium et bicarbonates, qui précipitent spontanément pour former du carbonate de calcium. Ce milieu contient une forte concentration de protéines (1mg/ml) avec un profil propre à chaque stade de formation de la coquille (Gautron et Nys, 1993). Cependant, dans ce milieu, et quel que soit le stade de formation de la coquille, les cristaux forment en absence des membranes coquillières ou d'une coquille en formation, des agrégats de cristaux arrondis à porosité grossière en surface (fig. 2a,b). Cet aspect diffère considérablement de l'observation des cristaux de carbonate de calcium témoin, précipités en l'absence de tout matériel organique à partir d'une solution minérale hypersaturée : les cristaux sont alors isolés et ont une forme cubique caractéristique de la calcite (fig. 2c).

L'addition *in vitro*, à la solution minérale, de fluide utérin ou de protéines solubles extraites de la coquille modifie radicalement la morphologie des cristaux de calcite. L'introduction de fluide utérin prélevé aux trois stades de formation de la coquille, réduit la taille des cristaux de calcite dès un apport de 5 µg/ml de protéines, érode les arêtes de la calcite, et crée un enchevêtrement de cristaux pouvant aboutir à de véritables agglomérats (fig. 2d). L'effet semble plus prononcé lors de l'introduction de concentrations plus élevées de protéines et des prélèvements réalisés lors des stades de croissance ou de fin de calcification. Cependant, un effet spécifique des stades de calcification ne semble pas apparent bien qu'ils soient associés à une composition variable en macromolécules (Gautron et Nys, 1993). Ces modifications sont le fait des macromolécules organiques présentes dans le fluide utérin, puisqu'elles sont observées lors de l'addition de fluide utérin dialysé au préalable, pour éliminer les molécules de poids moléculaires inférieurs à 12–14 kDa. L'addition d'extraits solubles de la matrice de la coquille, dans le milieu de précipitation, provoque des modifications similaires de la morphologie des cristaux : Ils paraissent petits, arrondis, agglomérés (fig. 2e,f). Dans les deux situations les cristaux, obtenus *in vitro*, présentent de nombreuses analogies avec la morphologie de la calcite déposée *in vivo* lors de la phase d'initiation de la calcification de la coquille (fig. 1b,c).

Ces observations confortent l'hypothèse d'un contrôle de la calcification de la coquille par les molécules de la trame organique, dont les précurseurs seraient présents dans le fluide utérin, en accord avec des travaux conduits chez d'autres espèces (Addadi et Weiner, 1992). La caractérisation des constituants de la matrice et de leur rôle fonctionnel est un préalable à l'établissement de leur importance dans le déterminisme des propriétés mécaniques de la coquille.

Références

- Abatangelo G., Daga-Gordini D., Castellani I., Cortivo R., 1978. *Calc. Tiss. Res.*, 26, 247–252.
- Addadi L., Weiner S., 1992. *Angew. Chem. Int. Ed. English*, 31, 153–169.
- Albeck S., Aizenberg J., Addadi L., Weiner S., 1993. *J. Am. Chem. Soc.*, 115(25), 11691–11697.
- 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.M., Solomon S.E., Nys Y., 1993. in : *Compte rendu du 5^{ème} symposium européen sur la qualité de l'oeuf et des ovoproduits* (Nys edit.), Tours, 4–8/10/1993, 191–197.
- Gautron J., Nys Y., 1993. in : *Compte rendu du 5^{ème} symposium européen sur la qualité de l'oeuf et des ovoproduits* (Nys edit.), Tours, 4–8/10/1993, 134–140.
- Gautron J., 1994. in : thèse d'ingénieur du CNAM, CRA associé de TOURS, Biochimie Industrielle et Agro-alimentaire, 152 p.
- Hamm M., Hausmanns G., Weise K., Engels J., Fricke M., Häusle J., Flajs G., Krampitz G., 1979. *Archiv. Geflügelk.*, 43(1), 18–29.
- Nys Y., Zawadski J., Gautron J., Mills A.D., 1991. *Poult. Sci.*, 70, 1236–1245.
- Solomon S., 1991. *Egg and Eggshell quality*. Wolfe, London.

Figure 1 : Observation en microscopie électronique à balayage de coquilles d'oeufs expulsés à différents stades de formation.

Stade initial, a) x 360, b) x 1440, c) x 2800.

Stade croissance, d) x 360.

1 trait représente 100 μm (a et d), 10 μm (b et c).

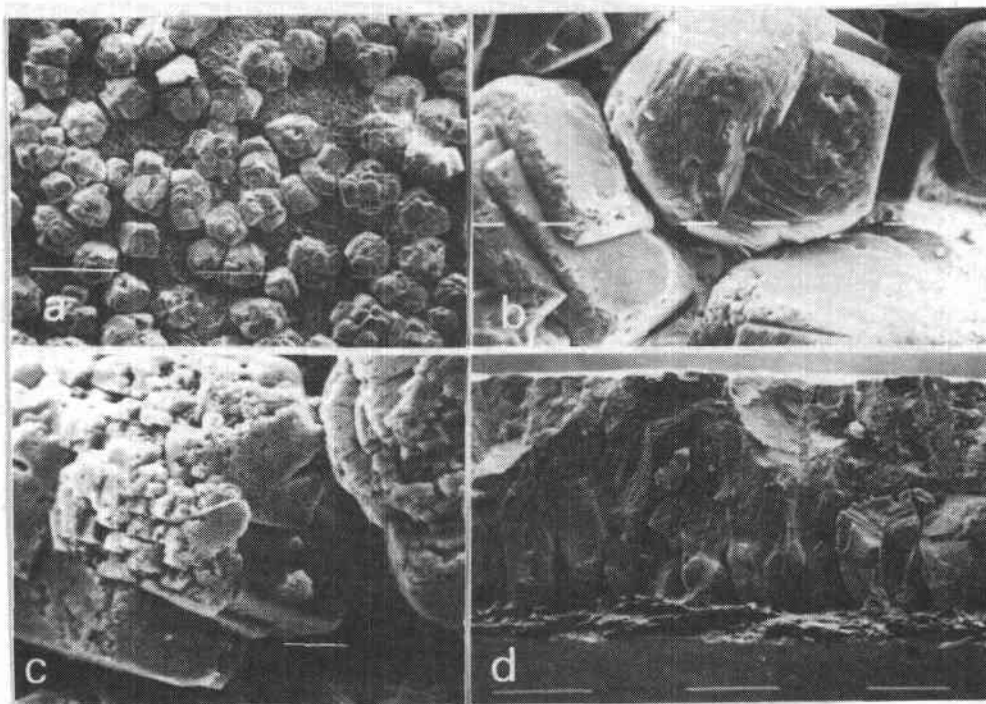


Figure 2 : Observation par SEM de cristaux de carbonate de calcium obtenus in vitro, par précipitation spontanée à partir de fluide utérin (a,b), et à partir d'une solution hypersaturée de ce sel et addition c) d'eau (essais témoins) d) de 25 $\mu\text{g/ml}$ de fluide utérin collecté au stade terminal, e) de 25 $\mu\text{g/ml}$ et f) 100 $\mu\text{g/ml}$ de protéines solubles extraites de la matrice organique de la coquille. 1 trait représente 100 μm (a), 10 μm (b, c, d, e et f).

