

CARACTERISER POUR MIEUX COMPRENDRE LE ROLE DES FLUIDES AMNIOTIQUE ET ALLANTOÏQUE AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE L'EMBRYON DE POULET

Da Silva Mylène¹, Labas Valérie², Nys Yves¹, Réhault-Godbert Sophie¹

¹INRA, UR83 Recherches Avicoles, 37380 NOUZILLY, ²INRA, Plateforme d'Analyse Intégrative des Biomolécules, Laboratoire de Spectrométrie de Masse, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 NOUZILLY

sophie.rehault-godbert@inra.fr

RÉSUMÉ

Chez les ovipares, le développement de l'embryon repose sur des structures extra-embryonnaires telles que les sacs vitellin, amniotique et allantoïque. Pour comprendre l'implication de ces structures dans le développement de l'embryon chez la poule, nous avons caractérisé les propriétés physicochimiques et les activités biologiques des fluides allantoïque (LC) et amniotique (LA) du 8^{ème} au 16^{ème} jour de l'incubation. Nous avons montré que le pH du LA reste stable tout au long de l'incubation (~7,5) tandis que le pH et l'osmolalité du LC diminuent significativement. En parallèle, des changements drastiques dans la composition du LA ont été observés par SDS-PAGE à partir du 12^{ème} jour, avec le transfert des protéines du blanc dans le sac amniotique, alors que le LC conserve une composition protéique stable, constituée majoritairement de protéines du jaune. Une étude complémentaire par spectrométrie de masse a permis de définir les protéines majeures du LC comme impliquées dans le métabolisme des vitamines et lipides, ainsi que dans le transport d'ions métalliques, alors que celles du LA sont des protéines vraisemblablement impliquées dans la nutrition de l'embryon et dans sa protection contre les pathogènes. D'autre part, des activités protéolytiques ont été visualisées par zymographie et une analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier 12 protéases dans le LC contre seulement 5 dans le LA. Ces protéases sont décrites comme impliquées dans la morphogénèse et la régénération de tissus, et 4 d'entre-elles, spécifiquement identifiées dans le LC, sont des protéases digestives. Ces résultats suggèrent une implication importante des deux fluides dans les processus du développement embryonnaire. A terme, cette étude permettra d'identifier les paramètres et les molécules témoignant du bon développement de l'embryon, et d'évaluer l'impact d'injections *in ovo* dans ces fluides (vaccins/probiotiques) sur leur composition, et leur éventuelle répercussion sur le développement de l'embryon et la santé du futur poussin.

ABSTRACT

Investigating the role of the amniotic and allantoic fluids during the development of the chicken embryo

In oviparous, the embryonic development depends on the extra-embryonic structures, namely the yolk, amniotic and allantoic sacs. To better appreciate their role in the development of the chicken embryo, we analyzed the physicochemical properties and biological activities of the amniotic (LA) and allantoic (LC) fluids from the 8th to 16th day of incubation. We showed that LA pH remains stable throughout the incubation (~7.5), while LC pH and osmolality values decrease significantly. Furthermore, from day 12 onwards, drastic changes in LA protein pattern have been observed by SDS-PAGE analysis, with the transfer of egg white proteins in the amniotic sac, whereas the LC protein composition remains stable with proteins mainly coming from the egg yolk. Moreover, the LC major proteins identified by mass spectrometry are associated with lipid and vitamin metabolisms, as well as in metal ion transport, while the LA major proteins refer to embryo's nutrition and protection against pathogens. On the other hand, active proteases have been identified in the two fluids using gelatin zymography. By mass spectrometry analysis, a total of 12 proteases was detected in the LC, compared to only 5 in the LA. These proteases are defined to be involved in morphogenesis and tissue remodeling, and 4 of them, uniquely found in the LC, are digestive proteases. Altogether, these data give new insights in the respective properties and roles of LA and LC in embryo development. This study will allow us to identify biomarkers reflecting a good embryonic development, to evaluate the impact of *in ovo* injections (vaccines, probiotics) on LA and LC compositions and explore their repercussions on the development of the embryo and chick health.

INTRODUCTION

Chez les espèces ovipares, les structures extra-embryonnaires maintiennent les fonctions vitales de l'embryon, comme la respiration et la digestion, jusqu'à ce que les organes de l'embryon deviennent fonctionnels. Il existe trois compartiments extra-embryonnaires pour les espèces ovipares : les sacs vitellin, amniotique et allantoïque. Chez la poule, le sac vitellin a été démontré comme impliqué dans la digestion des protéines et des lipoprotéines contenues dans le jaune d'œuf (Speier et al., 2012). Le sac allantoïque quant à lui est directement relié aux reins de l'embryon et sert de compartiment de stockage pour ses excréments (Everaert et al., 2011). Le sac allantoïque tout comme le sac vitellin est un diverticule de l'intestin, toutefois ses capacités digestives - démontrées pour le sac vitellin - n'ont jamais été étudiées (Romanoff, 1960).

Pour l'ensemble des amniotes, le sac amniotique protège l'embryon contre les chocs mécaniques et contre la déshydratation. Toutefois, le fluide amniotique semble posséder des fonctions plus spécifiques chez l'homme, comme la protection de l'embryon contre les pathogènes (Michaels et al., 2007) ; mais ces fonctions n'ont jamais été explorées chez les espèces ovipares. En outre, le transfert du blanc dans le sac amniotique au 12^{ème} jour du développement (J12) reste un événement majeur du développement de l'embryon d'oiseau, puisqu'il participe à sa nutrition (absorption orale par l'embryon), et ainsi, à la croissance de ses organes. Cependant l'influence exacte des composés du fluide amniotique sur les protéines du blanc et leur assimilation reste à l'heure actuelle inconnue.

Dans cette étude, nous avons tout d'abord suivi l'évolution de certains paramètres physicochimiques des fluides amniotique (LA) et allantoïque (LC), ainsi que l'évolution de leurs profils protéiques par SDS-PAGE, de J8 à J16. Des analyses par spectrométrie de masse nous ont ensuite permis d'identifier les protéines majoritaires de deux fluides, pour mieux appréhender leurs rôles au cours de l'incubation. En parallèle, nous avons étudié la présence et l'activité de protéases à l'aide de tests enzymatiques couplés à une analyse par spectrométrie de masse, pour mieux comprendre les rôles des fluides dans l'activation de précurseurs protéiques et/ou dans les processus de digestion du jaune et du blanc d'œuf.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Procédures d'incubation et échantillonnage

Des œufs embryonnés de poules pondeuses (ISA Brown, Hendrix Genetics, Saint Brieu, France) ont été conservés pendant 3 jours à 16°C et 85% d'humidité pour synchroniser le développement des embryons, puis les œufs ont été incubés à 37,8°C et

45% d'humidité. 25 œufs par stade ont été sélectionnés (poids et taille équivalents), et les œufs microfêlés (Acoustic Egg Tester, KU Leuven, Belgium), ou ceux contenant des embryons non synchronisés (table d'Hamburger et Hamilton, 1951) ont été écartés de l'analyse. Les LA et LC ont été prélevés à l'aide d'une seringue, à travers les membranes amniotique et chorioallantoïque, respectivement. En cas de contamination (sang, méconium), les prélèvements étaient stoppés. Les échantillons ont été stockés à -20°C.

1.2. Mesure des paramètres physicochimiques

Les LA et LC ont été centrifugés (3000 g, 10 min, 4°C) pour éliminer les contaminants cellulaires. Le volume, le pH (Microelectrode pH InLab 423, Fisher Scientific, Illkirch, France), et l'osmolalité (Fiske Mark 3 Osmometer, Advanced Instruments, Niederbronn Les Bains, France) ont ensuite été mesurés. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Pour chaque fluide, les comparaisons entre les différents stades du développement ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 1 facteur.

1.3. Analyse des profils protéiques par SDS-PAGE

Pour chaque fluide et stade, 9 échantillons homogènes ont été mélangés (sélection en fonction des paramètres physicochimiques mesurés), pour une analyse comparative par SDS-PAGE. Les concentrations en protéines ont été déterminées par la méthode de Lowry à l'aide du kit DC Protein Assay (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Pour les LA J8-11 et LC J8-16, 16 µl d'échantillon brut ont été mélangés avec 4 µl de tampon de charge (0,25 M Tris-HCl, 0,05% bleu de bromophénol, 50% glycérol, 5% SDS, pH 6,8) avant dépôt sur gel. Pour les LA J12-16 et les blancs, 10 µg par puits ont été déposés. Le gel a ensuite été coloré au bleu de Coomassie.

1.4. Analyse par spectrométrie de masse

Les bandes de gel découpées ont été lavées avec un mélange d'eau et d'acétonitrile. Les protéines ont été réduites, alkylées, et digérées par la trypsine selon la méthode de Shevchenko et al. (Shevchenko et al., 1996). Les peptides extraits du gel avec de l'acide formique et de l'acétonitrile, ont été concentrés puis analysés à l'aide d'un spectromètre de masse LTQ Orbitrap Velos (ThermoSavant, ThermoFisher Scientific) couplé à une chromatographie liquide Ultimate® 3000 RSLC (Dionex, Amsterdam, The Netherlands). Les banques de données ont été interrogées à l'aide de Mascot et les protéines validées par Scaffold (95% de probabilité, 2 peptides uniques).

1.5. Activité protéolytique

Les activités protéolytiques ont été visualisées par zymographie (substrat : gélatine 0,3%). Les quantités déposées sont les mêmes que celles utilisées pour les gels SDS-PAGE (voir section 1.3.). Après incubation dans du Triton X-100 pour enlever toute trace de SDS, les gels ont été incubés sur la nuit, à 37°C dans un tampon d'activation (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 mM CaCl₂, pH 7,5) et ensuite coloré au bleu de Coomassie.

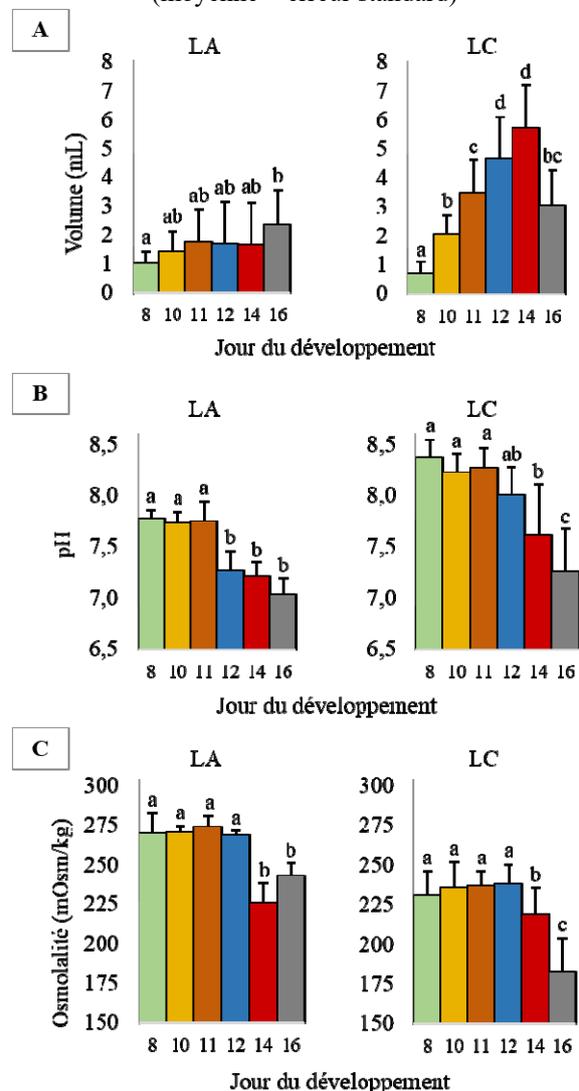
2. RESULTATS ET DISCUSSION

De J8 à J16, les propriétés physicochimiques et les profils protéiques des LA et LC évoluent. Alors que le volume du LA ne cesse d'augmenter de J8 à J16 (1,02 à 2,36 ml) (Figure 1A), le pH et l'osmolalité du fluide diminuent à partir de la seconde moitié du développement. En effet, le pH passe de 7,75 à 7,04 (J11 à J16) et l'osmolalité diminue de 269 à 226 mOsm/kg (J12 à J16) (Figure 1B et 1C respectivement). Toutefois, il a été démontré que ces paramètres ré-augmentaient assez rapidement pour atteindre de nouveau leurs valeurs initiales (Boutillier et al., 1977 ; Bolin G. and Burggren W., 2013), et ce, dans le but de maintenir un environnement homéostatique autour de l'embryon. Les changements de pH et d'osmolalité à J12 pourraient s'expliquer par le transfert massif des protéines du blanc dans le sac amniotique, que l'on visualise sur le gel SDS-PAGE à partir de J12 (Figure 2A). Les profils protéiques du blanc ainsi visualisés dans le LA correspondent exactement aux profils observés pour le blanc seul de J8 à J16, ce qui suggère que les protéines du blanc ne sont pas affectées par leur transfert dans le LA. Ainsi les antiprotéases du blanc qui inhibent la protéolyse dans le blanc (Saxena and Tayyab, 1997), pourrait aussi limiter la lyse des protéines dans le LA. Toutefois, si aucun changement n'est observé dans la fraction protéique majoritaire du LA, des changements plus subtils pourraient intervenir dans la fraction minoritaire, non visible sur gel, et ainsi entrainer des modifications dans les activités du fluide. De telles variations de profils protéiques ont déjà été observées pour la fraction héparine du blanc d'œufs fertilisés sur gel SDS-PAGE (Guyot et al., 2016).

A l'inverse du LA, le profil protéique du LC semble peu affecté au cours du développement (Figure 2A). De légères variations d'intensité de bande sont toutefois observées de J8 à J16. Le volume du LC qui augmente au départ sous le flux d'urine en provenance des reins de l'embryon, diminue rapidement de J14 à J16 en passant de 5,74 à 3,07 ml (Figure 1A). En effet, le métabolisme embryonnaire s'accélérate à partir de J12, l'eau présente dans les compartiments extra-embryonnaires est transférée vers l'embryon sous l'action de la membrane allantoïque interne mature qui transporte

sélectivement les ions Na⁺ et Cl⁻ du LC vers le plasma. Ce transfert entraîne une diminution de l'osmolalité dans le LC de 238 à 183 mOsm/kg (J12 à J16) (Figure 1C) et crée ainsi un gradient osmotique entre le LC et le plasma (~270 mOsm/kg). Sous l'effet du gradient, l'eau est transférée du LC vers le plasma, et ainsi redirigée vers l'embryon. L'accélération du métabolisme à J12 entraîne également une sécrétion de protons dans le LC illustrée par la diminution du pH de J11 à J16 de 8,27 à 7,26 (Figure 1B), pour ensuite atteindre 5,9 à J19 (Boutillier et al., 1977). Cette forte variation de pH a encore des effets inconnus sur les composés du LC et leurs fonctions.

Figure 1. Evolution des volumes (A), pH (B) et osmolalités (C) des fluides amniotique (LA) et allantoïque (LC) au cours du développement (moyenne ± erreur standard)

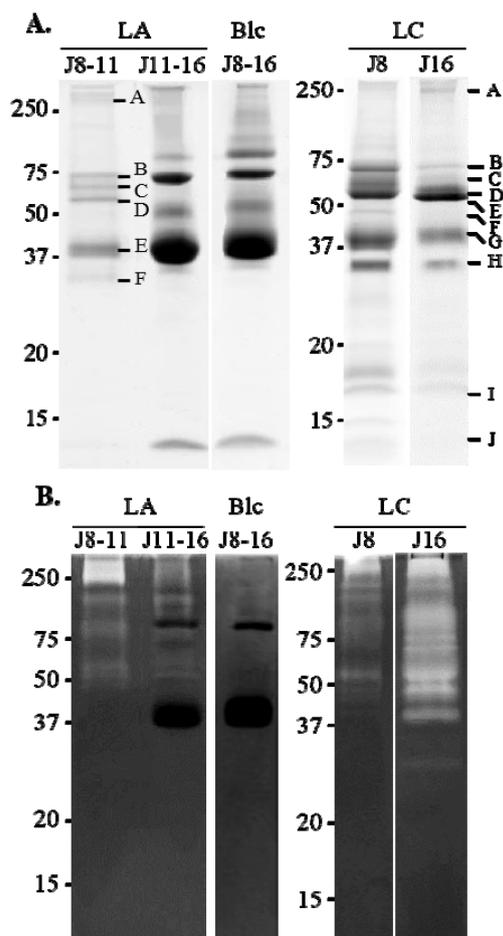


Les différences significatives entre les stades sont indiquées par les lettres a, b, c et d (p -value < 0,05).

Pour mieux comprendre les rôles respectifs du LA et du LC, nous avons approfondi notre étude en identifiant les protéines les plus abondantes des deux

fluides. Pour cela, les bandes observées sur les gels SDS-PAGE ont été découpées (lettres, Figure 2A) et, après digestion trypsique, les peptides ont été analysés par spectrométrie de masse à haute résolution couplée à de la chromatographie liquide. Sept protéines ont ainsi été identifiées dans le LA à J11 (Figure 2A) : l'ovalbumine (bande #E) et l'ovotransferrine (#B et #C) qui sont également connues en tant que protéines majeures du blanc ; l'albumine sérique (#D), l'immunoglobuline Y (#A), la transthyréline et la vitellogénine-1 (#F) qui sont issues du jaune d'œuf, et en partie resynthétisées par la membrane du sac vitellin lors du développement ; et enfin l'alpha-fœtoprotéine (#D) qui est synthétisée par l'embryon. Il semblerait donc que les protéines du LA aient des origines variées, avec notamment des protéines en provenance du blanc, et ce, même avant son transfert massif à J12.

Figure 2. Profils protéiques (A) et zymographies (B) des fluides amniotique (LA) et allantoïque (LC), et du blanc d'œuf (Blc) du 8^{ème} au 16^{ème} jour du développement embryonnaire (J8-16)



Les lettres correspondent aux bandes découpées et analysées par spectrométrie de masse.

Dix protéines majeures ont été identifiées par cette même technique dans le LC à J16 (Figure 2A). Tout comme pour le LA, l'ovalbumine (#G),

l'ovotransferrine (#B et #C), l'albumine sérique (#E), la transthyréline (#H) et l'alpha-fœtoprotéine (#D) ont été identifiées. Des protéines impliquées dans le transport de lipides telles que les apolipoprotéines AI et B (#I et #A respectivement) ou la protéine liant les acides gras extracellulaires (#I) ont également été identifiées ainsi qu'une protéine impliquée dans le transport de vitamine D (#F). Une autre protéine majeure du blanc d'œuf a également été identifiée, le lysozyme (#J).

Avec des protéines en provenance des différents compartiments de l'œuf (jaune, blanc, et embryon), le LC conserve une dominante de protéines originaires du jaune. Ce phénomène s'explique par le système d'assimilation des composés du jaune par les différentes structures de l'œuf. En effet, la membrane du sac vitellin absorbe - et digère - les protéines et lipoprotéines du jaune qui sont ensuite transférées vers l'embryon via le système sanguin très développé à la surface du sac vitellin (Romanoff, 1960). Une fois assimilées, une partie de ces protéines sont excrétées par l'embryon dans l'allantoïde, et se retrouvent mélangées avec les autres composés du LC.

Tout comme le sac vitellin, l'allantoïde est un diverticule de l'intestin dont la membrane présente un système sanguin très développé. Les propriétés d'absorption de la membrane allantoïque ont déjà été démontrées pour les ions Na⁺ et Cl⁻, mais sa capacité à absorber ou digérer les autres composés du LC, et surtout les protéines, n'a jamais été explorée. Des études précédentes ont toutefois démontré la présence de protéases dans le LC sans jamais identifier leur rôle exact dans ce compartiment (Kandeil et al., 2014). Dans un premier temps, pour visualiser ces activités protéolytiques, des zymographies ont été réalisées en utilisant de la gélatine comme substrat pour les protéases, ainsi qu'un tampon à pH 7,5 (pH physiologique moyen pour le LC sur la période étudiée). Des protéases actives ont ainsi été détectées dans les échantillons de LC avec une activité croissante de J8 à J16 (Figure 2B). Pour identifier les protéases responsables de l'activité, les bandes sur gel SDS-PAGE correspondantes aux bandes de lyse sur la zymographie ont été découpées et analysées par spectrométrie de masse. Douze protéases ont ainsi pu être identifiées dans le LC. Certaines sont impliquées dans le remodelage tissulaire ou la morphogénèse (la protéase à sérine transmembranaire 9, la matriptase, la métalloprotéase de matrice 2, l'activateur du facteur de croissance hépatocytaire, et la métalloprotéase astacin-like), d'autres dans la coagulation (le plasminogène, la prothrombine, et le facteur de coagulation X) ou dans la digestion (l'aminopeptidase N, la dipeptidyl peptidase 4, et la méprine A). Ce potentiel d'activités digestives combiné à la forte baisse de pH observée pour le LC dans les derniers stades du développement (Boutilier et al., 1977), en font un milieu idéal pour la digestion de protéines.

D'autre part pour mieux comprendre l'impact des composés du LA sur l'assimilation du blanc après son

transfert dans le sac amniotique, la même stratégie a été appliquée. Des protéases actives ont été visualisées sur zymographie de J8 à J16 (Figure 2B) et 5 protéases précédemment identifiées par spectrométrie de masse dans le LC ont été mises en évidence dans ce fluide (la protéase à sérine transmembranaire 9, la matriptase, la métalloprotéase astacin-like, la carboxypeptidase M et le plasminogène). A l'inverse du LC, elles ne semblent pas impliquées dans des processus de digestion. En ce sens, l'impact du LA sur les composés du blanc semble minime, expliquant de ce fait l'absence de changement dans les profils du blanc avant et après transfert dans le sac amniotique (Figure 2A). De plus des protéines du blanc ont été retrouvées non dégradées dans les organes de l'embryon suggérant un transfert de protéines entières depuis le sac amniotique vers les organes embryonnaires (Sugimoto et al., 1999).

CONCLUSION

Les paramètres physicochimiques des fluides amniotique et allantoïque varient au cours du développement embryonnaire, particulièrement à J12 avec l'accélération du métabolisme de l'embryon, et le transfert du blanc dans le sac amniotique.

Des protéines et protéases similaires ont été identifiées dans les deux fluides, avec des fonctions dans le métabolisme des lipides et des vitamines, mais également dans la défense, la morphogénèse et le remodelage tissulaire. Toutefois, les compositions globales des deux fluides en protéines diffèrent, avec une composition proche de celle du jaune pour le LC et proche de celle du blanc pour le LA. Par ailleurs, des protéases digestives ont spécifiquement été identifiées dans le LC. L'ensemble de ces résultats suggère des fonctions biologiques plus complexes qu'initialement décrites pour les deux fluides extra-embryonnaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bolin G. and Burggren W., 2013. Comparative Biochemistry and Physiology (166), 343-350*
Boutillier R. et al., 1977. Respiration physiology (31), 81-89
Everaert N. et al., 2011. Respiratory physiology & neurobiology (178), 118-28
Guyot N. et al., 2016. Poultry Science (ahead of print)
Hamburger V. and Hamilton H., 1951. Journal of Morphology (88), 49-92
Kandeil A. et al., 2014. Journal of virological methods (202), 28-33
Michaels J. and al., 2007. Journal of Proteome Research (6) 1277-85
Romanoff A., 1960. The Macmillan Company
Saxena I. and Tayyab S., 1997. Cellular and Molecular Life Sciences (53), 13-23
Shevchenko A. et al., 1996. Analytical Chemistry (68), 850-8
Speier J. et al., 2012. Poultry Science (91), 1941-9
Sugimoto Y. et al., 1999. The Journal of biological chemistry (274), 11030-7