

Les défenses naturelles primaires de l'œuf

L'œuf constitue un modèle autosuffisant qui doit couvrir l'ensemble des besoins de l'embryon, de la ponte à l'éclosion. L'une de ses fonctions essentielles est d'assurer la protection de l'embryon tout au long de son développement tout en faisant face aux diverses pressions microbiennes de l'environnement. L'œuf de poule constitue donc une enceinte close qui doit être exempte de tout microorganisme. Cependant, il existe sur la coquille une flore de surface, où cohabitent des bactéries telles qu'*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia fergusonii*, *Kluyvera* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia hermannii* et *Salmonella Typhimurium* (Musgrove, 2011), qui reflète l'environnement d'élevage des poules pondeuses. Ces bactéries peuvent infecter l'œuf selon deux voies : par transmission verticale, directement de la poule à l'œuf lors de sa formation, ou horizontale, par contact avec l'environnement une fois l'œuf pondu, à travers une coquille défectueuse (Gantois *et al.*, 2009) (**Figure 12**).

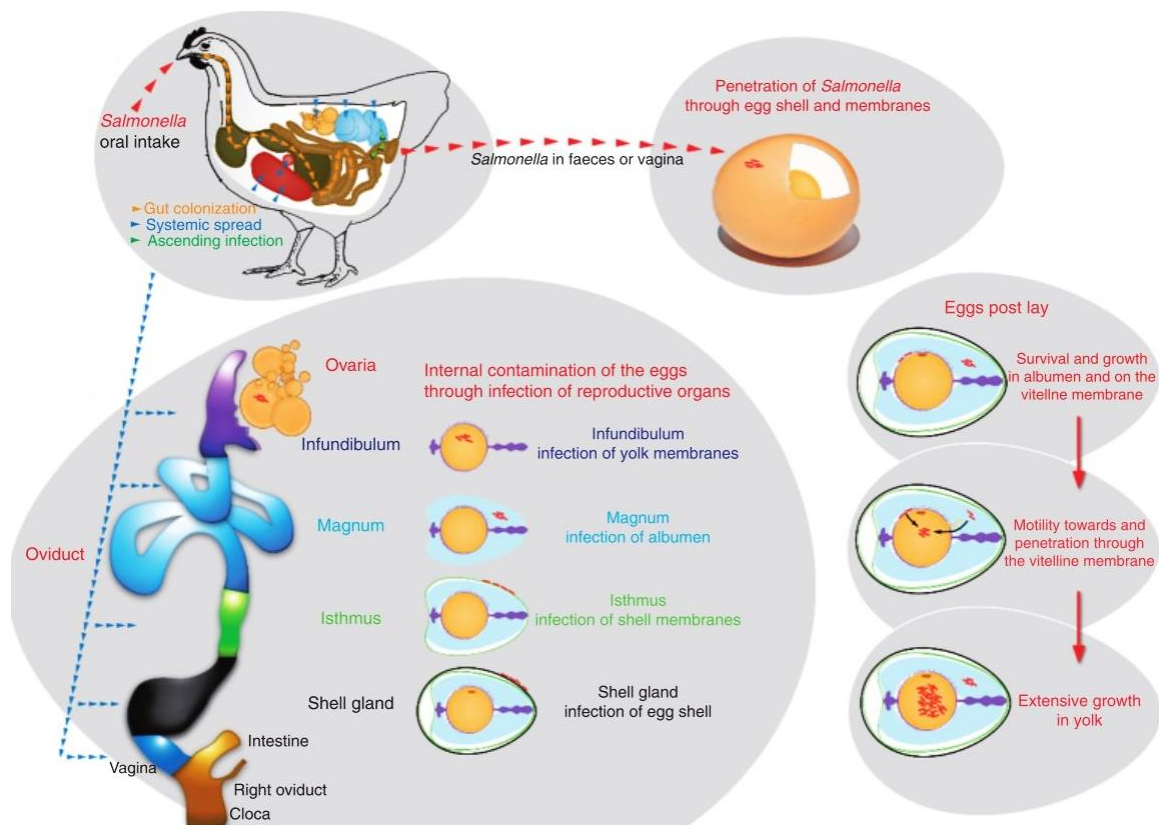


Figure 12 : Schéma d'infection bactérienne dans l'œuf de poule au moment de la formation de l'œuf (contamination verticale) et après l'oviposition (contamination horizontale) (Gantois *et al.*, 2009)

Seule *Salmonella enterica* Enteritidis, une bactérie gram négative responsable de toxico-infections alimentaires, est capable de se développer dans le blanc d'œuf, car elle réussit à s'adapter et à survivre à la plupart des mécanismes antibactériens de l'œuf (De Reu *et al.*, 2006; Gantois *et al.*, 2009; Howard *et al.*, 2012). Cependant, la plupart du temps, ces mécanismes empêchent la majorité des bactéries de pénétrer et de proliférer dans l'œuf, ce qui souligne l'efficacité de ces systèmes.

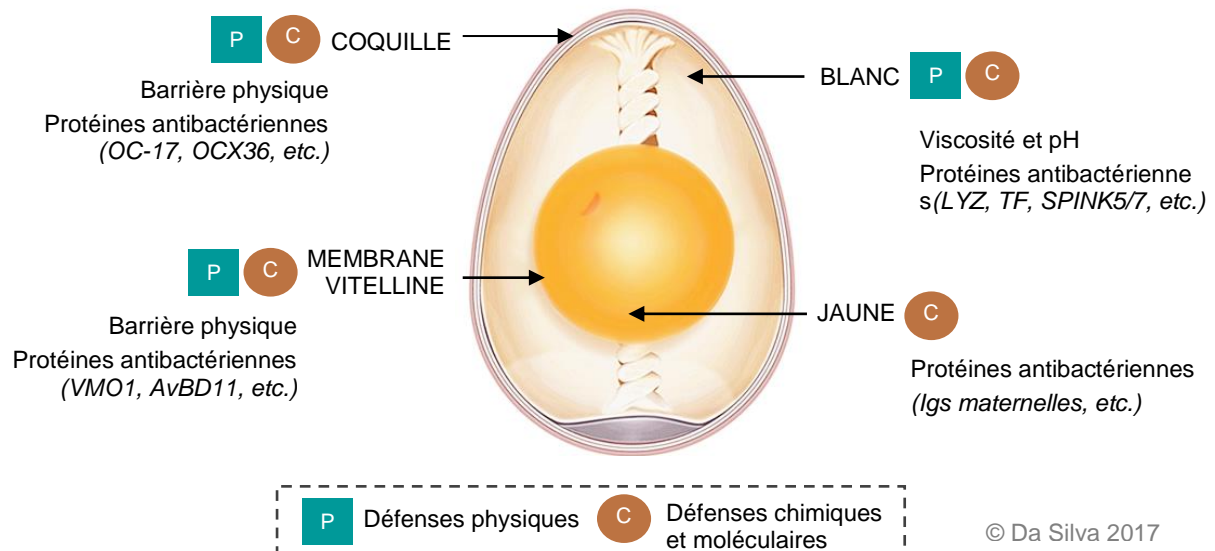


Figure 13 : Les défenses physiques, chimiques et moléculaires innées de l'œuf de poule, après oviposition.

Ces systèmes de protection reposent sur des défenses à la fois physiques (la coquille, la membrane vitelline et les propriétés mécaniques des fluides vont freiner, voire inhiber la migration des pathogènes), moléculaires (protéines et peptides antibactériens de l'œuf, comme TF ou LYZ) (Réhault-Godbert *et al.*, 2011), et enfin chimiques (pH du blanc) (Howard *et al.*, 2012) (Figure 13).

1 - La coquille, la première barrière contre les pressions de l'environnement

1.1 - Une structure cristalline sophistiquée

La coquille protège le contenu de l'œuf et l'embryon des pressions de l'environnement. Sa solidité est liée non seulement à son épaisseur (300 µm), mais également à son ultrastructure (Nys et Guyot, 2011). En effet, la morphologie, la taille, le nombre et

l'orientation des cristaux de calcite procurent à la coquille des propriétés mécaniques remarquables et uniques dans le monde animal (**Figure 14**) (Nys *et al.*, 2004). Ainsi, chez la poule, les cristaux de calcite répartis en cônes juxtaposés de 200-300 μm de long sur 10 à 30 μm d'épaisseur, sont évasés vers l'extérieur, ce qui assure une meilleure résistance contre les chocs mécaniques (Panheleux *et al.*, 1999) (**Figure 14 A**). Chez la pintade, la réorientation des cônes de calcite dans la moitié supérieure confère à la coquille des propriétés de résistance plus élevées (**Figure 14 B**).

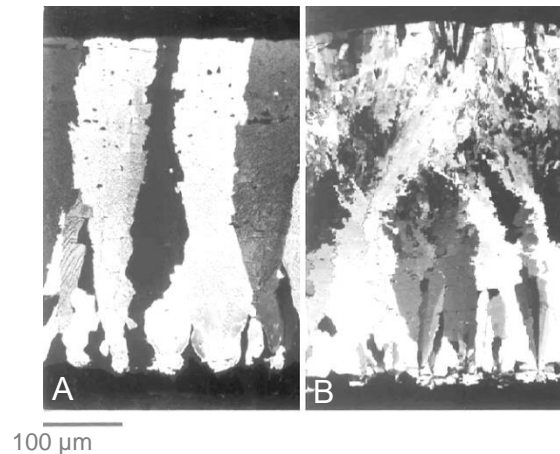


Figure 14 : Sections transversales de coquilles d'œufs de poule (A) et de pintade (B) observées en lumière polarisée (Panheleux *et al.*, 1999).

La couche finale de cristaux verticaux, perpendiculaires à la coquille, ainsi que la cuticule qui recouvre l'ensemble de la coquille, empêchent non seulement les pertes en eau, mais aussi la pénétration bactérienne (Nys *et al.*, 2010). Si la cuticule est retirée le risque de pénétration microbienne augmente alors de 20 à 60% (De Reu *et al.*, 2006).

1.2 - Les propriétés de la matrice organique

Les interactions entre le minéral inorganique et les protéines de la matrice organique établissent l'architecture unique de la coquille qui empêche la plupart des pathogènes d'accéder aux autres structures de l'œuf. Cette matrice organique contient un certain nombre de protéines antibactériennes telles que LYZ, TF, OCX36, OC-17, ou CST3 (Mann *et al.*, 2006; Wellman-Labadie *et al.*, 2008; Jonchère *et al.*, 2010; Rose-Martel *et al.*, 2012; Marie *et al.*, 2015). Le mécanisme d'action de ces molécules au sein de la coquille reste peu connu, mais il est possible qu'elles soient solubilisées au cours du développement pour assurer une protection locale à l'interface entre la coquille et les structures extra-embryonnaires. Malgré cette première barrière, certains pathogènes parviennent néanmoins à accéder aux structures

internes de l'œuf, et ce, du fait de l'irrégularité de la coquille (cuticule non homogène, couche mamillaire anormale, microfissures liées à des chocs, etc.) (Nascimento et Solomon, 1991).

1.3 - Solubilisation au cours du développement

A partir de la seconde moitié de l'incubation (ED10-11) et jusqu'à l'éclosion (ED21), la coquille est progressivement dégradée et utilisée comme source de calcium par l'embryon (Moran, 2007).

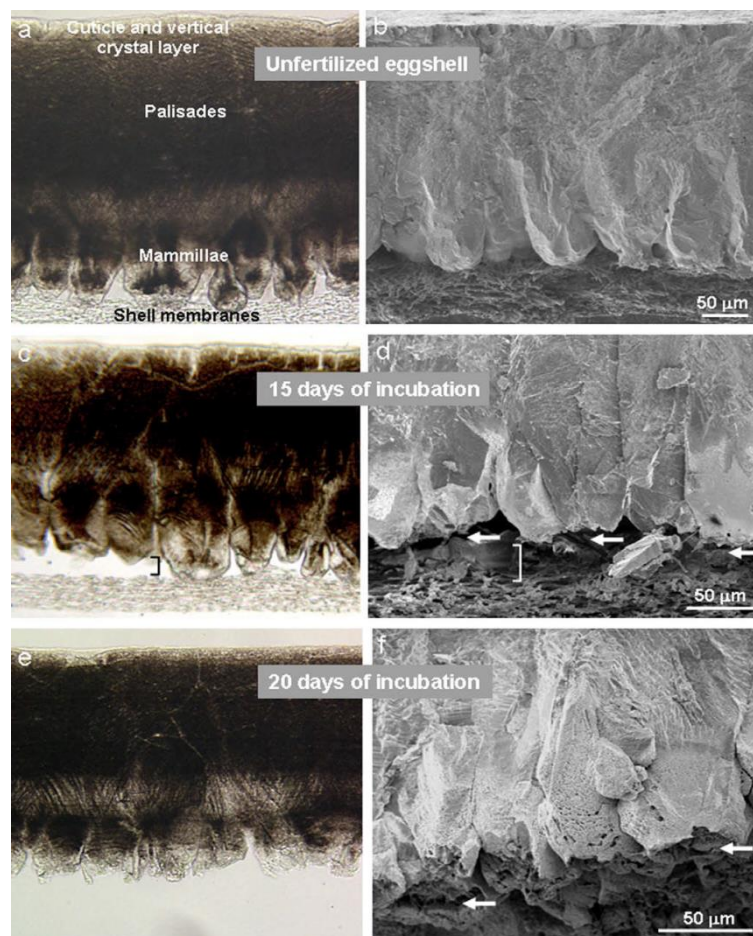


Figure 15 : Dégradation progressive de la coquille au cours du développement embryonnaire. Observation par microscopies optique (gauche) et électronique à balayage (droite) de coquilles d'œufs de poule non-fertilisés (a-b) et fertilisés (c-f). Les flèches indiquent les noyaux mamillaires, alors que les crochets illustrent le détachement des membranes coquillières (Chien *et al.*, 2009).

Alors que la majeure partie du calcium est transportée vers l'embryon grâce à la membrane chorioallantoïque (voir section A2.3) pour minéraliser son squelette, une autre partie est redirigée vers le jaune d'œuf et stockée pour subvenir aux besoins nutritionnels et énergétiques du poussin après éclosion. Lors du processus de dégradation, les noyaux

mamillaires sont progressivement solubilisés, entraînant un détachement des membranes coquillières de la partie minéralisée (**Figure 15, c-f**) (Chien *et al.*, 2009). La solubilisation et le transport du calcium met en jeu un certain nombre de mécanismes impliquant des protéines de la membrane chorioallantoïque qui lient le calcium, des calcium ATPases et des anhydrases carboniques (Tuan *et al.*, 1986; Gabrielli et Accili, 2010). Ce processus entraîne de plus un relargage de protéines de la matrice organique, telles que des protéines antimicrobiennes qui peuvent ainsi être activées et agir localement.

In fine, l'amincissement de la coquille facilite la sortie de l'œuf pour le poussin (Chien *et al.*, 2009). Cependant, cela peut également entraîner des problèmes de contamination de l'œuf et de l'embryon dans les derniers stades du développement, puis du poussin au moment de l'éclosion, lors de l'ingestion de la coquille et donc de la flore de surface.

2 - Le blanc d'œuf, une barrière moléculaire et physicochimique contre les pathogènes

L'essentiel des protéines et peptides antibactériens de l'œuf sont concentrés dans le blanc d'œuf. Sa place stratégique autour de l'embryon et du jaune, ainsi que ses propriétés physicochimiques uniques (pH et viscosité) en font une barrière efficace contre les pathogènes.

2.1 - Les protéines et peptides antibactériens

- Des effecteurs efficaces de l'immunité innée de l'œuf -

Le caractère antibactérien du blanc d'œuf non fertilisé ou de ses protéines a déjà été exploré dans de nombreuses études menées contre *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* Enteritidis, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Bacillus thuringiensis*, etc. (Réhault *et al.*, 2007; Baron *et al.*, 2016; Guyot *et al.*, 2017). Ces protéines agissent selon quatre mécanismes d'action bien distincts : 1) en chélatant des composés essentiels à la survie et la croissance bactérienne, 2) en dégradant directement les parois bactériennes, 3) en inhibant l'action de leurs protéases invasives, ou 4) en limitant leur adhésion à l'hôte (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Liste des principales protéines et peptides antibactériens du blanc d'œuf chez la poule. Catégories de protéines : 1) chélatant les éléments essentiels aux bactéries, 2) dégradant les parois bactériennes, 3) inhibant les protéases invasives, et 4) limitant l'adhésion à l'hôte. Les mécanismes d'action inconnus sont affichés par un point d'interrogation au niveau de la catégorie.

Cat	Nom de la protéine	Symbole du gène	Mécanisme d'action	Références
1	Ovotransferrine	TF	Lie le fer	(Baron <i>et al.</i> , 1999, 2014)
1	Avidine	AVD	Lie la biotine	(Korpela <i>et al.</i> , 1984)
1	Protéine liant la riboflavine	RBP	Lie la riboflavine	(White and Merrill, 1988)
2	Lysozyme	LYZ	Lyse le peptidoglycane	(Nakimbugwe <i>et al.</i> , 2006)
2	Bêta-défensine aviaire 11	AvBD11	Peptide cationique	(Guyot <i>et al.</i> , 2016a)
2	Pléiotrophine	PTN	Lyse les bactéries (<i>Humain</i>)	(Guyot <i>et al.</i> , 2016a)
2	Protéine Tenp / Ovoglobuline G2	BPIFB2/TENP/G2	Famille de protéines BPI/LBP	(Maehashi <i>et al.</i> , 2014)
3	Ovostatine	OVST	Inhibiteur de métalloprotéases et de protéases à cystéine	(Molla <i>et al.</i> , 1987)
3	Ovomucoïde	SPINK7	Inhibiteur de protéases à sérine	(Ardelt et Laskowski, 1985)
3	Cystatine	CST3	Inhibiteur de protéases à cystéine	(Björck, 1990)
3	Ovoinhibiteur	SPINK5	Inhibiteur de protéases à sérine	(Bourin <i>et al.</i> , 2011)
4	Ovomucine	MUC5B et MUC6	Freine les bactéries	(Bar-Shira <i>et al.</i> , 2014)
?	Galline	GALN1	Peptide cationique	(Whenham <i>et al.</i> , 2015)
?	Ovalbumin-related protein X	OVALX	Peptide cationique	(Réhault-Godbert <i>et al.</i> , 2013)
?	Vitelline Membrane Outer layer protein 1	VMO1	Peptide cationique	(Guyot <i>et al.</i> , 2016a)
?	Bêta-microsémipoprotéine-like	BMSP	Peptide cationique	(Guyot <i>et al.</i> , 2016a)

Parmi ces protéines, on dénombre quelques IgA et M dans le blanc d'œuf (Mann, 2007; Mann et Mann, 2011). Ces Igs sont initialement présentes dans l'oviducte, surtout au niveau du magnum, qu'elles protègent des infections bactériennes (Zheng *et al.*, 1997). Leur présence dans le blanc pourrait être le résultat d'un mécanisme de transfert non-spécifique, entraînant l'inclusion d'IgA et M du magnum dans les sécrétions de protéine du blanc.

- Assimilation par l'embryon au cours de l'incubation -

A ED10, 76% de l'eau contenue dans le blanc ont été transférés dans le jaune d'œuf (Baggott *et al.*, 2002). De plus, le développement progressif des structures extra-embryonnaires a repoussé les composés du blanc vers le pôle végétal de l'œuf, laissant l'embryon sans défense apparente (**Figure 6**). Toutefois, à ED12, le blanc d'œuf est transféré dans le sac amniotique, ce qui pourrait rétablir la protection autour de l'embryon (**Figure 16**). Le mélange de l'AmF et du blanc d'œuf est ensuite absorbé oralement par l'embryon à partir d'ED13, pour accompagner la phase intensive de croissance du corps et des organes lors de la deuxième moitié de l'incubation (Romanoff, 1960; Geelhoed et Conklin, 1966; Carinci et

Manzoli-Guidotti, 1968; Freeman et Vince, 1974). Une partie des protéines est absorbée par la membrane de l'intestin et redirigée vers les organes de l'embryon (Speier *et al.*, 2012; Miska *et al.*, 2014) (**Figure 16**), en atteste la présence d'OVAL dans le cerveau, la moelle épinière, les muscles, etc. (Sugimoto *et al.*, 1999; Shinohara *et al.*, 2005). Les autres protéines sont transportées dans le sac vitellin (Carinci et Manzoli-Guidotti, 1968; Baintner et Fehér, 1974; Sugimoto *et al.*, 1989; Yoshizaki *et al.*, 2002) pour y être digérées avec les autres composés du jaune et ensuite transférées vers l'embryon (voir section A2.1). Les acides aminés, peptides, ou protéines résultants du métabolisme embryonnaire sont sécrétés dans le sac allantoïque (Bolin et Burggren, 2013; Bolin *et al.*, 2017), dans lequel ils pourraient être à nouveau réabsorbés, cette fois-ci par la membrane chorioallantoïque (Yoshizaki *et al.*, 2002; Moran, 2007) (**Figure 16**). Un transfert direct des protéines de l'intestin vers le sac allantoïque est aussi probable (Romanoff, 1960), tout comme le transfert vers le jaune *via* la membrane vitelline résiduelle (Kaspers *et al.*, 1996).

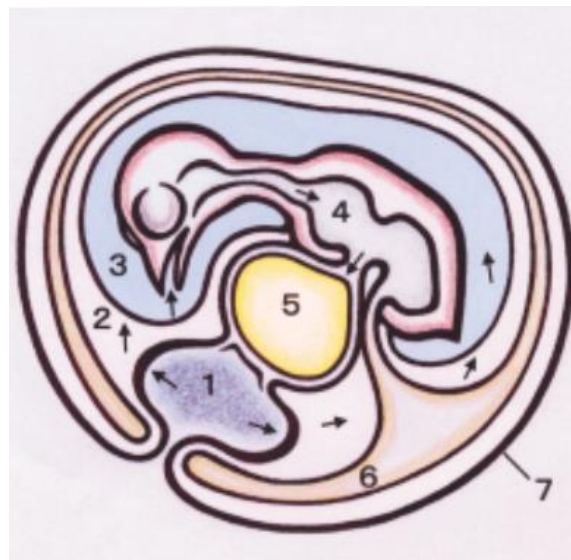


Figure 16 : Assimilation des composés du blanc par l'embryon de caille (Yoshizaki *et al.*, 2002). Le blanc (1) est transféré dans le sac amniotique (3) *via* l'espace interstitiel (2), puis absorbé oralement par l'embryon. Une partie des protéines du blanc est absorbée par l'intestin (4), et le reste est transféré dans le sac vitellin, pour y être digéré (5) ou directement sécrété dans le sac allantoïque (6). La réabsorption des protéines du fluide allantoïque par la membrane chorioallantoïque n'a jamais été démontré (7).

Plus récemment, une étude menée sur des œufs de poule fertilisés a également démontré que les activités anti-*Listeria monocytogenes* et *Streptococcus uberis* du blanc d'œuf, bien que diminuées, étaient maintenues lors du développement embryonnaire, et ce, jusqu'à ED12 (Guyot *et al.*, 2016a). Les protéines antibactériennes du blanc semblent donc toujours actives juste avant leur transfert dans le sac amniotique.

2.2 - Les paramètres physicochimiques

- Le pH -

Dans un œuf fraîchement pondu, fertilisé ou non, le pH du blanc augmente rapidement de 7,6 à 9,0 (Figure 17 A), sous l'effet de la diffusion du CO₂ à travers la coquille (Guyot et al., 2016b). Ce phénomène affecte non seulement la survie et la croissance des bactéries, mais aussi la mobilité flagellaire et le stress oxydatif des bactéries (Réhault et al., 2007; Guyot et al., 2017). Il module également l'activité de certaines protéines antibactériennes, comme TF qui chélate mieux le fer, un élément essentiel à certaines bactéries comme *Salmonella enterica* Enteritidis (Tranter et Board, 1984), ou LYZ qui perd son activité muramidase (Banerjee et al., 2011) à pH alcalin. Cependant, prises dans leur globalité, les activités bactéricides et bactériostatiques du blanc d'œuf sont renforcées pour des valeurs de pH élevées (Alabdeh et al., 2011).

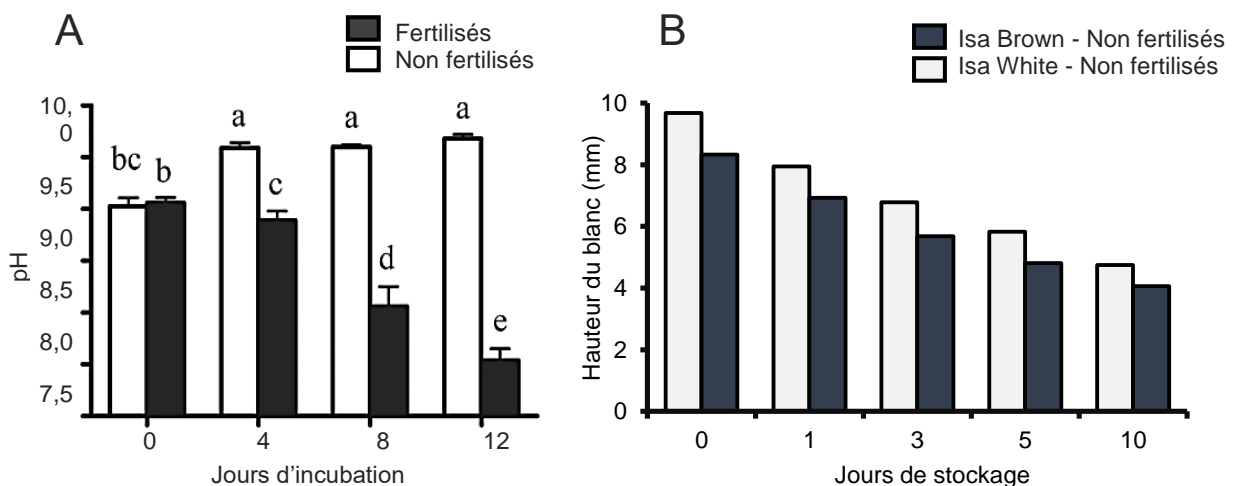


Figure 17 : Evolution du pH (A) et de la viscosité (B) du blanc d'œuf de poule fertilisé ou non au cours de l'incubation et du stockage respectivement (Silversides et Scott, 2001 (B); Guyot et al., 2016 (A)).

Lors de l'incubation, le pH du blanc d'œuf fertilisé va progressivement diminuer pour atteindre 7,5 à ED12 (Figure 17 A). A l'inverse, le pH du blanc d'œuf non fertilisé et incubé continue à augmenter pour atteindre une valeur de 9,7 au 12^{ème} jour (Guyot et al., 2016b). Cette différence s'explique par le métabolisme respiratoire de l'embryon (diffusion de CO₂ dans l'œuf) qui entraîne une diminution du pH du blanc, et modifie les propriétés antibactériennes du blanc (augmentation de l'activité muramidase de LYZ, et diminution de l'activité chélatrice de TF).

- La viscosité -

On distingue quatre couches dans le blanc : le blanc épais situé entre deux couches de blanc liquide, et les chalazes issues de la rotation lente de l'œuf dans l'utérus (Nys et Guyot, 2011). Ces dernières permettent le maintien du jaune d'œuf en position centrale, loin de toutes contaminations microbiennes qui pourraient subvenir *via* la coquille, dans l'œuf non fertilisé. La structure gélifiée du blanc d'œuf est directement liée à la présence d'ovomucine, une protéine hautement glycosylée et composée de deux sous-unités : la sous unité alpha (**MUC5B**) pauvre en glucides et une sous-unité bêta plus riche en glucides (**MUC6**) (Li-Chan et Kim, 2008). La formation de complexes avec LYZ renforce cette structure. La viscosité d'un fluide est connue pour réduire la mobilité des pathogènes (Schneider et Doetsch, 1974). La viscosité du blanc d'œuf va donc freiner les pathogènes et réduire leur accès aux nutriments du jaune. Cependant, elle est affectée par de nombreux paramètres, tels que les conditions et le temps de stockage (Silversides et Scott, 2001). En effet, l'augmentation du pH du blanc au cours du stockage (**Figure 17 A**) entraîne une dissociation du complexe formé entre l'ovomucine et LYZ, ce qui liquéfie le blanc (**Figure 17 B**) et favorise la mobilité et le pouvoir invasif des bactéries.

3 - La membrane vitelline, une barrière physique et moléculaire

La membrane vitelline constitue la dernière barrière avant le jaune d'œuf. Elle est principalement constituée de protéines fibreuses et de protéines et peptides antibactériens (**Figure 18**).

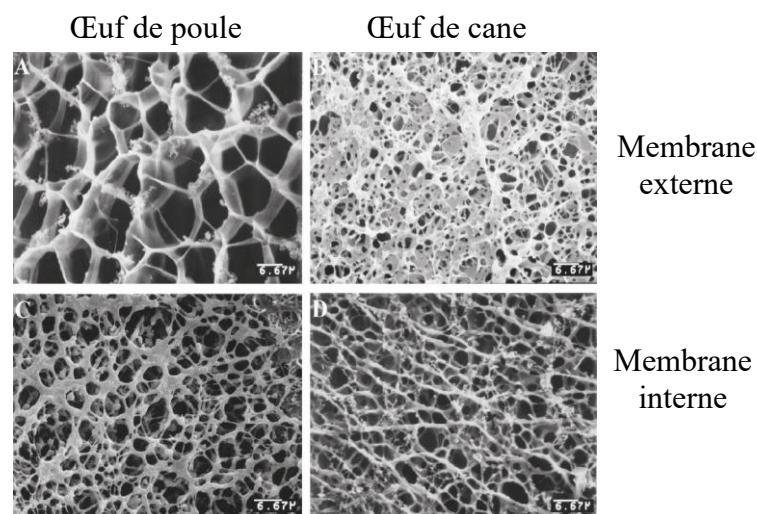


Figure 18: Structure des membranes vitellines externe et interne d'œufs de poule et de cane non fertilisés. Observation au microscope électronique à balayage (Chung *et al.*, 2010).

3.1 - Un réseau de fibres protéiques

Chez la poule, les constituants de la membrane vitelline s'entrelacent en un réseau de feuillets de 2 à 6 μm d'épaisseur (membrane externe) et de fibres de 0,3 à 0,7 μm d'épaisseur (membrane interne) (Chung *et al.*, 2010) (**Figure 18**). Ce maillage freine, voire empêche la progression des pathogènes. Les ponts disulfures formés entre les ovomucines sont essentiels pour maintenir l'intégrité de ce réseau, et ce, même après la solubilisation des deux protéines majoritaires de la membrane externe : LYZ et VMO1, qui participent également au maintien de la structure (Back *et al.*, 1982; Kido et Doi, 1988). Sur les 137 protéines identifiées dans la membrane vitelline, au moins 35 d'entre elles ont un potentiel antibactérien (Mann, 2008). Trois des protéines majoritaires, LYZ, VMO1 et AvBD11, sont connues notamment pour leur action directe contre *Salmonella enterica* Enteritidis et/ou *Listeria monocytogenes* (Guyot *et al.*, 2016b). La concentration totale en ovomucine et en LYZ est 17 fois plus élevée dans la membrane externe que dans le blanc d'œuf, dénotant le fort potentiel antibactérien, autant bactériostatique que bactériolytique, de la membrane vitelline.

Toutefois, la membrane est fortement altérée par certains paramètres en particulier l'âge et le régime alimentaire de la poule (vitamines et acides gras), ou la température de stockage de l'œuf (Li-Chan et Kim, 2008). Cette détérioration passe en partie par la solubilisation de protéines de la membrane telles que VMO1 et AvBD11 (Schäfer *et al.*, 1998), qui déstructure la membrane et la fragilise.

3.2 - Disparition progressive au cours de l'incubation

Chez la poule, suite à la fertilisation de l'ovocyte, la membrane vitelline en contact avec l'embryon est altérée (Chung *et al.*, 2010) (**Figure 19**). Des changements similaires ont été observés dans les membranes vitellines internes d'autres espèces d'oiseaux, telles que le pigeon ou la dinde (Jensen, 1969).

Chez la caille, il a été démontré que cette dégradation est liée à l'activité d'enzymes dites « d'éclosion » (famille de protéase « astacin »), localisées sur les extensions cellulaires du sac vitellin, qui remplace progressivement la membrane vitelline au cours de l'incubation (Yoshizaki *et al.*, 2002) (Voir section A2.1)

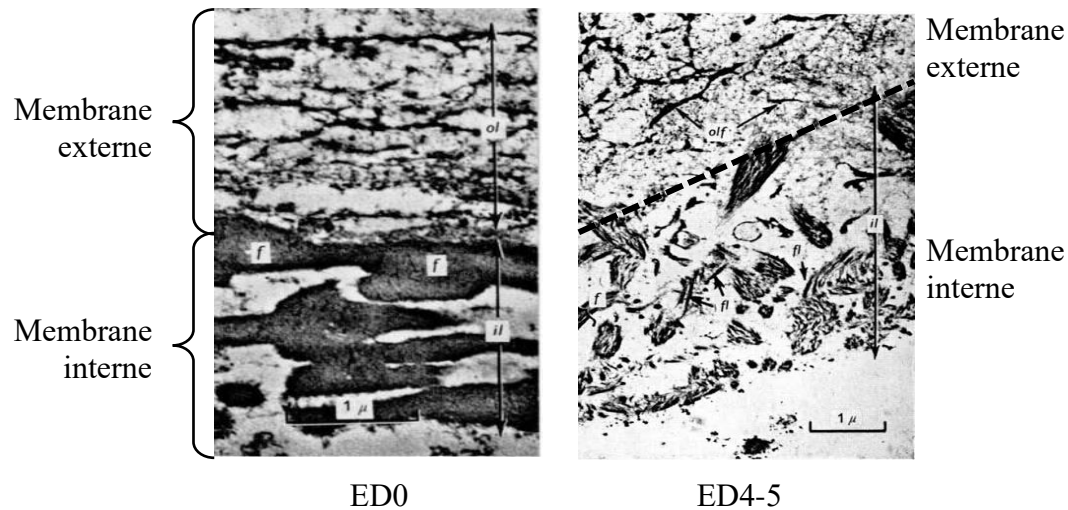


Figure 19 : Structure des membranes vitellines externe et interne d’œufs fertilisés de poule au moment de la ponte (ED0) et aux 4^{ème}-5^{ème} jours d’incubation (ED4-5). Observation au microscope électronique à balayage (Chung *et al.*, 2010).

4 - Le jaune d’œuf, une source d’immunoglobulines (Igs) maternelles

La position centrale du jaune dans l’œuf le préserve de toute attaque *via* la coquille. Quelques molécules antibactériennes (LYZ ou TF) sont retrouvées dans le jaune, mais globalement ce fluide riche en nutriments reste un milieu favorable à la croissance bactérienne. Les Igs maternelles concentrées dans ce compartiment servent principalement au moment de l’éclosion, et dans les premiers jours de vie du poussin.

4.1 - Les immunoglobulines Y (IgY)

Les Igs localisées dans le sang de la poule au moment de la formation de l’œuf sont stockées dans le jaune par endocytose, qui met en jeu un récepteur appelé FcRY (Fc receptor Y). Elles constituent donc une image à un temps donné du système immunitaire de la poule, et reflète le microbiote de son environnement d’élevage (Smith *et al.*, 1994). Leur concentration dans le jaune est très variable d’une souche à l’autre (Hamal *et al.*, 2006).

Dans le jaune, les IgY sont les Igs dominantes. Elles ont une structure singulière, proche de celles des IgG des mammifères (**Figure 20**). Les deux chaînes lourdes des IgY possèdent un domaine supplémentaire en comparaison avec les IgG, ce qui leur confère une masse plus importante (environ 180 kDa contre 150 kDa pour les IgG).

D'autre part, les IgG présentent une zone charnière bien plus grande qui les rend plus flexibles par rapport aux IgY (Müller *et al.*, 2015).

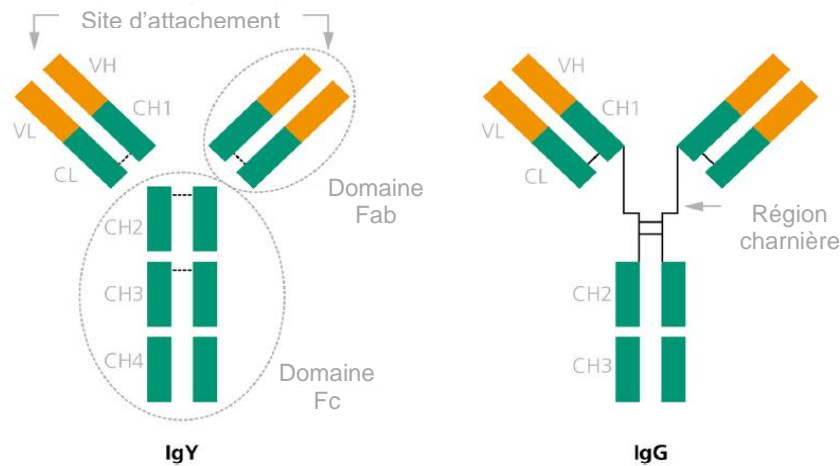


Figure 20 : Structures de l'immunoglobuline Y (IgY) de poule et de l'immunoglobuline G (IgG) de mammifères (Müller *et al.*, 2015).

Des IgY ont été retrouvées chez d'autres oiseaux, chez les amphibiens, les reptiles et certains poissons.

4.2 - Transfert des IgY au cours de l'incubation

Le transport sélectif des IgY du jaune vers la circulation de l'embryon à travers le sac vitellin s'initie lentement à ED7 ($< 100 \mu\text{g}/\text{jour}$) (Kowalczyk *et al.*, 1985) et fait intervenir des récepteurs du sac vitellin dont la liaison aux IgY est dépendante du pH (West *et al.*, 2004). IgY est alors détectée dans d'autres compartiments tels que le blanc, les sacs amniotique et allantoïque (Kramer et Cho, 1970; Rose *et al.*, 1974; Benčina *et al.*, 2005). Le transport s'accélère trois jours avant l'éclosion ($> 600 \mu\text{g}/\text{jour}$), pour renforcer les défenses du futur poussin au moment de l'éclosion, mais également les semaines qui suivent l'éclosion, en attendant la mise en fonction des lymphocytes B et la synthèse d'anticorps par l'embryon (Fellah *et al.*, 2008). Sur l'ensemble des IgY du jaune, seulement 10% seront absorbées par l'embryon. Ce processus coïncide avec la résorption du sac vitellin dans l'intestin de l'embryon (Romanoff, 1960; Noble et Cocchi, 1990). Les IgY résiduelles du sac vitellin pourraient assurer une protection locale de l'intestin (Engberg *et al.*, 1992; Beal *et al.*, 2006).

4.3 - Assimilation des composés du jaune

Les lipides et les protéines du jaune sont digérés et absorbés par le sac vitellin pour les besoins de l'embryon (voir section A2.1), ce qui modifie la composition du jaune, tout comme la synthèse de nouvelles protéines par le sac vitellin (AFP, APOB, APOV1, etc.) (McIndoe, 1960; Yadgary *et al.*, 2014; Réhault-Godbert *et al.*, 2014), et le transfert de composés depuis le blanc (voir section B2.1). L'impact exact des protéases du sac vitellin sur les protéines antibactériennes (LYZ, TF) et les Igs n'est pas encore connu, mais certains travaux suggèrent que les Igs pourraient également servir de source d'acides aminés pour l'embryon (Kowalczyk *et al.*, 1985). Le pH du jaune varie de 6 unités pH à ED0 jusqu'à 7,5 à ED14, ce qui peut modifier les activités des protéines antibactériennes et des enzymes protéolytiques du jaune, comme la cathepsine D (Retzek *et al.*, 1992).

5 - Conclusion

Chez les oiseaux, il existe deux grands types de défense : 1) les mécanismes non-spécifiques, qualifiés de naturels ou innés, qui vont agir sur les pathogènes de façon non ciblée (barrières physicochimiques, protéines antibactériennes, etc.) ; et 2) les mécanismes dits spécifiques ou adaptatifs, qui vont cibler des pathogènes précis (anticorps, lymphocytes).

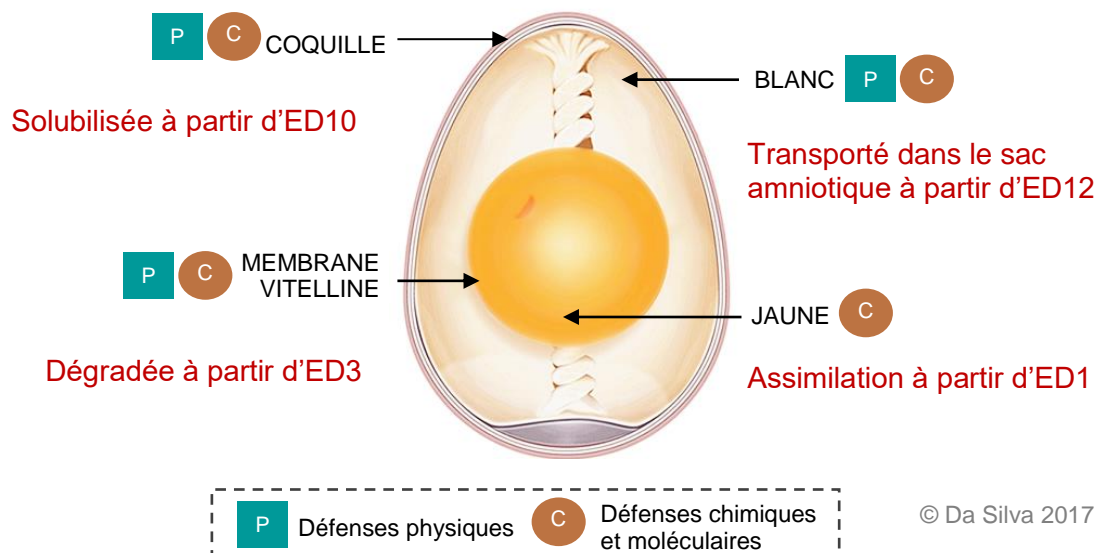


Figure 21 : Dégradation des défenses naturelles primaires de l'œuf de poule fertilisé au cours de l'incubation.

Le système immunitaire adaptatif de l'embryon n'étant actif qu'après l'éclosion, il ne peut compter que sur les défenses innées de l'œuf pour faire face aux pathogènes. Cependant,

l'ensemble des défenses innées présentes initialement, disparaissent progressivement au cours de l'incubation (**Figure 21**).

Par conséquent, pour empêcher la pénétration et le développement de bactéries dans l'œuf au cours du développement embryonnaire, de nouveaux systèmes de défense prennent le relais.

C - Structures extra-embryonnaires et défenses de l'œuf au cours du développement

Les mécanismes de défense adaptatifs de l'embryon deviennent fonctionnels seulement au cours des premières semaines suivant l'éclosion (Fellah *et al.*, 2008). En effet, lors du développement embryonnaire, les organes primaires (bourse de Fabricius, thymus) et secondaires (rate, intestin, etc.) du système immunitaire se forment, mais aucun anticorps n'est sécrété. Les lymphocytes matures capables de sécréter des Igs ne sont détectés chez le poussin que six jours après l'éclosion (Kowalczyk *et al.*, 1985). Par conséquent, avant l'éclosion, les IgY, A et M présentes dans l'œuf proviennent uniquement de la mère : les IgY du jaune servent à défendre l'embryon pendant et après l'éclosion, à l'instar des Igs du colostrum et du lait maternel chez les espèces vivipares ; les IgA et M contenues dans le blanc sont absorbées par l'embryon au cours de l'incubation, et mises en contact avec la muqueuse intestinale.

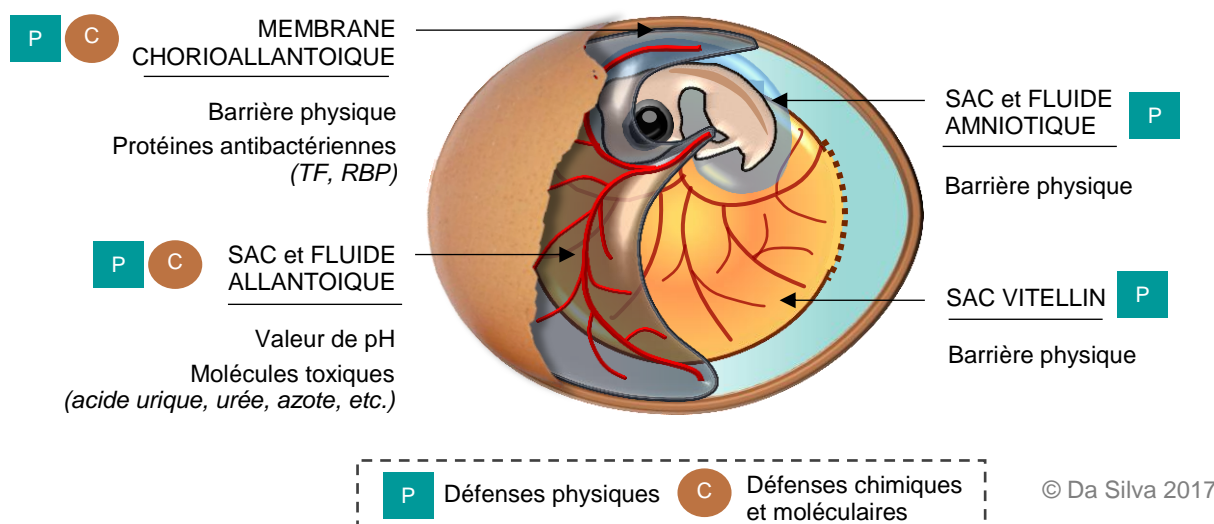


Figure 22 : Systèmes de défense innée des structures extra-embryonnaires mis en place dans l'œuf de poule au cours de l'incubation

En parallèle, de nouvelles structures de défense de l'embryon se mettent en place rapidement au cours de l'incubation. L'épithélium de l'embryon constitue une première barrière physique pour les pathogènes, alors que les cellules immunitaires telles que les

macrophages entrent en action à ED12 et ED16 dans le foie et les reins (Qureshi *et al.*, 2000). Ces cellules immunitaires sont également retrouvées au niveau des membranes extra-embryonnaires, et notamment à la surface de la membrane chorioallantoïque (Valdes *et al.*, 2002).

Le rôle exact de ces structures extra-embryonnaires dans la défense de l'embryon n'a jamais été étudié. Leur position stratégique autour de l'embryon et leur rôle dans l'assimilation des composés de la coquille, du jaune et du blanc, en font cependant des compartiments de choix pour la relocalisation des défenses moléculaires initialement présentes dans l'œuf, et pour la mise en place de nouveaux systèmes de défense (**Figure 22**).

1 - Les membranes extra-embryonnaires

L'apparition des membranes extra-embryonnaires au début de l'incubation ajoute un niveau supplémentaire dans la défense de l'œuf et de l'embryon : la membrane chorioallantoïque enveloppe la totalité des structures internes de l'œuf, la membrane amniotique isole l'embryon des autres compartiments, et le sac vitellin entoure le jaune d'œuf.

1.1 - La membrane chorioallantoïque, la deuxième barrière après la coquille

La membrane chorioallantoïque recouvre l'ensemble des structures de l'œuf à partir d'ED11-12 (Gabrielli et Accili, 2010). Son épithélium étant en contact direct avec les membranes coquillières, il s'agit de la deuxième barrière physique observée dans l'œuf après la coquille au cours du développement (**Figure 22**). Cette position stratégique permet aux cellules de l'immunité innée d'agir localement, en cas de pénétration bactérienne à travers la coquille. En effet, une infection bactérienne simulée par un dépôt de lipopolysaccharide (composant essentiel des membranes des bactéries gram négatives) directement sur la membrane chorioallantoïque, induit une réponse inflammatoire importante sur la zone du dépôt (Valdes *et al.*, 2002). Un certain nombre d'hétérophiles et de monocytes sont ainsi recrutés sur le site de l'infection. En outre, la membrane chorioallantoïque fut le premier tissu à révéler la présence et l'action de l'interféron gamma, suite à une infection virale (Isaacs et Lindenmann, 1988).

L'analyse du protéome de la membrane par spectrométrie de masse à ED19 a mené, entre autres, à l'identification de deux protéines bactériostatiques, TF et RBP (protéine liant la

riboflavine) (Cordeiro et Hincke, 2016), potentiellement exprimées par la membrane ou transitant *via* la circulation sanguine. Du fait de leur proximité, il est probable que d'autres protéines du blanc ou de la coquille soient retrouvées dans la membrane, d'autant plus qu'il a été démontré chez la caille que la membrane chorioallantoïque pouvait endocyter de grandes quantités de blanc d'œuf (Yoshizaki *et al.*, 2002). Des analyses plus poussées de protéomique et de transcriptomique permettraient de mieux comprendre les mécanismes de défense mis en place au sein de cette membrane pour protéger l'œuf des pathogènes.

1.2 - Le sac vitellin remplace la membrane vitelline

Au cours de l'incubation, la structure cellulaire du sac vitellin remplace progressivement la membrane vitelline (Yoshizaki *et al.*, 2000), formant ainsi une nouvelle barrière. Globalement, le sac vitellin ne semble pas impliqué dans la défense active de l'œuf. L'analyse de son transcriptome a révélé qu'il synthétisait de nombreuses protéines du métabolisme lipidique (voir section A2.1), mais aucun effecteur antibactérien (Yadgary *et al.*, 2014). Cependant, le sac vitellin sert de support pour les cellules du système immunitaire inné, dont les monocytes et les macrophages, qui sont retrouvés au niveau du sac à ED10 et 12 respectivement (Marga Janse et Jeurissen, 1991).

1.3 - Le sac amniotique entoure l'embryon

La membrane amniotique représente le dernier rempart physique avant l'embryon. Elle possède peu de cellules au départ, mais elle se complexifie avec l'apparition de cellules épithéliales à sa surface, ainsi que d'une matrice fibreuse qui semble renforcer la structure (Romanoff, 1960). Cependant, à partir d'ED14, la membrane ne croît plus, et donc pour supporter la croissance de l'embryon, elle est étirée, ce qui peut la fragiliser. Même si la structure des cellules de l'amnios a été longuement détaillée (Romanoff, 1960), peu d'informations apparaissent dans la littérature sur sa composition et ses propriétés.

2 - Les fluides extra-embryonnaires amniotique et allantoïque

Lors de la première moitié de l'incubation, l'eau contenue dans le blanc est redirigée vers les compartiments extra-embryonnaires (**Figure 23**). Elle transite par le jaune avant d'être transférée vers les sacs amniotique et allantoïque pour former l'AmF et l'AIF (voir sections A2.2 et A2.3). A l'inverse, lors de la seconde moitié de l'incubation, ces fluides vont être

réabsorbés directement ou indirectement par l'embryon, pour supporter l'accélération de son métabolisme lors de la phase de croissance (Baggott, 2001; Baggott *et al.*, 2002; Latter et Baggott, 2002).

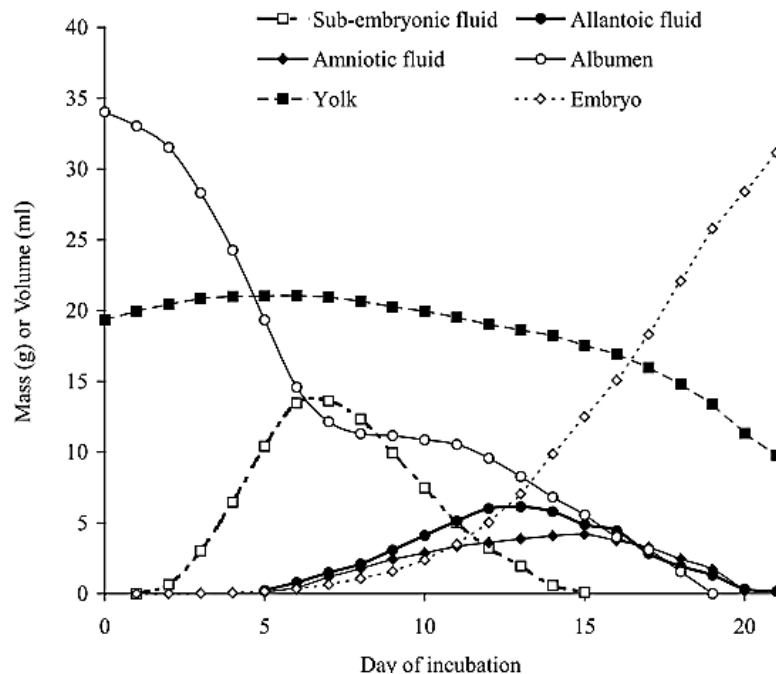


Figure 23 : Evolution des masses de l'embryon, du blanc et du jaune d'œuf, ainsi que des volumes des fluides sub-embryonnaire, amniotique et allantoïque au cours de l'évolution (Baggott, 2001, données de Romanoff, 1967).

Ces mouvements de fluide entre compartiments incluent des transferts de protéines du jaune et du blanc d'œuf, et donc potentiellement une redistribution des agents antibactériens initialement présents dans l'œuf.

2.1 - Le potentiel antibactérien du fluide amniotique (AmF)

La composition exacte de l'AmF n'est pas connue chez l'oiseau. Cependant, chez l'humain, l'analyse de son protéome a mené à l'identification de plus de 900 protéines (Cho *et al.*, 2007), dont 25% sont prédites pour être impliquées dans la réponse immunitaire (Michaels *et al.*, 2007). La question se pose donc concernant les propriétés et les fonctions des protéines de l'AmF chez la poule, d'autant plus que le transfert du blanc dans le sac amniotique à ED12 doit induire des changements importants précisément dans les propriétés antibactériennes du fluide.

2.2 - Le potentiel protéolytique du fluide allantoïque (AlF)

L'AlF est le résultat du métabolisme de l'embryon et, à travers lui, du métabolisme du sac vitellin qui constitue l'organe digestif principal. La composition du fluide riche en acide urique (~2 g/L), urée (~0,4 g/L), ammonium (~0,1 g/L) et azote (~1,2 g/L) peut représenter un milieu difficile pour la survie et la croissance des bactéries (valeurs obtenues à ED12) (Romanoff, 1960). En outre, le volume d'AlF diminuant à partir d'ED13, ces composés sont fortement concentrés et finissent par précipiter pour former des cristaux d'urates (Bolin et Burggren, 2013). A partir de la 2^{ème} moitié de l'incubation, la sécrétion importante de protons dans le compartiment, suite à l'accélération du métabolisme embryonnaire, induit une chute du pH de 2 unités environ (pH 7 à ED8, pH 5,5 à ED18) (Boutilier *et al.*, 1977). Ce phénomène peut induire des changements fonctionnels au niveau protéique.

La composition globale de l'AlF n'est pas connue, mais certains travaux ont tout de même révélé la présence de protéases actives au sein de ce fluide (Kandeil *et al.*, 2014), dont la thrombine (**F2**) ou le facteur de coagulation 10 (**F10**) qui, dans l'AlF, ont démontré leur capacité à cliver et ainsi activer certains virus dont celui de la grippe aviaire (Gotoh *et al.*, 1990; Ogasawara *et al.*, 1992; Wanitchang *et al.*, 2010).

CONCLUSION

Les premiers éléments de littérature suggèrent que les membranes et les fluides extra-embryonnaires pourraient participer à la défense de l'œuf au cours de l'incubation. Leurs localisations et leurs interactions étroites avec l'embryon et l'ensemble des structures primaires de l'œuf (réseaux sanguins, diffusion passive, transport actif), favorisent les échanges de composés d'un compartiment à l'autre, et leur assimilation par l'embryon. Ces transferts d'eau et de protéines entraînent probablement une relocalisation des protéines et des peptides antibactériens initialement localisés dans les structures élémentaires de l'œuf, dans l'AmF et l'AlF.

L'évolution du modèle de reproduction ovipare au modèle vivipare a entraîné des changements importants au sein des structures extra-embryonnaires, particulièrement avec l'apparition du placenta. Chez l'humain, par exemple, le sac allantoïque ne forme pas une structure indépendante comme chez la poule, mais il forme une partie du cordon ombilical. Les urines de l'embryon sont donc sécrétées directement dans le sac amniotique, à l'inverse

de l'embryon de poule qui va les sécréter dans le sac allantoïque, formant ainsi l'AIF. La présence importante de protéines et de peptides en lien avec la réponse immunitaire et la défense dans l'AmF humain, nous laisse supposer que l'AmF, et potentiellement l'AIF de l'œuf de poule, pourraient également contenir des agents antibactériens et contribuer ainsi à la protection de l'embryon au cours de son développement.