

Institut Universitaire de Technologie de TOURS  
Département Génie Biologique

Licence professionnelle Santé, Mention « Biologie Analytique et  
Expérimentale »

---

*Les fonctions du liquide amniotique de l'œuf de poule (Gallus gallus)  
dans la protection antibactérienne de l'embryon :*

*Caractérisation et identification des protéines liant l'héparine*

---



UR83 Recherches Avicoles, Centre INRA Val de Loire, 37380 Nouzilly, France.

Equipe Développement de l'Œuf, Valorisation, Évolution (DOVE)

Stage réalisé du 30 Janvier 2017 au 19 Mai 2017

Maître de Stage : Dr. REHAULT-GODBERT Sophie (HDR)

Encadrante : DA SILVA Mylène (Doctorante)

## *Remerciements*

---

Le stage que j'ai effectué durant 4 mois au sein de l'équipe « Développement de l'Œuf, Valorisation et Evolution » aura été une formidable expérience.

Je remercie tout d'abord Sophie Réhault-Godbert, ma responsable de stage, et Mylène Da Silva, mon encadrante, pour avoir retenu ma candidature.

Je les remercie également pour m'avoir si bien encadrée pendant ces 4 mois de stage, pour les conseils avisés, pour leur soutien, leur patience et pour m'avoir accordé toute leur confiance.

Je souhaite remercier Mylène Da Silva, Nathalie Le Roy, Lilian Stapano et Maeva Halgrain pour m'avoir si bien intégrée dans leur équipe et dans leur espace de travail, ainsi que pour les conseils qu'ils m'ont apportés, nos nombreuses discussions et surtout leur bonne humeur quotidienne.

Je remercie tout particulièrement Nicolas Guyot pour avoir mis au point la technique des tests antibactériens « in gel », et Magali Chesse qui m'a spécifiquement formée et aidée pour les essais.

Je voudrais remercier également Aurélien Brionne, Maryse Mills, Jean Claude Poirier, Jacky Ezagal et Nelly Bernardet pour m'avoir permis d'appréhender de nouvelles techniques de biochimie et de m'avoir fait part de leurs expériences.

Je remercie Yves Nys, Joël Gautron, Marie-Louise Zani et Thierry Moreau, pour m'avoir bien accueillie dans leur équipe et permis de m'y épanouir.

Je remercie Valérie Labas et Lucie Combes Soia de la plateforme PAIB<sup>2</sup> de la PRC pour la réalisation des analyses de spectrométrie de masse et Angelina Trotereau pour m'avoir accueillie dans son laboratoire pour la réalisation des tests antibactériens.

Je termine en m'adressant à l'ensemble de l'équipe et à toutes les personnes que j'ai côtoyées pendant ces 4 mois, pour les remercier de m'avoir fait partager leur expérience et de m'avoir si bien intégrée, ce qui m'a permis de gagner en autonomie et de vivre une superbe expérience humaine.

# Table des matières

---

I- Introduction .....	- 1 -
II- Matériel et méthodes .....	- 4 -
II.1- Prélèvement du matériel biologique et choix des échantillons.....	- 4 -
II.2- Purification des protéines par chromatographie d'affinité .....	- 4 -
II.3- Electrophorèse SDS-PAGE .....	- 5 -
II.4- Tests d'activités antibactériennes par diffusion radiale.....	- 6 -
II.5-Analyses par spectrométrie de masse .....	- 7 -
III- Résultats .....	- 8 -
III.1-Purification des HBP du LA par chromatographie d'affinité à l'héparine-sépharose-	8 -
III.2-Détermination du potentiel antibactérien du LA par diffusion en gélose .....	- 10 -
III.3- Identification de potentiels candidats antibactériens.....	- 13 -
IV- Discussion.....	- 16 -
V- Conclusion .....	- 19 -
Références.....	-20-
Annexes 1 et 2	

## Liste d'abréviations

---

A2ML1 : *Alpha-2-macroglobulin-like*

ACTG1 : *Actin, cytoplasmic 2*

APS: *Ammonium persulfate*

ASTL : *Astacin-like metalloendopeptidase*

ATP1A1 : *Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 precursor*

ATP5A1Z : *ATP synthase*

AvBD11 : *Avian beta-defensin 11*

AVD : *Avidin*

B : Fraction brute déposée sur la colonne au cours de la purification des HBP

BMSP (LOC101750704) : *Beta-microseminoprotein-like*

BPIFB2 : *Protein TENP*

CFU: Unité formant des colonies

CLU : *Clusterin*

F.P : Fractions fixées poolées et concentrées au cours de la purification des HBP

F: Fraction fixée sur la colonne au cours de la purification des HBP

G : Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie

GLG1 : *Golgi glycoprotein 1*

H2AFJ : *Histone H2A.J*

HBP : Protéines ou peptides liant l'héparine

J12 : 12<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire

*L.m.*: *Listeria monocytogenes*

LA : Liquide amniotique

LOC100859777 : *Deleted in malignant brain tumors 1 protein-like*

LYZ : *Lysozyme C*

MDK : *Midkine*

MUC5B : *Ovomucin, subunit alpha (Mucin 5B)*

MUC6 : *Ovomucin, subunit beta (Mucin 6)*

NCBI : *National Center for Biotechnology Information*

NF : Fraction non fixée sur la colonne au cours de la purification des HBP

OC-17 : *Ovocleidin-17*

OVAL : *Ovalbumin*

OVALX : *Ovalbumin-related protein X*

OVST : *Ovostatin*

PPIB : *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B*

PSM : Poste de sécurité microbiologique

S. E.: *Salmonella enterica* Enteritidis

SDS-PAGE : Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium

SPINK5 : *Ovoinhibitor*

Temed : *Tétra méthyl éthylène diamine*

TF : *Ovotransferrin*

TIMP2 : *Metalloproteinase inhibitor 2*

TIMP3 : *Metalloproteinase inhibitor 3*

TNFRSF6B : *TNF receptor superfamily member 6b*

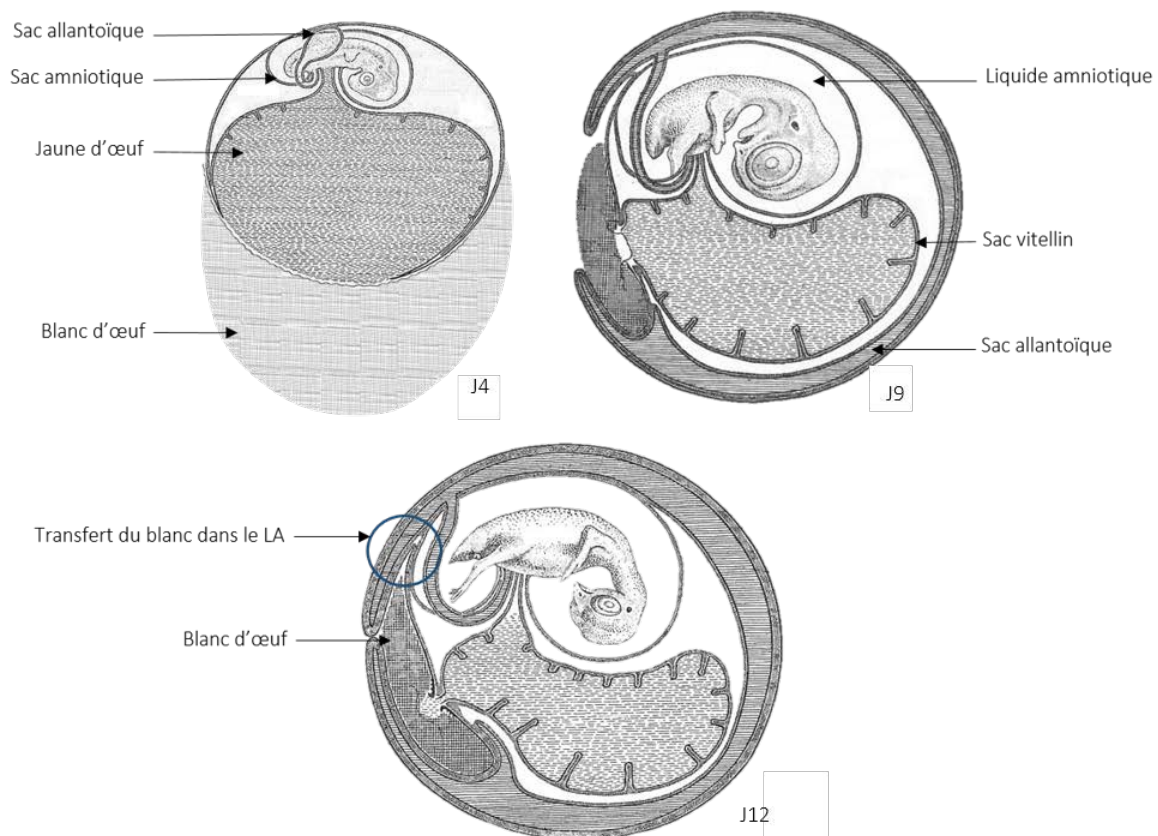
TSB : *Trypticase Soy Broth*

VMOI : *Vitelline membrane outer layer protein 1*

## I- Introduction

Chez les ovipares, l'œuf permet un développement autonome de l'embryon. Il est constitué de différentes structures comme le blanc, le jaune ou la coquille qui fournissent à l'embryon les composants nécessaires à son développement pendant 21 jours. En effet, après oviposition, il n'y a plus de possibilités d'échanges avec la mère pour satisfaire les besoins de l'embryon et son système immunitaire ne mature qu'après éclosion.

Par conséquent, lors de l'incubation, des structures supplémentaires dites extra-embryonnaires (les sacs vitellin, amniotique et allantoïque) assurent des fonctions vitales pour l'embryon, telles que la respiration ou la digestion, en attendant la mise en fonction de ses propres organes (Figure 1).



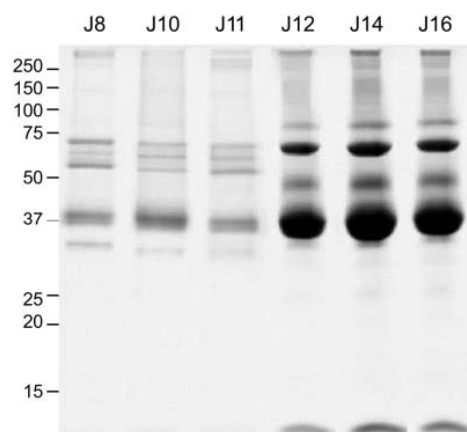
**Figure 1** : Formation et évolution des structures de l'œuf pendant le développement embryonnaire (J4, 9 et 12 : 4<sup>ème</sup>, 9<sup>ème</sup>, et 12<sup>ème</sup> jour)(modifiée à partir de Howard L. Hamilton 1952) (1)

Chez les oiseaux, la protection de l'embryon est assurée par des barrières physiques, telles que la coquille, les membranes, la viscosité du blanc d'œuf, mais également par des défenses biochimiques telles que les protéines et peptides antimicrobiens, le pH alcalin du blanc, ou encore sa force ionique. Ces défenses font partie intégrante du système immunitaire inné de

l'œuf qui est fonctionnel dès les 1<sup>ers</sup> stades du développement embryonnaire (2). Ce système permet également le recrutement des cellules phagocytaires qui apparaissent lors de la mise en place du système sanguin à la surface du sac vitellin. À l'inverse, le système immunitaire adaptatif, mettant en jeu les lymphocytes B et T, se met progressivement en place lors de l'incubation et ne devient actif que quelques semaines après éclosion (3).

Cependant, l'évolution globale des défenses de l'œuf au cours du développement ainsi que l'implication des structures extra-embryonnaires dans ce processus restent encore peu connues.

Parmi les structures extra-embryonnaires, le sac amniotique, composé d'une membrane et du liquide amniotique (LA), contribue à la protection de l'embryon contre les chocs mécaniques, tout en empêchant sa déshydratation et son adhésion aux autres structures de l'œuf (4). Chez l'homme, le LA protège physiquement et biochimiquement l'embryon. Il est constitué principalement d'eau, qui permet les mouvements et la croissance du fœtus, mais il contient également des protéines et des peptides qui participent activement à l'immunité innée de l'embryon (2-4), comme le lysozyme, mais aussi des peptides antimicrobiens comme les bêta-défensines. Cependant, chez l'oiseau, les fonctions des constituants du LA, les interactions possibles entre protéines, ou encore leurs contributions dans le développement de l'embryon sont, à l'heure actuelle, peu connues. Par ailleurs, la composition du LA subit d'importants changements à partir du 12<sup>ème</sup> jour du développement (J12), avec un transfert massif des protéines en provenance du blanc d'œuf dans le sac amniotique (Figure 2), ce qui suggère que les fonctions du LA pourraient être modifiées au cours du développement.



**Figure 2** : Analyse SDS-PAGE du liquide amniotique de poule du 8<sup>ème</sup> au 16<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire (J8 à J16). Le gel a été réalisé en conditions non réduites et non bouillies (10 µg de protéines/puits) (7). Les masses moléculaires du marqueur de taille sont indiquées à gauche des gels et sont exprimées en kDa.

Dans ce contexte, l'identification et la caractérisation des protéines du LA d'oiseau à différents stades du développement embryonnaire fait l'objet du projet de thèse de Mylène Da Silva (2014-2017).

Parmi les 104 protéines actuellement identifiées dans le LA d'œuf de poule à J11 (résultats non publiés), certaines contiennent des domaines de liaisons à un glycosaminoglycane, l'héparine. Chez la plupart des espèces animales, les protéines ou peptides liant l'héparine (HBP : *heparin binding protein*) sont impliqués dans de multiples fonctions cellulaires telles que la défense antimicrobienne (bêta-défensines), l'inflammation (cytokines), la prolifération cellulaire (facteurs de croissance), la migration cellulaire (protéines de matrice extracellulaire), ou encore la coagulation. Ainsi, de nombreuses études ont déjà confirmé les activités antimicrobiennes des HBP du blanc et de la membrane vitelline de l'œuf comme *l'ovalbumin-related protein X* (OVAX) (8), *l'avian beta-defensin 11* (AvBD11) (9), ou encore la *vitellin-membrane-outer layer 1* (VMO1) (10).

L'objectif de ce projet était d'évaluer l'implication des HBP du LA de l'œuf d'oiseau dans la protection de l'embryon. Pour cela, nous avons purifié et identifié les HBP du LA à J11 et J16, soit avant et après transfert des protéines du blanc dans le sac amniotique, afin de déterminer leur potentiel antibactérien, et d'avoir un suivi de l'évolution de ce potentiel au cours de l'incubation.

Nous avons tout d'abord purifié les HBP du LA par chromatographie d'affinité à l'héparine, et exploré l'évolution de leurs profils protéiques par SDS-PAGE. En parallèle, nous avons étudié leurs activités antibactériennes contre certaines bactéries responsables de toxi-infections alimentaires telles que *Listeria monocytogenes* et *Salmonella enterica* Enteritidis, en adaptant une technique d'analyse de ces activités directement sur gel SDS-PAGE en conditions non-dénaturantes, d'après Bhunia *et al.* (11).

Les bandes présentant des activités antibactériennes ont été découpées puis analysées par spectrométrie de masse afin d'identifier les HBP responsables des activités antibactériennes observées.



## II- Matériel et méthodes

### II.1- Prélèvement du matériel biologique et choix des échantillons

Tous les prélèvements ont été réalisés par l'équipe DOVE avant le début du stage dans le cadre de la thèse de Mylène Da Silva.

Les œufs fertiles ont été obtenus à partir de poules pondeuses Isa Brown âgées de 62 semaines (UE1295 Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours, INRA, 37380 Nouzilly, France). Les œufs ont été stockés trois jours à 16°C à 85% d'humidité pour synchroniser le développement embryonnaire, avant d'être incubés dans des conditions « standard » à 37,8°C à 45% d'humidité. Trente-cinq œufs de poids et tailles homogènes contenant des embryons viables ont été sélectionnés. Les œufs avec une coquille microfêlée (Acoustic Egg tester, KU Leuven, Belgique) ont été éliminés de l'analyse, tout comme les embryons mal synchronisés au niveau du développement, selon les tables d'Hamilton et Hamburger (12).

Le blanc d'œuf à J11 a été prélevé à travers la coquille à l'aide d'une seringue et d'une aiguille. Le contenu de l'œuf a ensuite été versé dans une boîte de Petri et le LA a été prélevé avec une seringue à travers la membrane amniotique. Le blanc à J16 a été collecté directement dans la boîte de Pétri avec des pinces en raison de sa viscosité élevée. Tous les prélèvements ont été réalisés en conditions stériles. Les contaminants des fluides (débris cellulaires) ont été éliminés par centrifugation (3000 g, 10 min, 4°C) (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France).

Des échantillons de fluides homogènes ont été sélectionnés en fonction de leur pH (Microelectrode pH InLab 423, Fisher Scientific, Illkirch, France), de leur osmolalité (Fiske Mark 3 Osmometer, Advanced Instruments, Niederbronn Les Bains, France), de leur profil SDS-PAGE et du sexe de l'embryon (Annexe 1).

### II.2- Purification des protéines par chromatographie d'affinité

Les chromatographies d'affinité à l'héparine ont été réalisées à l'aide de billes héparine-sépharose (Heparin sepharose 6 Flast Flow, GE Healthcare, Suède), en suivant les instructions du fournisseur. Les billes ont été déposées dans une colonne de polypropylène (Polypropylene columns 1 mL et 5 mL, Qiagen GmbH, Courtaboeuf, France) lavées avec de l'eau déminéralisée (10 volumes) et équilibrées dans du tampon de liaison (10 volumes de Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4).

Après introduction de l'échantillon (4 mg/mL), un second lavage (Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) a été réalisé afin d'éliminer les protéines non fixées (NF), jusqu'à l'obtention d'une absorbance proche de 0 à 220 nm et une absorbance de 0 à 280 nm (Nanodrop, ND-100 Spectro, Wilmington, USA). Les blancs d'œufs, quant à eux, ont été incubés avec les billes d'héparine-sépharose sur la nuit à 4°C, en raison de sa forte viscosité, pour permettre une meilleure interaction entre les billes et les HBP, puis les billes ont été lavées par centrifugation avant d'être déposées dans une colonne de polypropylène munie d'un filtre (Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne) pour l'élution. Les HBP ont été éluées avec du tampon d'élution (Tris-HCl, 2 M NaCl, pH 7,4). Les fractions fixées (F) ont été récupérées dans des microtubes par pas de 500 µL, jusqu'à l'obtention d'une absorbance proche de 0 à 220 et 280 nm. Les fractions F peu concentrées ont été poolées (F.P), puis lavées et concentrées grâce à un système Amicon (Amicon Ultra - 4/0,5 – Centrifugal filters -Ultracel - 3K - UFC900324, Millipore, Tuilagreen, Irlande) par centrifugation à 4000 g. Les fractions protéiques fortement concentrées ont été diluées avec de l'eau déminéralisée. Les fractions obtenues ont été visualisées par gel SDS-PAGE (Cf. II.3) (Annexe 2).

### II.3- Electrophorèse SDS-PAGE

Un maximum de 10 ou 20 µg de protéines a été déposé par puits pour chaque échantillon, avec du tampon de charge 1X (Tris HCl 0,25 mM, pH 6,8, Bleu de Bromophénol 0,05 %, Glycérol 50%, SDS 5%). L'électrophorèse a été réalisée en condition non réduite et non bouillie avec un gel SDS-PAGE (Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, acrylamide 30%, SDS 10%, APS 10% et Temed) 12,5% (purification, Cf. II.2) ou 15% (tests antibactériens et spectrométrie de masse, Cf. II.4 et II.5). La migration a été effectuée à 80 V, pour la concentration des protéines, puis à 140 V pour la séparation des protéines, dans un tampon de migration 1X (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0,1% SDS, 10X, pH 8,3, Biorad, Marnes-la-Coquette, France).

Pour l'identification des protéines par spectrométrie de masse, les protéines ont été fixées dans une solution composée d'acide acétique 10% et d'éthanol 40 % pendant 15 min, puis elles ont été colorées au bleu de Coomassie (QC Colloidal coomassie stain, Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Les gels ont ensuite été scannés (Odyssey Sciencetec, Courtaboeuf, France.).

## II.4- Tests d'activités antibactériennes par diffusion radiale

Les tests antibactériens ont été réalisés contre *Listeria monocytogenes* (*L.m.* ; EGD-E : CIRMBP-711) et *Salmonella enterica* Enteritidis (*S.E.* ; ATCC 13076) au sein de l'unité de recherche Infectiologie et Santé Publique (ISP) sur le site de l'INRA Centre Val de Loire, Nouzilly, après quelques ajustements à partir de la méthode publiée par Bhunia et *al.* en 1987 (11).

Les souches bactériennes ont été mises en préculture dans du milieu Brain Heart Infusion pour *L.m.* et dans du milieu Trypticase Soy Broth (TSB) pour *S.E.* sur la nuit. Elles ont ensuite été remises en culture (densité optique mesurée à 0,02), pour atteindre la phase semi-exponentielle au bout de 4h pour *L.m.*, et 3h pour *S.E.* Les cultures bactériennes ont été centrifugées à 2000 g pendant 10 min à 4°C et les culots ont été poolés et lavés avec 25 mL de tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,4. La culture a ensuite été centrifugée à 2000 g pendant 10 min à 4°C et le culot bactérien a été repris dans 10 mL du tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,4. Après avoir mesuré la densité optique, un volume suffisant de culture a été ajouté à 25 mL d'une gélose pauvre en nutriments (1% d'agarose type I low endosmosis (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), tampon phosphate de sodium à 10 mM pH 7,4, 0,03% de milieu TSB en poudre), pour obtenir une concentration bactérienne finale de  $7,5 \cdot 10^6$  cfu (unité formant des colonies).

En parallèle, les protéines des échantillons ont été séparées par gels SDS-PAGE 15% (Cf. II.3), en conditions non réduites et non bouillies, sous PSM, en maintenant les cuves à 4°C pour éviter toute dénaturation des protéines. Après migration, les gels ont été coupés en 2 : une moitié est destinée aux analyses par spectrométrie de masse pour les identifications de protéines (Cf. II.3/5), et la 2<sup>ème</sup> moitié est destinée aux tests antibactériens (Cf. II.4). Cette dernière moitié a été lavée 4 fois pendant 15 min avec une solution de triton X100 à 2,5% et 4 fois pendant 15 min à l'eau milliQ autoclavée, à 4°C, afin d'éliminer le SDS pour permettre aux protéines de retrouver une structure tridimensionnelle (renaturation).

La gélose pauvre en nutriments contenant les bactéries a été coulée sur les gels SDS-PAGE dans une boîte de Pétri de 12 cm sur 12 cm et le tout a été incubé pendant 3h à 37°C afin de permettre la diffusion des protéines dans la gélose. Une gélose riche en nutriments (1% d'agarose type I low endosmosis (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), tampon sodium phosphate à 10 mM pH 7,4, 6% de TSB en poudre) a été coulée sur la gélose pauvre en

nutriments, pour permettre la croissance des bactéries. Les boîtes ont été incubées pendant 18h à 37°C (Annexe 2).

La bêta-microseminoprotéine (BMSP) et l'AvBD11, purifiées dans le laboratoire à partir de la membrane vitelline et du blanc d'œuf, respectivement (Projet Initiative académique Région Centre Val de Loire, MUSE, 2014-2016) ont été utilisées comme contrôles positifs (2 µg de protéines/puits) dans cette analyse.

## II.5-Analyses par spectrométrie de masse

Après séparation par SDS-PAGE et coloration au bleu colloïdal, les bandes correspondantes aux activités antimicrobiennes du LA (J11 et J16) visibles contre *L.m.* et *S.E.* ont été découpées et ont été analysées par spectrométrie de masse sur la Plateforme d'Analyse Intégrative des Biomolécules (UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, CNRS, UMR7247, Université François Rabelais de Tours, IFCE, Nouzilly 37380, France). Les bandes ont été rincées dans de l'eau milliQ puis dans de l'acétonitrile. Les protéines ont ensuite été réduites et alkylées avec du dithiothréitol et de l'iodoacétamide puis incubées toute la nuit à 37°C dans un tampon de digestion (25 mM de bicarbonate d'ammonium, 12,5 ng/µL de trypsine) (13).

Les peptides extraits ont été séchés à l'aide du système Speedvac SPD1010. Ils ont ensuite été analysés avec un spectromètre de masse LTQ Orbitrap Velos (Thermo Savant, Thermo Fisher Scientific) couplé à un chromatographe UVLC Ultimate® 3000 (Dionex, Amsterdam, Pays-Bas) (14). Les identifications des protéines à partir des spectres expérimentaux ont été effectuées à l'aide du moteur de recherche Mascot v2.2 (Matrix Science, Londres, Royaume-Uni) *via* le logiciel ProteomeDiscoverer 1.3 (Thermo Fisher Scientific) contre la base de données NCBI (chordés : embranchement du règne animal). Les résultats d'identification ont été soumis au logiciel Scaffold 4 (v4.4, Proteome Software, Portland, USA) pour validation grâce aux algorithmes Peptide Prophet et Protein Prophet (minimum 95% de probabilité d'identification et 2 peptides uniques pour valider une protéine).

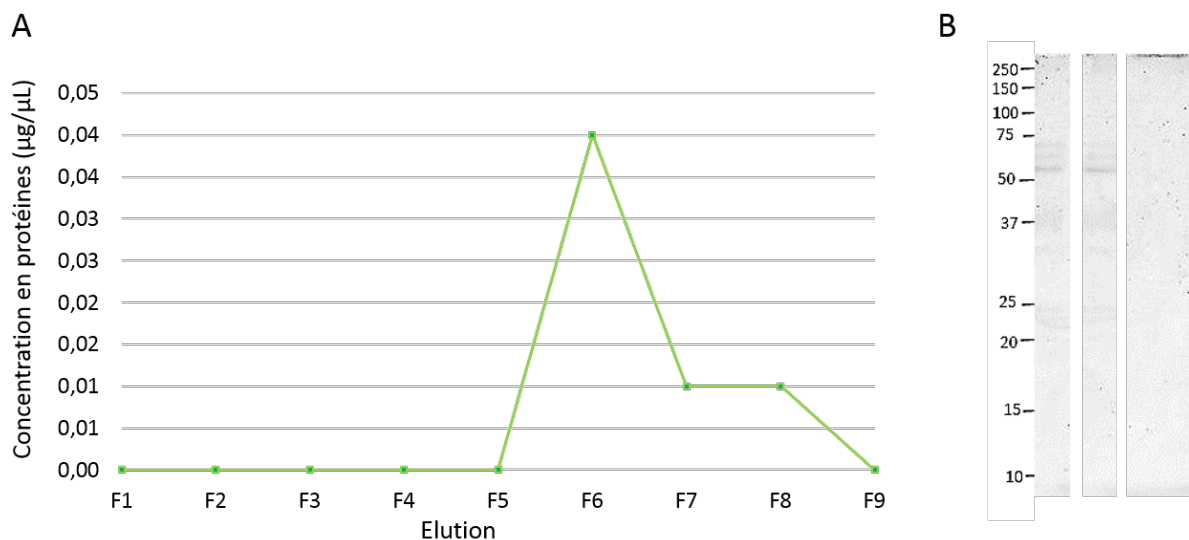
### III- Résultats

#### III.1-Purification des HBP du LA par chromatographie d'affinité à l'héparine-sépharose

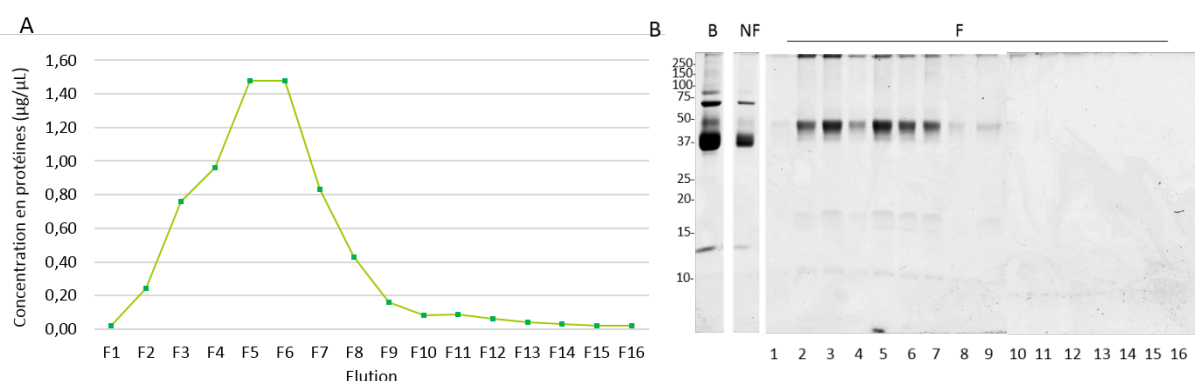
Les protéines du LA ont été fractionnées en fonction de leur affinité à l'héparine par chromatographie d'affinité (10). Les profils d'élution obtenus à partir du LA J11 et J16 sont présentés dans les figures 3A et 4A respectivement ; ils illustrent l'évolution de la concentration en protéines mesurée à 280 nm dans les différentes fractions éluées (F) par pas de 500  $\mu\text{L}$  avec un tampon à 2 M de NaCl. La concentration en HBP dans le LA J16 est nettement supérieure à celle dans le LA J11 (1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  maximum dans le LA J16 F5-6 contre 0,04  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  maximum dans le LA J16). La concentration en HBP étant très faible dans le LA J11, les mesures d'absorbance n'étaient pas optimales, et les valeurs négatives ont donc été ramenées à zéro. Les fractions issues de la purification ont été récupérées et numérotées afin d'être analysées par gel SDS-PAGE en conditions non réduites et non bouillies (Figures 3B, LA J11 et 4B, LA J16). Les fractions F du LA J11 (F1 à F9) ont été poolées et concentrées afin d'être mieux visualisées sur gel SDS-PAGE (F.P).

Toutefois, même après concentration des fractions F du LA J11 (F.P à 0,01  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  au final), le profil protéique n'est toujours pas visible sur le gel SDS-PAGE. Le profil de la fraction brute (B) du LA J11 est identique au profil de la fraction non fixée sur la colonne (NF). Ces résultats suggèrent que les protéines majeures du LA n'ont pas d'affinité pour l'héparine. Ils comportent 3 bandes entre 75 et 50 kDa, 1 bande à hauteur de 37 kDa et 1 bande entre 37 et 25 kDa.

Tout comme pour le LA au stade J11, le profil de la fraction B du LA J16 comporte des similitudes avec le profil de la fraction NF, avec des protéines majeures entre 100 et 75 kDa, à 60, 50 et 37 kDa, et entre 15 et 10 kDa. Par la suite, cette fraction sera utilisée pour les tests antibactériens. Les fractions F présentent une protéine majeure entre 50 et 37 kDa, et d'autres protéines mineures situées au-delà de 250 kDa, et entre 20 et 10 kDa. Les fractions fixées les plus concentrées ont été poolées afin de réaliser les tests antibactériens, ainsi que les identifications des HBP par spectrométrie de masse (F2 à F7 = F.P).

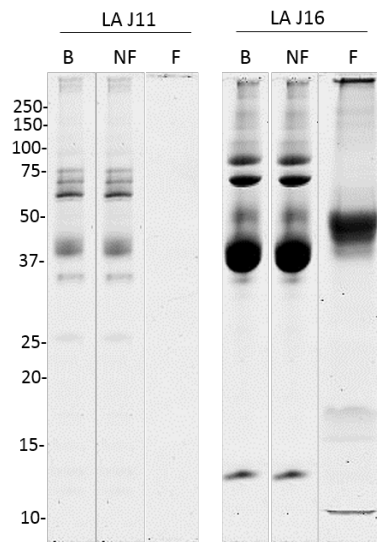


**Figure 3** : Profil d'éluion (A) selon l'absorbance à 280 nm et profil protéique B) des HBP du LA à J11 par SDS-PAGE. Les fractions ont été éluées par pas de 500 µL avec du tampon à 2 M de NaCl. Les concentrations en protéines ont été mesurées au Nanodrop à 280 nm. L'échantillon brut (B), la fraction non fixée (NF) et les fractions fixées poolées (F.P) ont été visualisées par gel SDS-PAGE (10 µg de protéines/puits maximum). Les masses moléculaires du marqueur de taille sont indiquées à gauche des gels et sont exprimées en kDa.



**Figure 4** : Profil d'éluion (A) et profil protéique (B) des HBP du LA à J16. Les fractions ont été éluées par pas de 500 µL, avec du tampon à 2 M de NaCl. Les concentrations en protéines ont été mesurées au Nanodrop à 280 nm. L'échantillon brut (B), les fractions non fixées (NF) et les fractions fixées (F) ont été visualisées par gel SDS-PAGE (10 µg de protéines/puits maximum). Les masses moléculaires du marqueur de taille sont indiquées à gauche des gels et sont exprimées en kDa.

Les différentes fractions issues de la purification des HBP du LA J11 et J16 ont été concentrées (LA J11 B et NF) puis visualisées sur le même gel afin d'être comparées (Figure 5).



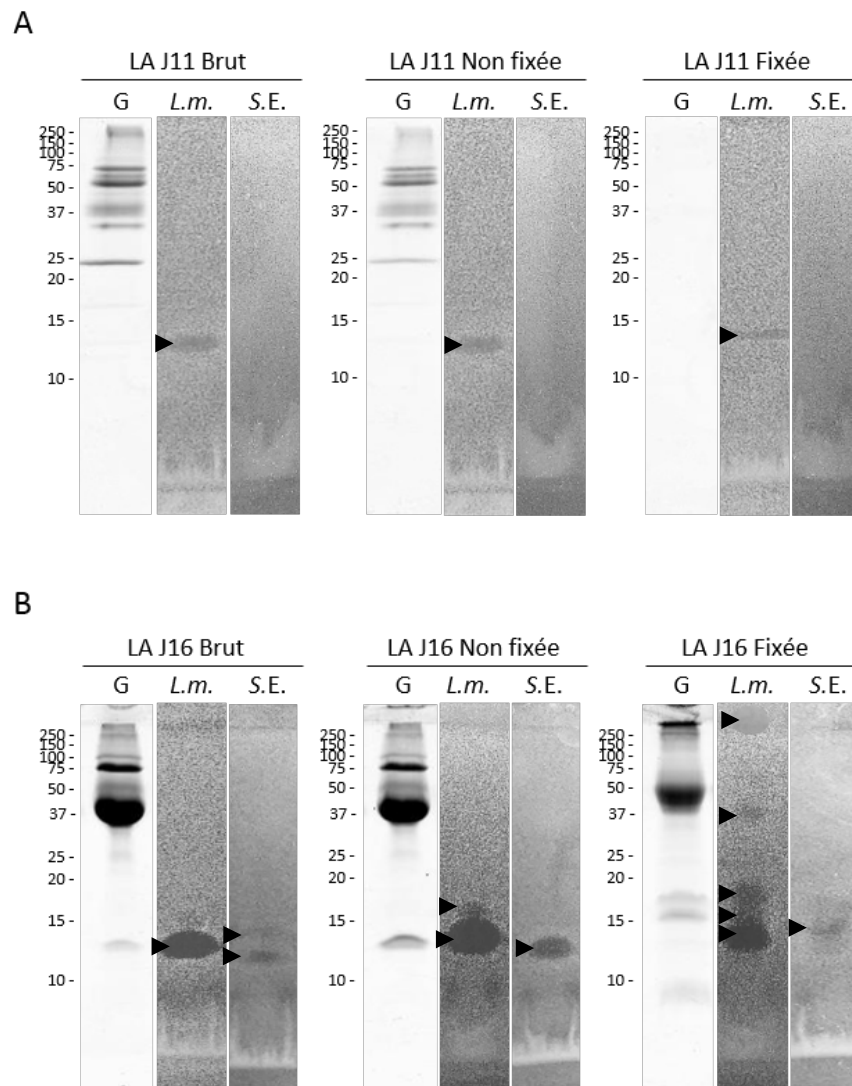
**Figure 5** : Profils protéiques (SDS-PAGE) des fractions brutes (B), non fixées (NF) et fixées (F) issues de la purification des HBP du LA à J11 et à J16 (10 µg de protéines/puits maximum). Les masses moléculaires du marqueur de taille sont indiquées à gauche des gels et sont exprimées en kDa.

Les profils protéiques pour les mêmes fractions sont différents entre les stades. La fractions B et NF du LA J16 présentent de nombreuses bandes dans les hautes masses moléculaires, que l'on ne distingue pas dans les fractions B et NF du LA J11. Il y a également des différences dans les basses masses entre 25 et 10 kDa. Toutefois les différences les plus significatives apparaissent pour les fractions F où aucune protéine n'est visible pour le LA J11 alors que le LA J16 semble comporter de nombreuses protéines.

### III.2-Détermination du potentiel antibactérien du LA par diffusion en gélose

Après purification des HBP, les activités antibactériennes des fractions B, NF et F.P du LA aux stades J11 et J16 ont été évaluées contre deux souches bactériennes *Listeria monocytogenes* (*L.m.*, gram positive) et *Salmonella enterica* Enteritidis (*S.E.* gram négatif), impliquées dans des toxi-infections humaines d'origines alimentaires. Pour pouvoir visualiser les activités spécifiques de chaque protéine, les tests antibactériens ont été réalisés directement sur gel SDS-PAGE d'après une méthode adaptée de Bhunia *et al.* (cf. II.4). Les gels ont été réalisés en conditions non réductrices et non bouillies, puis lavés dans une solution de triton X100 à 2,5% afin de permettre aux protéines de retrouver leur structure tridimensionnelle et ainsi de maintenir une activité biologique. Une gélose pauvre en nutriments, contenant les bactéries, est coulée sur le gel pour permettre la diffusion des protéines. Une gélose riche en nutriments est ensuite ajoutée sur la première gélose afin de permettre la croissance des bactéries. Les zones d'inhibition sur la gélose correspondent aux zones où les bactéries ne se sont pas développées.

Ces zones sont donc représentatives du pouvoir antibactérien des protéines testées. Les résultats sont illustrés dans la figure 6.



**Figure 6 :** Activité anti-*Listeria monocytogenes* (*L.m.*) et anti-*Salmonella enterica* Enteritidis (*S.E.*) des fractions bruts, non fixées et fixées à l'héparine du LA à J11 (A) et J16 (B), après purification des HBP par chromatographie d'affinité à l'héparine-sépharose (20 µg de protéine/puits). G : profil électrophorétique de la fraction testée colorée au bleu de Coomassie Les activités anti-*L.m.* et anti-*S.E.* sont indiquées par des flèches noires. Les masses moléculaires du marqueur de taille sont indiquées à gauche des gels sont exprimées en kDa.

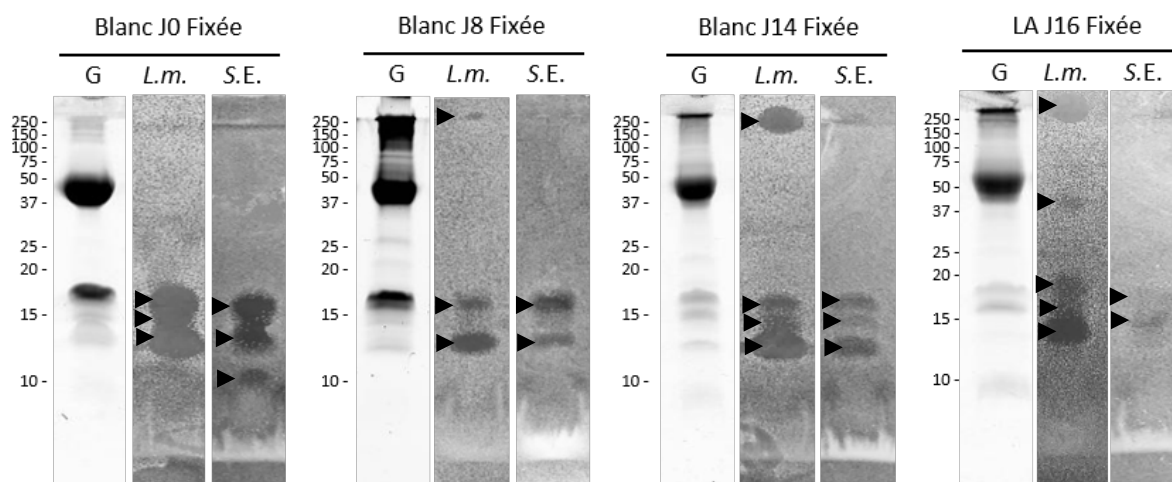
Comme présenté dans la section précédente, les profils protéiques des fractions LA J11 B et NF sont similaires, contrairement à la fraction F où aucune bande n'est visualisée. En revanche, les diverses fractions du LA J11 montrent les mêmes activités antibactériennes contre *L.m.* mais pas contre *S.E.* En effet, sur le test anti-*L.m.*, les fractions B, NF et F.P présentent un halo d'inhibition entre 15 et 10 kDa, semblant correspondre à une bande à peine apparente sur le gel coloré au bleu de Coomassie pour les fractions B et NF.



Les fractions LA J16 B et NF ont des profils protéiques et antibactériens quasi-similaires également, avec une bande commune entre 15 et 10 kDa qui correspond à une zone d'inhibition sur les tests anti-*L.m.* et anti-*S.E.* Toutefois, une zone supplémentaire d'inhibition est identifiable à 15 kDa sur la fraction NF. Cette particularité pourrait correspondre à une différence légère de quantité de protéine déposée au départ sur le gel SDS-PAGE. La fraction F.P, quant-à-elle, comporte 3 halos d'inhibition compris entre 20 et 10 kDa pour les deux souches bactériennes même si, elle semble plus active contre *L.m.* que contre *S.E.* Elle présente également un halo d'inhibition supplémentaire, anti-*L.m.*, dans la première partie du gel correspondante au gel de concentration (4% d'acrylamide). Il semblerait que toutes les protéines n'aient pas migré dans le gel et que certaines d'entre elles présentent des activités anti-*L.m.* La fraction LA J16 F.P révèle également une légère zone d'inhibition à hauteur de 37 kDa qui s'aligne avec le bas de la bande majoritaire au-dessus de 37 kDa.

Globalement, le LA J16 présente un profil protéique et une activité antibactérienne plus importante que le LA J11. Cela est dû au transfert des protéines du blanc dans le sac amniotique à partir de J11, dont la fraction liant l'héparine est connue pour avoir des activités antibactériennes (10). Par conséquent, pour mieux comprendre le rôle des protéines du blanc dans les activités antibactériennes observées pour le LA, les HBP du blanc ont été purifiées et analysées à différents stades du développement embryonnaire. Seuls les résultats obtenus pour les fractions F.P du blanc d'œuf sont présentés et comparés à la fraction F.P du LA J16 dans la figure 7. Ces fractions F.P ont des profils protéiques différents et ne présentent pas les mêmes activités antibactériennes.

La fraction F.P du blanc J0 a un profil protéique distinct de ceux obtenus pour les autres stades, avec deux protéines majeures entre 50 et 37 kDa et entre 20 et 15 kDa. En effet, d'une part les fractions F.P du blanc aux stades J8 et J14 révèlent des protéines de plus haute masse moléculaire contrairement au blanc J0. D'autre part, la bande au-dessus de 15 kDa semble disparaître progressivement dans le blanc au cours de l'incubation.



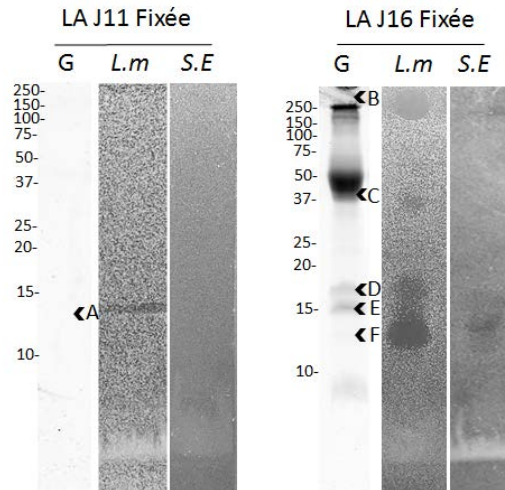
**Figure 7 :** Activité anti-*Listeria monocytogenes* et anti-*Salmonella enterica* Enteritidis des fractions fixées à l'héparine du blanc d'œuf à J0, J8 et J14, et du LA à J16, après purification des HBP par chromatographie d'affinité à l'héparine-sépharose (20 µg de protéines/puits). G : profil électrophorétique de la fraction testée coloré au bleu de Coomassie. L.m. : test anti-*Listeria monocytogenes* ; S.E. : test anti-*Salmonella enterica* Enteritidis. Les activités anti-*L.m.* et S. E. sont indiquées par des flèches noires. Les masses moléculaires du marqueur de taille sont indiquées à gauche des gels et sont exprimées en kDa.

Les fractions F.P des blancs J0, J8, et J14 démontrent une activité anti-*L.m.* et anti-*S.E.*, avec 3 halos d'inhibition distincts entre 20 et 10 kDa, tout comme pour le LA J16.

À partir du blanc J8 une zone d'inhibition anti-*L.m.* apparaît dans le gel de concentration, comme celle observée précédemment pour le LA J16. Cependant, ce n'est pas le cas de la zone d'inhibition à 37 kDa précédemment observée dans le LA J16 F.P pour les tests anti-*L.m.*, qui n'est plus observée dans les F.P du blanc. Il semblerait donc que les protéines du blanc ne soient pas le seul facteur pouvant expliquer les activités antibactériennes du LA de J11 à J16.

### III.3- Identification de potentiels candidats antibactériens

Pour identifier les HBP du LA J11 et J16 qui sont responsables des activités anti-*L.m.* et anti-*S.E.*, les fractions F.P du LA aux 2 stades ont été analysées par spectrométrie de masse. Les bandes de gel SDS-PAGE (Figure 8, puits G) associées aux zones d'inhibition sur les tests antibactériens (Figure 8, puits *L.m.* et *S.E.*) ont été découpées, et après réduction, alkylation et digestion des protéines, les peptides ont été séparés et analysés par un spectromètre couplé à de la chromatographie liquide. Les résultats sont présentés dans le tableau 1.



**Figure 8 :** Bandes découpées pour les identifications des HBP du LA à J11 et J16 responsables des activités anti-*Listeria monocytogenes* (*L.m.*) et anti-*Salmonella enterica* Enteritidis. (*S.E*). Les bandes (A à F) des gels SDS-PAGE correspondant aux zones d'inhibition ont été découpées et analysées par spectrométrie de masse (20 µg de protéines/puits). Les masses moléculaires du marqueur de taille sont indiquées à gauche des gels et sont exprimées en kDa.

Cette analyse a permis d'identifier 28 protéines différentes dans les deux fluides (Tableau 1), dont 6 dans le LA J11, 25 dans le LA J16 et 3 communes entre les deux stades. Une analyse bibliographique a été réalisée par la suite afin de déterminer si ces protéines possédaient un domaine de liaison à l'héparine et un pouvoir antibactérien.

Dans le LA J11, une seule bande révèle une activité antibactérienne (Figure 8, bande A). Plusieurs protéines ont été identifiées dans cette dernière, mais seulement 2 d'entre elles ont démontré une activité antibactérienne à ce jour : le lysozyme C (LYZ), qui a affiché plus récemment ses propriétés de faible liaison à l'héparine, et l'histone H2A.J (H2AFJ).

La fraction LA J16 présente 2 protéines majeures parmi ses HBP : l'OVAX située sur la bande C, et l'avidine (AVD) située sur la bande B, qui ont déjà montré leur potentiel antibactérien (8,15).

La fraction HBP du LA J16 contient également plusieurs autres protéines antibactériennes déjà identifiées chez la poule (bactériostatique ou bactériolytique) : l'ovomucin beta (Mucin 6) (MUC6), l'ovomucin subunit alpha (Mucin 5B) (MUC5B), l'ovoinhibitor (SPINK5) (16), l'ovotransferrin (TF) (Figure 8, bande B), la VMO1, la BMSP, l'AvBD11 le LYZ, (10) et l'ovocleidin-17 (OC-17) (17) (Figure 8, bandes B, D, E ,F). Certaines de ces protéines ont déjà démontré leur capacité à se lier à l'héparine (AvBD11, VMO1, BMSP, LYZ) (10). À l'inverse d'autres protéines comme la TF, ne possèdent pas de domaine de liaisons à l'héparine.

L'*actin cytoplasmic 2* (ACTG1), l'*ovalbumin* (OVAL) et le LYZ sont des protéines présentes avant et après le transfert du blanc.

Numéro d'accèsion de la protéine	Symbole du gène	Nom de la protéine	Poids moléculaire (kDa)	Bande correspondante sur les tests antibactériens (Figure 7)		Nombre de spectre	
				LAJ11	LAJ16	LAJ11	LAJ16
NP_001025924	H2AFJ	<i>Histone H2A.J</i>	102	A	-	171	0
NP_989617	ATP5A1Z	<i>ATP synthase</i>	60	A	-	36	0
NP_990852	ATP1A1	<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 precursor</i>	112	A	-	18	0
XP_015148231	A2ML1	<i>Alpha-2-macroglobulin-like</i>	160	-	B	0	338
NP_001001779	AvBD11	<i>Avian beta-defensin 11</i>	12	-	B	0	16
XP_015140573	CLU	<i>Clusterin</i>	62	-	B	0	38
XP_015156102	LOC100859777	<i>Deleted in malignant brain tumors 1 protein-like</i>	100	-	B	0	19
FINBL1	MUC6	<i>Ovomucin, subunit beta (Mucin 6)</i>	132	-	B	0	28
NP_001025783	SPINK5	<i>Ovoinhibitor</i>	52	-	B	0	28
NP_989993	MUC5B	<i>Ovomucin, subunit alpha (Mucin 5B)</i>	234	-	B	0	519
CAA55385	OVST	<i>Ovostatin</i>	164	-	B	0	18
P02789	TF	<i>Ovotransferrin</i>	78	-	B	51	708
NP_001161234	VMOI	<i>Vitelline membrane outer layer protein 1</i>	20	-	B, D-F	0	226
NP_001295542	ACTG1	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	42	A	B, F	20	9
BAU79389	BPIFB2	<i>Protein TENP</i>	47	-	B-E	0	224
AAB59733	AVD	<i>Avidin</i>	17	-	B-F	25	1 824
XP_004942176	BMSP (LOC101750704)	<i>Beta-microseminoprotein-like</i>	12	-	B-F	0	55
P00698	LYZ	<i>Lysozyme C</i>	16	A	B-F	349	773
P01012	OVAL	<i>Ovalbumin</i>	43	A	B-F	766	765
P01013	OVALX	<i>Ovalbumin-related protein X</i>	44	-	B-F	288	2 799
NP_001292019	ASTL	<i>Astacin-like metalloendopeptidase</i>	46	-	C	0	21
XP_004947191	TNFRSF6B	<i>TNF receptor superfamily member 6b</i>	38	-	C	0	10
NP_989629	TIMP2	<i>Metalloproteinase inhibitor 2</i>	22	-	D	0	2
NP_990818	TIMP3	<i>Metalloproteinase inhibitor 3</i>	25	-	D	0	19
P24367	PPIB	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B</i>	19	-	D	0	17
AAB39211	GLG1	<i>Golgi glycoprotein 1</i>	122	-	F	0	16
XP_015142525	MDK	<i>Midkine</i>	16	-	F	0	2
Q9PRSS	OC-17	<i>Ovocleidin-17</i>	17	-	F	0	33

Tableau 1 : Identification des HBP du LA à J11 et à J16 qui correspondent aux zones d'inhibition pour les tests anti-*Listeria monocytogenes* et anti-*Salmonella enterica* Enteritidis (Figure 7) par spectrométrie de masse couplée à de la chromatographie liquide. Un tiret signifie que les protéines n'ont pas été identifiées dans cette analyse.

## IV- Discussion

Les HBP, présentes chez de nombreux organismes, sont connues pour être impliquées dans plusieurs processus tels que l'angiogenèse, ou la prolifération, mais aussi dans la défense antimicrobienne (6). Ainsi, pour mieux comprendre l'implication du LA dans la protection de l'embryon de poule, nous avons cherché à identifier et caractériser les HBP du fluide à différents stades du développement embryonnaire, avant (J11) et après (J16) transfert du blanc dans le sac amniotique.

La purification des HBP du LA à J11 et J16 a été réalisée par chromatographie d'affinité sur colonne grâce à des billes d'héparine-sépharose (Figures 3 et 4 respectivement). Le LA J11 étant peu concentré en protéines, peu d'HBP ont pu être purifiées (en moyenne 0,01 µg de protéines/µL). Le LA J16 quant à lui, démontre une concentration en HBP bien plus importante (jusqu'à 1,5 µg de protéines/µL) ainsi que des profils protéiques identiques à ceux du blanc pour les fractions B, NF et F (9). Ces premiers résultats illustrent les changements importants qui interviennent au cours de l'incubation dans le LA avec le transfert du blanc (Figure 5), ainsi que de ses HBP dans le sac amniotique. Certaines des HBP du blanc d'œuf ont montré un potentiel antibactérien (7).

Le potentiel antibactérien des HBP purifiées a été déterminé par une technique de diffusion en gélose directement sur les gels SDS-PAGE après électrophorèse, développée par Bhunia et son équipe (11), et adaptée ici pour nos échantillons. Les tests ont été réalisés contre 2 souches bactériennes déjà utilisées auparavant par l'équipe pour tester les HBP du blanc d'œuf (9) : *Listeria monocytogenes* qui est une bactérie Gram positive et *Salmonella enterica* Enteritidis qui est une bactérie Gram négative. Il est d'autant plus intéressant de mesurer l'activité antibactérienne des HBP sur *S.E.*, puisque cette dernière est un pathogène capable de se développer dans l'œuf. Plusieurs zones d'inhibition ont été visualisées pour les LA J11 et J16, contre les deux souches bactériennes (Figure 6). Néanmoins, on peut constater qu'il y a une activité anti-*L.m.* nettement plus active que l'activité anti-*S.E.*, plus particulièrement pour la fraction F du LA J16 probablement à cause de la présence des HBP du blanc.

Les HBP responsables des activités anti-*L.m.* et/ou anti-*S.E.* ont été identifiées par spectrométrie de masse (Figure 8). Ces analyses ont révélé la présence de 6 protéines dont le LYZ, dans la seule zone d'inhibition observée sur les tests anti-*L.m.* pour les LA J11 (Tableau 1). L'H2AFJ

et le LYZ sont les deux protéines majeures. Le LYZ est une protéine de l'œuf déjà connue pour son activité antibactérienne. La protéine a également été identifiée dans le blanc d'œuf, la membrane vitelline, la coquille et le jaune d'œuf. Son rôle est donc primordial dans la défense de l'embryon.

Le LA J16 comprend une activité anti-*L.m.* et anti-*S.E.* beaucoup plus élevée que celle du LA J11, probablement du fait de sa plus grande concentration en HBP et surtout en HBP du blanc. Afin de mieux comprendre ce qu'il se passe au moment du transfert du blanc vers le LA, des analyses antibactériennes ont été réalisées en parallèle sur le blanc à J0, J8 et J14, après purification des HBP. Les résultats des tests antibactériens ont révélé une activité anti-*L.m.* dans le gel de concentration de la fraction F du LA J16 et des blancs aux stades J8 et J14, mais pas au stade J0 (Figure 7), ce qui indique que les protéines n'ont peut-être pas migré dans le gel. Entre J0 et J16 le volume de blanc diminue de 30 mL à moins d'1 mL et s'accompagne d'une augmentation de la concentration en protéines et de la viscosité, ce qui favorise la formation de complexes entre protéines. L'eau étant redistribuée vers les autres compartiments de l'œuf, les protéines sont alors fortement concentrées, et ce, jusqu'à la fin du transfert (1,3).

Après analyse par spectrométrie de masse, nous retrouvons 17 protéines dans le gel de concentration pour les LA J16, dont de petites protéines antibactériennes (AvBD11, VMO-1, ou encore LYZ) normalement retrouvées à des masses moléculaires plus petites (entre 20 et 10 kDa). Ces protéines interagissent probablement avec des protéines de plus hautes masses telles que MUC6, MUC5B, l'*apha-2-macroglobuline-like* (A2ML1) et l'*ovostatin* (OVST). En effet, les électrophorèses SDS-PAGE étant réalisées en conditions non réduites et non bouillies, les protéines agrégées ne peuvent pas migrer dans le gel de séparation dont la concentration en acrylamide est trop élevée. Elles semblent tout de même conserver leur activité anti-*L.m.*

D'autre part, une activité anti-*L.m.* à hauteur de 37 kDa a également été visualisée dans la fraction F du LA J16, mais pas dans les fractions F du blanc (Figure 7). Les protéines susceptibles de présenter une activité antibactérienne à ce niveau sont les protéines TENP et OVAX, ou encore des complexes entre des petites protéines comme le LYZ, la VMO-1 ou la BMSP (Tableau 1, bande C). Les 3 halos d'inhibition présents entre 20 et 10 kDa (Figure 7 ; Tableau 1, bandes D, E, F) pour les fractions F du LA J16 et du blanc correspondent probablement à la BMSP, la VMO1 et le LYZ, dont les activités anti-*L.m.* et anti-*S.E.* ont déjà été démontrées (9), même si d'autres protéines telles qu'OC-17 (elle aussi répertoriée en tant

que protéine antibactérienne (17)) pourraient elles aussi apporter leur contribution à l'activité antibactérienne.

Une recherche bibliographique a débuté afin de déterminer si toutes les HBP identifiées, au cours de ce travail, présentent une activité antibactérienne d'une part, et un domaine de liaison à l'héparine d'autre part. Les premiers résultats ont démontré que certaines d'entre elles ne présentaient pas de domaine de liaison à l'héparine, c'est le cas de l'*ovalbumin* (OVAL) et de l'*ovotransferrin* (TF) (9). Pendant le développement embryonnaire, les interactions entre les protéines du blanc sont favorisées. Il est donc possible que cela provoque des interactions entre les protéines majoritaires (OVAL, TF, CLU) qui ne lient pas l'héparine avec des HBP, ce qui expliquerait leur présence dans les bandes analysées.

Il serait intéressant de purifier par exemple sur une chromatographie d'exclusion les différentes protéines. Le potentiel antibactérien de ces protéines pourra être déterminé par des tests en solution, en s'affranchissant des limites inhérentes au test réalisé ici sur gel SDS-PAGE et en gélose. Ce type de technique permettrait également de déterminer les activités antibactériennes du fluide, pour tous les stades du développement.

## V- Conclusion

Ces différents travaux ont montré pour la première fois que le LA d'oiseau pouvait contribuer à la protection de l'embryon, en particulier après le transfert du blanc vers le LA (J12).

En effet, il semblerait que le potentiel antimicrobien du LA repose essentiellement sur les molécules antimicrobiennes présentes dans le blanc d'œuf. Cependant, nous avons observé des changements subtils au cours du développement embryonnaire avec une association de plusieurs petites protéines antimicrobiennes (AvBD11, LYZ, BMSP, VMO-I et AVD) à des molécules de haut poids moléculaire (MUC6, MUC5B, A2ML1, et OVST). On peut supposer que ce processus de liaisons tend à concentrer les molécules antibactériennes, et/ou permet leur stockage et leur protection contre des dégradations protéolytiques. Cet agglomérat de molécules antimicrobiennes pourrait contribuer à donner une immunité locale concentrée au niveau du tractus digestif de l'embryon puisque celui-ci commence à absorber oralement le LA à partir de J13, pour accompagner sa forte croissance dans la deuxième moitié de l'incubation.

Par ailleurs, d'autres candidats antibactériens ont été identifiés par cette approche. Il s'agira de vérifier qu'ils lient l'héparine et qu'ils ont des activités antibactériennes sur un plus large éventail de bactéries voire d'autres microorganismes.



## Références Bibliographiques

---

1. Howard L.Hamilton. Lillie's Development of the chick, an introduction to embryology. 3rd Edition. 1952.
2. Rehault-Godbert, S. The chicken egg: a multifaced and sophisticated assembly of protective systems. Presented at XIV Avian Immunology Research Group, Herrsching am Ammersee, Bavaria, DEU (2016-09-07 - 2016-09-10). 2016.
3. Davison, F. ; Kaspers, B. Avian immunology. Fred Davison, Bernd Kaspers, Karel A. Schat; 2008.
4. Romanoff AL. The Avian Embryo. Structural and functional development [Internet]. New York: The Macmillan Compagny; 1960. Disponible sur: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.131.3408.1219-a>
5. Underwood MA, Gilbert WM, Sherman MP. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *J Perinatol Off J Calif Perinat Assoc.* mai 2005;25(5):341-8.
6. Cho C-KJ, Shan SJ, Winsor EJ, Diamandis EP. Proteomics analysis of human amniotic fluid. *Mol Cell Proteomics MCP.* août 2007;6(8):1406-15.
7. M. Da Silva,\* V. Labas,† Y. Nys,\* and S. Réhault-Godbert\*,1. Investigating proteins and proteases composing amniotic and allantoic fluids during chicken embryonic development. 2017;
8. Réhault-Godbert S, Labas V, Helloin E, Hervé-Grépinet V, Slugoeki C, Berges M, et al. Ovalbumin-related protein X is a heparin-binding ov-serpin exhibiting antimicrobial activities. *J Biol Chem.* 2013;288:17285-95.
9. Hervé-Grépinet V, Réhault-Godbert S, Labas V, Magallon T, Derache C, Lavergne M, et al. Purification and characterization of avian beta-defensin 11, an antimicrobial peptide of the hen egg. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(10):4401-9.
10. Guyot N, Labas V, Harichaux G, Chessé M, Poirier J-C, Nys Y, et al. Proteomic analysis of egg white heparin-binding proteins: towards the identification of natural antibacterial molecules. *Sci Rep.* 2016;6:27974-27974.
11. Bhunia AK, Johnson MC, Ray B. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Ind Microbiol.* 1987;2(5):319-22.
12. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol.* 1951;88(1):49-92.
13. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* mars 1996;68(5):850-8.
14. Marie P, Labas V, Brionne A, Harichaux G, Hennequet-Antier C, Rodriguez-Navarro AB, et al. Quantitative proteomics provides new insights into chicken eggshell matrix protein

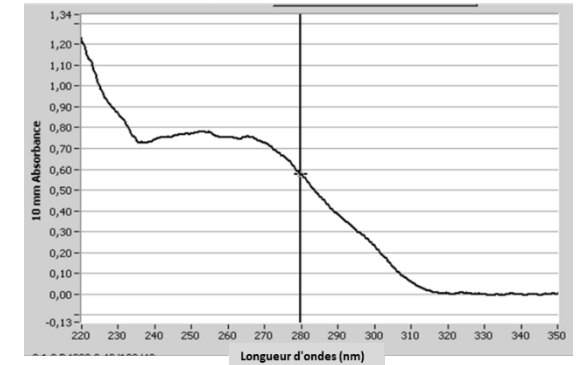
functions during the primary events of mineralisation and the active calcification phase. *J Proteomics*. 2015;126:140-54.

15. Harold B. White II&l Walter H. Orth III, Richard W. Schreiber, Jr., and Colin C. Whitehead\*. Availability of avidin-bound biotin to the chicken embryo. 1992;
16. Bourin M, Gautron J, Berges M, Attucci S, Le Blay G, Labas V, et al. Antimicrobial potential of egg yolk ovoinhibitor, a multidomain kazal-like inhibitor of chicken egg. *J Agric Food Chem*. 2011;59(23):12368-74.
17. Olivier Wellman-Labadie, Rajamani Lakshminarayanan,, Maxwell T. Hincke. Antimicrobial properties of avian eggshell-specific C-type lectin-like proteins. (5 February 2008).

# Annexe 1

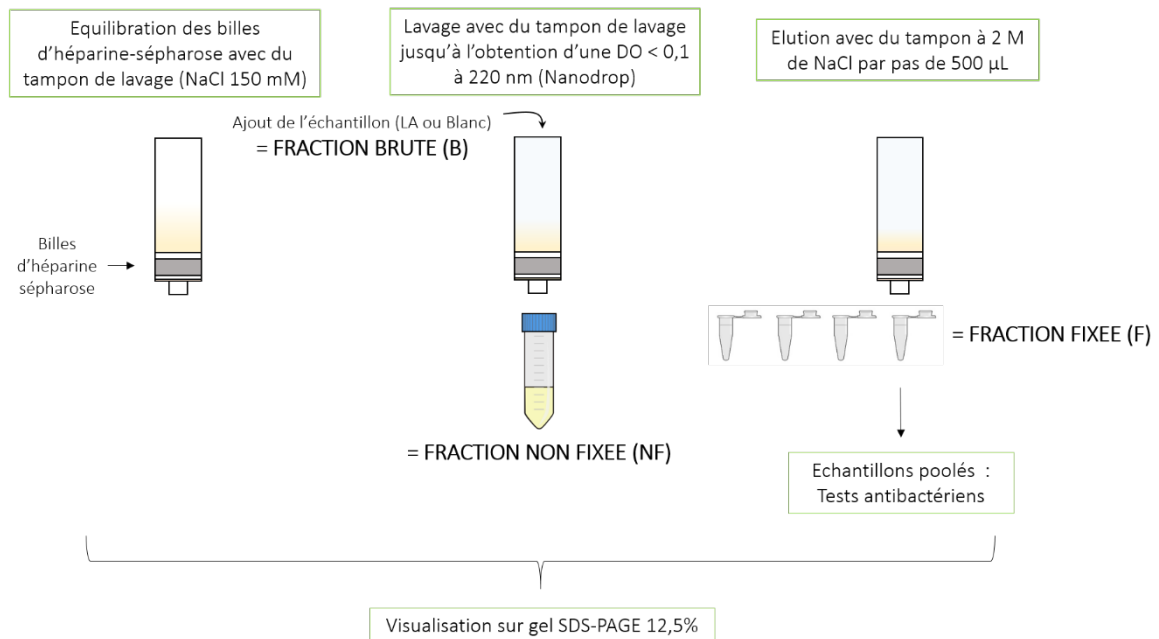
Nombre d'œufs	Paramètres de l'œuf		Embryon				Liquide amniotique							
	Poids de l'œuf (g)	Fissures	Longueur du 3 <sup>ème</sup> doigt (mm)	Paupière (Niveau de fermeture)	Corps	Sexe (Male/Femelle)	Volume échantillons (mL)	pH	Concentration en protéines (mg/mL)	Osmolalité (mOsm/kg)	Modèle d'absorbance*	Profil protéique individuel	Sélectionné pour la purification des HBP	Sélectionné pour analyses MS/MS
1	59.371	Non	6.5	1/2	Plumes	F	2.9	7.22	0.0879	270	Normal	Normal	Oui	Oui
2	64.004	Non	7.0	1/3	Normal	M	2.3	7.8	0.0986	271	Normal	Normal	Oui	Oui
3	67.039	Non	7.0	Ouvert	Normal	M	2.3	7.98	0.0985	269	Normal	Normal	Oui	Oui
4	67.375	Non	7.0	1/3	Normal	M	2.1	7.85	0.0994	269	Normal	Normal	Oui	Oui
5	62.133	Non	7.0	1/4	Normal	NA	2.6	8.01	0.1015	269	Normal	Normal	Non	Non
6	70.246	Non	6.0	1/3	Normal	M	2.4	7.86	0.1080	290	Normal	Normal	Non	Non
7	61.614	Non	6.0	1/3	Normal	M	1.9	7.93	0.1068	267	Normal	Normal	Non	Non
8	60.017	Non	7.0	1/3	Normal	M	1.7	8.02	0.0868	NA	Normal	Normal	Non	Non
9	67.923	Non	7.0	1/3	Normal	F	2.6	7.72	0.0596	268	Normal	Normal	Oui	Non
10	55.498	Oui	7.0	1/3	Normal	M	1.8	7.93	0.2672	NA	Normal	Fortement concentré	Non	Non
11	65.588	Non	7.0	1/3	Normal	M	2.3	7.84	0.0990	266	Normal	Normal	Oui	Oui
12	67.399	Non	5.0	1/3	Petit	F	Pas d'échantillons							
13	56.245	Non	7.0	1/3	Normal	M	2	7.69	0.0908	264	Normal	Normal	Oui	Oui
14	63.428	Non	6.0	1/3	Normal	F	2.4	7.85	0.0727	283	Normal	Normal	Oui	Oui
15	62.198	Non	7.0	1/3	Normal	F	Pas d'échantillons							
16	58.424	Non	5.5	1/3	Petit	F	2.2	7.89	0.0804	271	Normal	Normal	Non	Non
17	59.906	Non	6.0	1/3	Normal	M	2.6	7.83	0.1020	269	Normal	Normal	Oui	Non
18	62.972	Non	5.0	1/4	Petit	F	2.1	7.88	0.0908	269	Normal	Normal	Non	Non
19	64.352	Non	7.0	1/4	Normal	M	2.2	7.84	0.0999	269	Normal	Normal	Oui	Non
20	63.842	Non	6.0	1/3	Normal	M	1.9	7.86	0.0668	266	Normal	Normal	Non	Non
21	60.648	Non	7.0	1/2	Normal	F	2.7	7.93	0.0739	270	Normal	Normal	Oui	Oui
22	74.557	Non	6.5	1/2	Normal	F	2.5	7.84	0.0663	269	Normal	Normal	Non	Non
23	61.246	Non	6.0	1/3	Normal	M	2.7	7.89	0.1007	268	Normal	Normal	Non	Non
24	64.077	Non	6.5	1/3	Normal	M	2	7.96	0.0893	267	Normal	Normal	Oui	Non
25	57.943	Non	6.5	1/3	Normal	F	1.8	7.96	0.1171	268	Normal	Normal	Oui	Oui
26	56.969	Non	6.0	1/3	Normal	M	2.5	8.04	0.1352	267	Normal	Fortement concentré	Non	Non
27	60.238	Non	6.0	1/3	Normal	M	1.9	7.91	0.0953	259	Normal	Normal	Oui	Oui
28	67.544	Non	6.5	1/3	Normal	F	2.8	7.72	0.1644	270	Normal	Normal	Non	Non
29	57.424	Non	6.0	1/3	Normal	M	2.7	7.78	0.0997	272	Normal	Normal	Oui	Non
30	62.865	Non	6.0	1/3	Plumes	M	2.1	7.87	0.1102	270	Normal	Normal	Oui	Non
31	58.192	Non	6.5	Ouvert	Normal	M	2.3	8.03	0.0984	268	Normal	Normal	Non	Non
32	64.203	Non	6.0	1/3	Normal	F	2.1	7.83	0.1110	269	Normal	Normal	Oui	Oui
33	59.065	Non	6.5	1/3	Petit	F	2.5	7.9	0.0807	267	Normal	Normal	Oui	Oui
34	64.999	Non	6.0	1/3	Plumes	F	2.4	7.83	0.1449	269	Normal	Normal	Oui	Non
35	64.529	Non	6.5	1/3	Plumes	M	2.2	7.96	0.1078	271	Normal	Normal	Non	Non
36	67.151	Non	6.5	1/3	Plumes	M	1.8	7.94	0.1482	268	Normal	Normal	Non	Non
37	52.477	Non	5.0	Ouvert	Petit	F	1.7	7.71	0.0625	NA	Normal	Normal	Non	Non
38	60.501	Non	6.0	1/3	Normal	F	2.6	7.96	0.1437	271	Normal	Normal	Oui	Non
39	61.851	Non	6.0	1/3	Normal	M	1.8	7.98	0.0980	265	Normal	Normal	Non	Non
40	60.109	Non	5.5	1/3	Normal	F	1.6	7.99	0.1707	273	Normal	Normal	Oui	Non
Moyenne	62.404	-	6.3	-	-	-	2.2	7.87	0.1062	269	-	-	-	-
Ecart-type (SD)	4.357	-	0.6	-	-	-	0.3	0.14	0.0375	5	-	-	-	-
Moyenne + 2SD	71.119	-	7.5	-	-	-	2.9	8.15	0.1811	279	-	-	-	-
Moyenne - 2SD	53.689	-	5.1	-	-	-	1.5	7.59	0.0312	259	-	-	-	-

\*Modèle d'absorbance normal (Nanodrop)

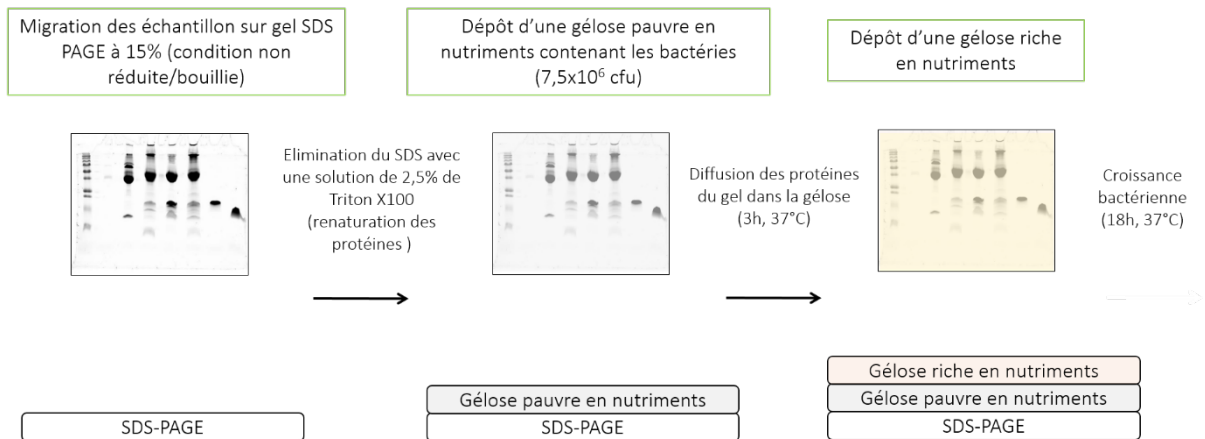


Les paramètres des œufs, des embryons et des liquides amniotiques mesurés avant, pendant et après l'échantillonnage des liquides au jour 11 du développement. Les cellules ombrées représentent des valeurs aberrantes selon les tableaux de Hamburger et Hamilton (11) ayant un intervalle de confiance à +/- 2SD par rapport à la moyenne.

## Annexe 2



- Protocole de purification des HBP par chromatographie d'affinité à l'héparine-sépharose



- Protocole de mesures des activités antibactériennes des HBP couplant des analyses sur gel SDS PAGE et des diffusions en gélose (11)

## Résumé

---

Chez l'oiseau, le liquide amniotique (LA) protège physiquement l'embryon contre les chocs mécaniques et la déshydratation. Il est constitué principalement d'eau, mais il contient également des protéines et des peptides au rôle méconnu. En revanche, chez l'homme, certaines de ces molécules participent activement au système immunitaire inné de l'embryon, qui représente la première ligne de défense contre les pathogènes. L'objectif de ce projet était donc de purifier, d'identifier et de caractériser les activités antibactériennes de certains candidats antibactériens du LA (œuf de poule) et en particulier les protéines liant l'héparine (HBP). Pour cela, les HBP du LA ont été purifiées par chromatographie d'affinité à l'héparine, au 11<sup>ème</sup> et 16<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire, soit respectivement, avant et après transfert des protéines du blanc d'œuf dans le sac amniotique. Le potentiel antibactérien des HBP a été testé sur les souches *Listeria monocytogenes* et *Salmonella enterica* Enteritidis par une technique sur gel. Nous avons montré que certaines de ces HBP présentent une activité antibactérienne anti-*Listeria monocytogenes* et anti-*Salmonella enterica* Enteritidis marquée à la fin de l'incubation (16<sup>ème</sup> jour) et plusieurs candidats antibactériens ont pu être identifiés par spectrométrie de masse. Ces résultats révèlent donc que le LA d'oiseau participe à la protection antibactérienne de l'embryon, en particulier à partir de la deuxième moitié du développement embryonnaire.

In Birds, the amniotic fluid (AF) physically protects the embryo against mechanical shocks and dehydration. It mainly consists of water, but it also contains proteins and peptides, which role remains undefined. In contrast, in human AF, some of these molecules activate the innate immune system of the embryo, which represents the first line of defense against pathogens. The objective of the project was to purify, to identify and to characterize antibacterial activities of some antibacterial candidates contained in AF (chicken egg) and in particular, heparin-binding proteins (HBP). In this context, the HBPs contained in AF were purified by heparin-affinity chromatography, at the 11th and 16th days of embryonic development, before and after egg white transfer into the amniotic sac, respectively. The antibacterial potential of HBP was assessed against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Enteritidis strains by an in-gel technique. We showed that some of these HBP have anti-*Listeria monocytogenes* and anti-*Salmonella enterica* Enteritidis activity, more pronounced at the end of incubation (day 16), and several antibacterial candidates have been identified by mass spectrometry. These results reveal that the chicken AF participates in the antibacterial protection of the embryo, especially during the second half of the embryonic development.