

Les liquides amniotique et allantoïque de l'oeuf de poule: caractérisation et rôles dans la protection de l'embryon au cours du développement

Mylène da Silva, Sophie Réhault-Godbert

▶ To cite this version:

Mylène da Silva, Sophie Réhault-Godbert. Les liquides amniotique et allantoïque de l'oeuf de poule : caractérisation et rôles dans la protection de l'embryon au cours du développement. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Tours, Région Centre Val de Loire, 2020. Français. NNT : . tel-02888897

HAL Id: tel-02888897 https://hal.inrae.fr/tel-02888897

Submitted on 3 Jul 2020 $\,$

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

ÉQUIPE Défense de l'Œuf, Valorisation, Evolution

THÈSE présentée par :

Mylène DA SILVA

soutenue le : 1^{er} décembre 2017

pour obtenir le grade de : Docteur de l'université François – Rabelais de Tours

Discipline/ Spécialité : Science Vie Santé

Les liquides amniotique et allantoïque de l'œuf de poule : caractérisation et rôles dans la protection de l'embryon au cours du développement

THÈSE dirigée par : Mme REHAULT-GODBERT Sophie Chargée de recherche, INRA Centre Val de Loire

RAPPORTEURS :

M. PAIN Bertrand	Directeur de Recherche, INSERM de Lyon
M. PINEAU Charles	Directeur de Recherche, INSERM de Rennes

JURY :

M. CHARPIGNY Gilles	Chargé de Recherche, INRA de Jouy-en-Josas
Mme EVERAERT Nadia	Chargée de cours, Université de Liège, Belgique
M. JAFFREDO Thierry	Directeur de Recherche, CNRS de Paris
M. PAIN Bertrand	Directeur de Recherche, INSERM de Lyon
M. PINEAU Charles	Directeur de Recherche, INSERM de Rennes
Mme REHAULT-GODBERT Sophie	Chargée de Recherche, INRA du Centre Val de Loire
M. VOURC'H Patrick	Professeur et Praticien hospitalier, Université de Tours

Le plus important est-ce de chercher ou de trouver ?

Remerciements

En tout premier lieu, je souhaite remercier la personne sans qui tout cela n'aurait pas été possible, Sophie RG. Merci pour votre patience, vos encouragements, vos conseils, votre aide, votre soutien et pour avoir fait de moi la chercheuse que je suis aujourd'hui. Un jour peut-être j'arriverai à vous tutoyer ! Je remercie également Yves Nys pour tous ses bons conseils, ses blagues malicieuses et ses tenues improbables.

Merci à tous les membres de l'équipe Défense de l'Œuf, Valorisation, Evolution : Magali C., Maryse M., Aurélien B., Nicolas G., Joël G., Jean-Claude P., Clara D., Jacky E., Nelly B., Marie-Louise Z. et Thierry M. Je n'ai pas encore beaucoup de points de comparaison, mais vous êtes l'équipe la plus soudée, la plus dynamique et la plus sympa que je connaisse ! Je vous remercie pour votre accueil, votre aide, votre travail et tous les moments de complicité. Grâce à vous, j'ai pu vivre une expérience très enrichissante autant sur le plan professionnel que personnel !

Je remercie Valérie L. de m'avoir présentée à Sophie, et ainsi d'avoir enclenché le processus. Merci pour ta présence, tes conseils et ton aide tout au long de ces trois années.

Merci à mon petit club « Licorne » : Sarah-Anne, Marion, Claire, Anne-Sophie, Pauline, Anaïs, Audrey et Marine, pour tous les bons moments, tous les mails, les GIFs, les blagues chelous, les chats, les infos de dernières minutes, les soirées et les activités animées. « Tendresse et chocolat, je vous aime ... ».

A Nathalie LR. (#PetitCanard), Maeva, avec un « H » comme Halgrain, et Lilian S. (La Tatane) : merci pour l'animation et les décorations de bureau (les Suédois ont du souci à se faire), pour notre amitié, nos fou-rires, les montages photos, les chansons, les blind-tests, les lancers de boulettes et votre soutien infaillible. Je m'arrête ici, déjà trop de preuves écrites...

Merci à tous ceux qui sont partis de l'unité, mais dont les souvenirs trainent toujours au détour d'un couloir : à Justine R. pour tes sauts de cabris, à Vanessa G. pour ton accent du sud qui me rappelait la maison, à Sophie E. pour nos délires, à De Pauw pour m'avoir supportée en tant que responsable de stage et à Loulergue pour ta tête de hamster.

Un grand merci à tous les membres de l'unité de Recherches Avicoles, de la plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomolécules, de l'équipe Gonade, Conservation, Régénération, ainsi que de l'équipe Pathogénie de la Colibacillose Aviaire pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée.

Et enfin, je souhaite particulièrement remercier la région Centre-Val de Loire pour le financement de ma thèse, ainsi que les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Merci à ma famille et à mes amis, que vous soyez plutôt « chocolatine » ou « pain au chocolat » !

Résumé

L'œuf de poule fraichement pondu renferme des défenses naturelles physiques, chimiques et moléculaires qui protègent l'embryon des agressions physiques et microbiennes de l'environnement. Cependant, au cours du développement embryonnaire, ces défenses initialement localisées dans les structures élémentaires de l'œuf sont modifiées pour laisser place à de nouvelles structures dérivées des membranes embryonnaires : les sacs vitellin, amniotique et allantoïque. Leurs positions respectives autour du jaune, de l'embryon et de l'ensemble des compartiments de l'œuf, ajoutent ainsi différents niveaux de protection de l'embryon. En outre, l'assimilation des composés de la coquille, de la membrane vitelline, du jaune et du blanc d'œuf, suggère une relocalisation dans les fluides extra-embryonnaires, des défenses moléculaires initialement présentes. Dans ce contexte, l'objectif du travail de thèse était d'analyser la composition et les propriétés biologiques et physicochimiques des fluides amniotique et allantoïque de l'œuf de poule, pour évaluer plus précisément leur rôle respectif dans la protection de l'embryon au cours de son développement.

L'identification des protéines des fluides amniotique et allantoïque par protéomique aux 11^{ème} et 16^{ème} jours d'incubation respectivement, a mis en évidence la relocalisation des protéines et des peptides antibactériens initialement présents dans l'œuf, dont le lysozyme et l'ovotransferrine. A partir du 12^{ème} jour d'incubation, le transfert massif des molécules antibactériennes du blanc dans le liquide amniotique, augmente significativement le potentiel antibactérien de ce dernier. La spécificité phylogénétique de certaines de ces protéines, en comparaison avec les ancêtres ovipares aquatiques (poissons et amphibiens), suggère une adaptation des oiseaux à l'environnement et à la flore microbienne terrestre (ovalbuminrelated protein X, bêta-défensine aviaire 11, bêta-microséminoprotéine, ovocléidine-17, etc.). La complexation des protéines du blanc avant leur transfert dans le fluide amniotique semble préserver les activités antibactériennes des protéines, et pourrait également favoriser le dépôt d'un biofilm protecteur sur l'embryon et sur ses parois intestinales, après l'ingestion du fluide amniotique par l'embryon (protéines sialylées et glycosylées, antiprotéases, immunoglobulines, etc.). Lors de l'éclosion, ce biofilm pourrait ainsi protéger le poussin contre les microorganismes potentiellement pathogènes se développant à la surface de la coquille, et par extension, contre tous ceux retrouvés dans l'environnement d'élevage.

Outre la détection de molécules antibactériennes dans les deux fluides étudiés, nous avons observé des variations des propriétés physicochimiques du fluide allantoïque au moment de

l'accélération du métabolisme embryonnaire, qui pourraient affecter la survie et la croissance des bactéries, mais aussi moduler les activités biologiques des molécules du fluide (pH acide, acide urique, urée, ammonium, azote, etc.). L'analyse fonctionnelle des protéines du fluide allantoïque a révélé la présence de protéases actives. L'implication de ce fluide dans d'autres processus notamment dans la digestion des nutriments (aminopeptidase N, méprine A, dipeptidyl peptidase 4, etc.), pour une réabsorption complète des composés de l'œuf (acides aminés, peptides) par la membrane chorioallantoïque (recyclage des déchets métaboliques) reste donc à explorer.

Pour conclure, ces résultats montrent que le fluide amniotique joue un rôle significatif dans la défense antimicrobienne de l'embryon, en particulier à partir de la deuxième moitié de l'incubation, avec l'augmentation de la concentration en molécules antimicrobiennes actives. Après son ingestion par l'embryon, il pourrait également contribuer à la santé digestive du jeune poussin avant la mise en place de son propre système immunitaire. En revanche, le rôle du fluide allantoïque dans la défense reste à conforter.

Mots clés : œuf de poule, développement embryonnaire, fluides amniotique et allantoïque, protéomique, analyses fonctionnelles, phylogénie, activités antibactériennes et protéolytiques

Résumé en anglais

Freshly laid egg encloses natural physical, chemical and molecular defenses, which protect the chicken embryo against physical shocks and microbial infections. However, during embryonic development, these defenses initially localized in the basic egg structures are modified and replaced by new structures derived from embryonic membranes : the yolk, amniotic an chorioallantoic sacs. Their respective positions around the yolk, the embryo, and the overall egg compartments, add different defense levels around the embryo. As a result of the assimilation of the eggshell, vitelline membrane, egg yolk and egg white components, molecular defenses initially present in the egg are thought to be reallocated in the extraembryonic fluids. In this context, our objectives were to analyze the composition and the biological and physicochemical properties of the amniotic and allantoic fluids, to evaluate precisely their roles in the embryo protection during its development.

Proteins from the amniotic and the allantoic fluids were identified using proteomics at the 11th and 16th days of the incubation, respectively. Antibacterial proteins and peptides initially present in the egg, such as the lysozyme and the ovotransferrin, were found in both fluids then confirming their reallocation during incubation. From the 12th day of the incubation onward, the massive transfer of egg white into the amniotic sac increases significantly the antibacterial activity of the amniotic fluid. The phylogenetic specificity of certain proteins, compared with aquatic oviparous ancestors (fishes and amphibians), suggests that birds have adapted to their terrestrial environment, and its microbial flora (ovalbumin-related protein X, avian beta-defensin 11, ovocleidin-17, etc.). Protein-protein association into the egg white prior to its transfer into the amniotic fluid, seems to preserve the activity of the antibacterial proteins, and could also promote the formation of a protective biofilm around the embryo and into its intestine, after absorption of the amniotic fluid by the embryo (sialylated and glycosylated proteins, antiproteases, immunoglobulins, etc.). This process would serve the chick during and after hatching, to face potential pathogenic microorganisms overdeveloping on the eggshell, and thereby, all microorganisms present in the rearing environment.

In addition to the presence of antibacterial molecules in both fluids, we observed variations of the physicochemical properties of the allantoic fluid while the embryonic metabolism increases, in the second half of the development. These modifications could affect the bacteria growth and the survival of bacteria, and could also modulate the biological activities, such as the antibacterial activities, of the molecules found in this fluid (acid pH, uric acid, urea, ammonium, nitrogen, etc.). Active proteases have also been identified into the allantoic fluid, which suggests its involvement in other processes, such as nutrients digestion (aminopeptidase N, meprin A, dipeptidyl peptidase 4, etc.). The resulting amino acids or peptides could be reabsorbed by the surrounding chorioallantoic membrane, as a recycling process, to optimize the absorption of egg nutrients.

To conclude, the amniotic fluid plays a significant role into the antibacterial defense of the embryo, particularly during the second half of the development, with the increase in active antibacterial molecules coming from the egg white. After its absorption by the embryo, the amniotic fluid could also contribute to the chick intestinal health, until its immune system become functional. However, the involvement of the allantoic fluid into the egg's and embryo's defenses still needs to be proved.

Keywords: chicken egg, embryonic development, amniotic and allantoic fluids, proteomics, functional analysis, phylogeny, antibacterial and proteolytic activities

Table des matières

Remerciements	5
Résumé	7
Résumé en anglais	9
Table des matières	11
Liste des tableaux	13
Liste des figures	14
Liste des annexes	17
Abréviations	
I - Contexte scientifique	19
II - Synthèse bibliographique	
A - Introduction générale : formation et évolution des structures de l'œuf de poule, de	la ponte
à l'éclosion	
1 - Les structures primaires de l'œuf	
1.1 - Le jaune ou vitellus	
1.2 - La membrane vitelline	
1.3 - Le blanc ou albumen	30
1.4 - La coquille	
2 - Les structures extra-embryonnaires de l'œuf	
2.1 - Le sac vitellin	
2.2 - Le sac amniotique	
2.3 - Le sac allantoïque	
B - Les défenses naturelles primaires de l'œuf	43
1 - La coquille, la première barrière contre les pressions de l'environnement	
1.1 - Une structure cristalline sophistiquée	44
1.2 - Les propriétés de la matrice organique	45
1.3 - Solubilisation au cours du développement	46
2 - Le blanc d'œuf, une barrière moléculaire et physicochimique contre les pathogèt	nes 47
2.1 - Les protéines et peptides antibactériens	47
2.2 - Les paramètres physicochimiques	50
3 - La membrane vitelline, une barrière physique et moléculaire	51
3.1 - Un réseau de fibres protéiques	52
3.2 - Disparition progressive au cours de l'incubation	

4 - Le jaune d'œuf, une source d'immunoglobulines (Igs) maternelles
4.1 - Les immunoglobulines Y (IgY)53
4.2 - Transfert des IgY au cours de l'incubation54
4.3 - Assimilation des composés du jaune55
5 - Conclusion
C - Structures extra-embryonnaires et défenses de l'œuf au cours du développement57
1 - Les membranes extra-embryonnaires
1.1 - La membrane chorioallantoïque, la deuxième barrière après la coquille58
1.2 - Le sac vitellin remplace la membrane vitelline
1.3 - Le sac amniotique entoure l'embryon
2 - Les fluides extra-embryonnaires amniotique et allantoïque
2.1 - Le potentiel antibactérien du fluide amniotique (AmF)60
2.2 - Le potentiel protéolytique du fluide allantoïque (AlF)61
III - Objectifs de thèse
IV - Résultats expérimentaux
Publication 1 : Investigating proteins and proteases composing amniotic and allantoic fluids
during chicken embryonic development73
Publication 2 : The unique features of proteins depicting the chicken amniotic fluid
V - Discussion et perspectives
VI - Conclusion
Bibliographie
Annexes

Liste des tableaux

Liste des figures

Figure 1 : Représentation des différentes structures basiques et extra-embryonnaires de l'œuf
de poule non fertilisé (à gauche) ou fertilisé (à droite ; 8 ^{ème} jour d'incubation ou ED8). 25
Figure 2 : Schéma illustrant les différents rôles des structures basiques et extra-
embryonnaires de l'œuf au cours du développement embryonnaire chez l'oiseau
(Romanoff et Romanoff, 1967)26
Figure 3 : Formation de l'œuf dans l'appareil reproducteur de la poule (schéma d'après
Hincke et al., 2012). A droite sont indiquées les compositions du jaune, du blanc, de la
coquille (Li-Chan et Kim, 2008) et de la membrane vitelline (Chung et al., 2010) d'œuf
de poule
Figure 4 : Structure du follicule ovarien et de l'ovocyte chez la poule (Réhault-Godbert and
Guyot, 2017)
Figure 5 : Représentation schématique de la coquille d'œuf de poule (schéma d'après Hincke
<i>et al.</i> , 2012)
Figure 6 : Frise chronologique illustrant le développement embryonnaire chez la poule. En
bleu : début de la formation des structures extra-embryonnaires ; en orange : évènements
marquants en lien avec les structures extra-embryonnaires. Les flèches orange indiquent
le terme du processus
Figure 7 : Illustration de la croissance du sac vitellin à la surface du jaune aux 2^{ime} et 4^{ime}
jours d'incubation chez la poule (ED2 et 4) (Romanoff, 1960)
Figure 8 : Formation des structures extra-embryonnaires dans l'œuf de poule aux 2 ^{ème} et 3 ^{ème}
jours d'incubation (ED2 et 3) vue en coupe sagittale (Pattern, 1920). Le chorion et la
membrane du sac allantoïque fusionnent à partir d'ED5-6 pour former la membrane
chorioallantoïque (en italique)
Figure 9 : Illustration de la formation du sac allantoïque dans l'œuf de poule aux 2 ^{ème} et 3 ^{ème}
jours d'incubation (ED2 et 3) vue en coupe sagittale (Pattern, 1920)
Figure 10 : Formation du fluide subembryonnaire dans l'œuf de caille (d'après Latter et
Baggott, 2002). L'eau du blanc est tranférée dans le jaune via un gradient osmotique
établi au niveau du blastoderme, par un échangeur Na ⁺ /H ⁺ (NHE), des ATPAases
$(Na^+/K^+ ATPase \text{ et } V-ATPase)$ et une anhydrase carbonique (CA). La forte concentration
en ion sodium dans le fluide subembryonnaire entraine un influx d'eau du blanc dans le
jaune

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).

- Figure 25 : Frise chronologique illustrant l'évolution des fluides amniotique et allantoïque de l'œuf de poule au cours de l'incubation. Schématisation des transferts de protéines et d'eau entre les structures extra-embryonnaires : 1 à 2) transfert du blanc dans le sac amniotique, 2 à 3) absorption orale du blanc mélangé au fluide amniotique par l'embryon, et endocytose d'une partie par l'intestin, puis 3 à 4/4') sécrétion dans le jaune/sac chorioallantoïque, 4/4' à 5/5') réabsorption par le sac vitellin/chorioallantoïque et 5/5' à 6) transfert des composés digérés ou non vers l'embryon, *via* le réseau sanguin (Article 1). Il existe aussi un transfert direct de protéines du blanc vers le jaune *via* la membrane vitelline résiduelle (1').
- Figure 27 : Evolution des défenses innées des structures extra-embryonnaires de l'œuf de poule au cours de l'incubation. C : défenses chimiques et moléculaires ; P : défenses physiques. En italique : les hypothèses formulées mais non vérifiées dans cette étude. 155

Liste des annexes

Annexe 1 : Etude préliminaire du profil métabolique du fluide allantoïque d'œu	ıf de poule au
10 ^{ème} jour d'incubation par 1H-NMR spectroscopie	177
Annexe 2 : Communications scientifiques	179
Annexe 3 : Première revue	
Annexe 4 : Deuxième revue	

Abréviations

AFP : alpha-foetoprotéine ALB : albumine sérique AlF : fluide allantoïque AmF : fluide amniotique ANPEP : aminopeptidase N APOA1 : apolipoprotéine A1 APOA4 : apolipoprotéine A4 APOB : apolipoprotéine B APOC3 : apolipoprotéine C3 APOV1 : apovitellenine 1 ASTL : métalloprotéinase de type astacine AvBD11 : bêta-défensine aviaire 11 AVD : avidine BMSP : bêta-microséminoprotéine BPIFB2/TENP/G2/: protéine TENP/ovoglobuline G2 CST3 : cystatine 3 DPP4 : dipeptidyl peptidase 4 ED : jour d'incubation ExFABP : protéine liant les acides gras extracellulaires F2/10 : thrombine et facteur de coagulation 10 GC : protéine liant la vitamine D Igs: immunoglobulines IgY, M et A : immunoglobulines Y, M et A L.m. : Listeria monocytogenes LYZ: lysozyme MDK : midkine MEP1A : sous unité alpha de la méprine A MMP2 : métalloproteinase de matrice n°2 MUC5B et MUC6 : ovomucine alpha et bêta NMR/RMN : résonnance magnétique nucléaire OC-17 : ovocléidine-17 OC-116 : ovocléidine-116 OCX36 : ovocalyxine-36 **OVAL** : ovalbumine OVALX/Y : ovalbumin-related protein X/Y **OVST** : ovostatine PCR : réaction de polymérisation en chaîne RBP : protéine liant la riboflavine TF: ovotransferrine TTR : transthyrétine SDS-PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium S.E.: Salmonella enterica Enteritidis SPINK5 : ovoinhibiteur SPINK7 : ovomucoïde VMO1, 2 : protéines de la membrane vitelline externe n°1 et 2 VTG1, 2, 3 : vitellogénines 1, 2 et 3

I - Contexte scientifique

Considérant sa haute valeur nutritive, la diversité de ses constituants, ainsi que son prix abordable, l'œuf de poule est un aliment incontournable de l'alimentation humaine. Il doit, par conséquent, être garant d'une qualité sanitaire irréprochable. Les enjeux pour la filière de l'œuf de consommation sont donc à la fois d'ordre sanitaire, principalement à cause des risques de toxi-infections alimentaires pour les consommateurs, mais également économique, par les pertes qu'entrainent des œufs déclassés ou de qualité moindre. Pour la filière des œufs à couver, l'enjeu est essentiellement économique, du fait de la mortalité embryonnaire que peut engendrer les contaminations microbiennes.

Une fois pondu, l'œuf se retrouve dans un milieu potentiellement hostile, exposé aux microorganismes et aux pathogènes de l'environnement. Pour lutter contre ces agressions, il possède initialement un ensemble de défenses physiques, chimiques et moléculaires, mises en place au moment de sa formation dans l'oviducte. Dans le cas d'un œuf à couver, le système immunitaire adaptatif de l'embryon n'est fonctionnel qu'après éclosion. Par conséquent, l'embryon ne peut s'appuyer que sur les systèmes déjà présents dans l'œuf pour se développer et surtout pour assurer sa protection. Ainsi, les structures primaires de l'œuf, soit la coquille, le blanc, la membrane vitelline et le jaune, assurent la défense de l'œuf, à différents niveaux, tout en apportant les nutriments et l'énergie nécessaire au bon développement de l'embryon. Cependant, ces protections ne sont efficaces qui si leur intégrité est préservée. Or il existe de nombreuses situations, physiologiques ou pathologiques, où ces structures sont altérées : une alimentation de la poule carencée en calcium fragilise la coquille, la conservation prolongée des œufs endommage la structure de la membrane vitelline et celle du blanc, etc.

Au cours de l'incubation, ces structures élémentaires sont naturellement modifiées voire altérées, et ce, dès les premiers stades du développement : la membrane vitelline est progressivement dégradée, le calcium de la coquille est solubilisé pour la formation du squelette de l'embryon, et le blanc ainsi que le jaune sont assimilés par l'embryon pour sa croissance. Ces changements peuvent entrainer une fragilisation des défenses de l'œuf, et rendre l'embryon plus vulnérable aux infections. En élevage, pour pallier d'éventuelles contaminations de l'œuf par la flore de surface et l'environnement de l'élevage, les œufs sont systématiquement récupérés, nettoyés, désinfectés et stockés avant d'être placés en incubateur. Cependant, ce processus ne semble pas totalement fiable, puisque 10% de la mortalité embryonnaire en élevage avicole est encore attribuée aux infections par des pathogènes, malgré les procédures de décontamination. Ces procédures ne sont pas sans

conséquences pour la filière, car certains de ces désinfectants, comme le formaldéhyde, sont toxiques pour les accouveurs et peuvent s'accompagner de dépôts de résidus nocifs dans l'œuf. De nombreuses études sont en cours pour évaluer le potentiel et l'efficacité des molécules et des pratiques alternatives pour la décontamination. Cependant, pour trouver des solutions fiables et raisonnées, il est aussi nécessaire de mieux comprendre comment évoluent les mécanismes de défense naturels de l'œuf au cours du développement. En outre, l'identification des stades critiques où les risques de contamination sont accrus, permettrait d'adapter au mieux les procédures de désinfection.

En parallèle des changements drastiques observés pour les structures primaires de l'œuf pendant l'incubation, des structures extra-embryonnaires se forment progressivement. Les sacs vitellin, allantoïque et amniotique sont des tissus vivants transitoires, reliés physiquement à l'embryon, et qui viennent en soutien pour assurer toutes les fonctions vitales de ses organes en attendant l'éclosion. Elles servent également d'intermédiaires entre l'embryon et les nutriments de l'œuf, en permettant entre autres le transfert et l'assimilation des composés du blanc et du jaune. Localisées tout autour de l'embryon, elles constituent des barrières physiques supplémentaires face aux agressions microbiennes. Toutefois, leur rôle exact dans la défense de l'embryon est encore mal connu. De telles structures ont déjà été décrites chez les espèces vivipares, et chez l'humain, elles sont pleinement impliquées dans la protection de l'embryon, particulièrement le fluide amniotique.

Dans ce contexte, pour mieux comprendre l'implication des structures extraembryonnaires dans la protection de l'œuf face aux pathogènes, et ainsi comprendre comment cette défense évolue au cours du développement embryonnaire, nous avons caractérisé certaines de ces structures, et plus précisément les fluides extraembryonnaires contenus dans les sacs amniotique et allantoïque.

Pour bien situer la problématique, la première partie de la synthèse bibliographique sera consacrée à une présentation générale de l'œuf, de sa formation et de sa composition, ainsi que de l'évolution de différentes structures exposées ici, de la ponte à l'éclosion. La deuxième partie portera plus spécifiquement sur les systèmes de défense d'origine maternelle, initialement présents dans l'œuf, qui subissent d'importantes modifications au cours du développement embryonnaire, pour ensuite aborder en troisième partie, le rôle des structures extra-embryonnaires dans la mise en place de systèmes de protection relais. II - Synthèse bibliographique

A - Introduction générale : formation et évolution des structures de l'œuf de poule, de la ponte à l'éclosion



Figure 1 : Représentation des différentes structures basiques et extra-embryonnaires de l'œuf de poule non fertilisé (à gauche) ou fertilisé (à droite ; 8^{ème} jour d'incubation ou ED8)

L'œuf fraichement pondu est composé de quatre structures élémentaires qui sont formées dans l'appareil reproducteur de la poule à sa maturité sexuelle (17 semaines) : le jaune, la membrane vitelline, le blanc et la coquille (**Figure 1**). Ces structures acellulaires servent de source de nutriments et d'énergie pour l'embryon (Romanoff, 1960) (**Figure 2**). Elles contiennent également des molécules actives telles que des protéines antibactériennes (Réhault-Godbert *et al.*, 2011). Au cours du développement de l'embryon, des compartiments extra-embryonnaires supplémentaires apparaissent pour maintenir les fonctions vitales de l'embryon comme la digestion ou la respiration. Il s'agit des sacs vitellin, amniotique et allantoïque (**Figures 1 et 2**).

Cette première partie a pour but de définir la composition et la formation de chacune de ces structures au sein de l'œuf, et en quoi elles sont essentielles à l'embryon pour son développement. Elle n'abordera que peu l'embryon de poule en lui-même, mais se focalisera sur son environnement, matière inerte et tissus vivants (**Figures 1 et 2**), sur lesquels il s'appuie pour se développer en 21 jours.



Figure 2 : Schéma illustrant les différents rôles des structures basiques et extra-embryonnaires de l'œuf au cours du développement embryonnaire chez l'oiseau (Romanoff et Romanoff, 1967).

1 - Les structures primaires de l'œuf

La formation de l'œuf dure environ 24 heures à partir de l'ovulation (Figure 3). Une fois libéré par l'ovaire, l'ovocyte entouré de la membrane vitelline interne (Figure 4), va pénétrer dans l'oviducte et transiter dans les différents compartiments de l'appareil reproducteur, où seront déposés successivement les autres constituants de l'œuf : la membrane vitelline externe dans l'infundibulum, le blanc dans le magnum, les membranes coquillères interne et externe dans l'isthme, et la coquille dans l'utérus. Le jaune, le blanc et la coquille d'œuf représentent respectivement 29%, 61,5% et 9,5% du poids total de l'œuf non embryonné (Nys et Guyot, 2011).



Figure 3 : Formation de l'œuf dans l'appareil reproducteur de la poule (schéma d'après Hincke *et al.*, 2012). A droite sont indiquées les compositions du jaune, du blanc, de la coquille (Li-Chan et Kim, 2008) et de la membrane vitelline (Chung *et al.*, 2010) d'œuf de poule.

1.1 - Le jaune ou vitellus

Le jaune est la première structure de l'œuf qui se forme (**Figure 3**). Il apparait au cours du processus de la vitellogenèse dans l'ovaire de la poule, lorsque le vitellus vient s'accumuler dans l'ovocyte. L'œuf de poule est ainsi qualifié de télolécithe, car il possède des réserves importantes de vitellus, qui constituent une source d'énergie pour l'embryon au cours de l'incubation. Les données exposées ici sont principalement extraites du chapitre de l'encyclopédie de la Reproduction sur la vitellogenèse et les protéines du jaune chez les oiseaux (Guyot *et al.*, 2017).



Figure 4 : Structure du follicule ovarien et de l'ovocyte chez la poule (Réhault-Godbert and Guyot, 2017)

- Formation -

La croissance de l'ovocyte (Figure 4) se déroule en 3 phases : 1) une phase dite « précoce » qui peut durer jusqu'à plusieurs années, 2) une phase de croissance lente de quelques mois, où s'accumulent des couches de vitellus dites « blanches », qui contiennent plus de protéines, et des couches dites « jaunes », comprenant plus de lipides, et enfin 3) une phase de croissance rapide, où sont transférées de grandes quantités de vitellus « jaune », 6 à 11 jours avant l'ovulation.

A l'exception des immunoglobulines (**Igs**) maternelles, les composés du jaune sont essentiellement sécrétés par le foie et transportés dans le jaune, *via* le système sanguin, majoritairement sous forme de **VLDL** (lipoprotéines de très basse densité). Ces dernières sont

composées de triglycérides et d'esters de cholestérol, le tout entouré d'une couche de phospholipides, de cholestérols et d'apoprotéines (principalement l'apolipoprotéine B ou **APOB**, et l'apovitellenine ou **APOV1**) (Noble et Cocchi, 1990). La reconnaissance et l'entrée des VLDL et des vitellogénines (**VTG**), les principaux précurseurs protéiques du jaune, dans le follicule, se font *via* un mécanisme d'endocytose impliquant des récepteurs spécifiques (Noble et Cocchi, 1990).

- Composition -

Le jaune contient 48% d'eau, 34% de lipides (62% de triglycérides, 33% de phospholipides et moins de 5% de cholestérols, soit la quasi-totalité des lipides de l'œuf), 16% de protéines, 1,5% de minéraux et 0,5% de glucides (**Figure 3**) (Li-Chan et Kim, 2008). Il forme une émulsion de lipoprotéines de basse et haute densités (68% et 16% respectivement), de livetines et d'autres protéines solubles (10%), et également de phosvitines (4%), auxquelles s'ajoutent de nombreux autres constituants (vitamines, minéraux et ions). L'ensemble apporte nutriments et énergie à l'embryon au cours du développement, et au poussin dans les premiers jours qui suivent l'éclosion.

Deux-cent seize protéines ont pu être identifiées dans le jaune (Mann et Mann, 2008; Farinazzo *et al.*, 2009), avec un certain nombre de protéines abondantes comprenant : VTG1, 2, 3, APOB, APOV1, l'albumine sérique (**ALB**), l'ovalbumine (**OVAL**), l'immunoglobuline Y (**IgY**), l'avidine (**AVD**), l'ovotransferrine (**TF**), la transthyrétine (**TTR**), la cystatine (**CST3**), l'alpha-2-macroglobuline (**A2M**), l'apolipoprotéine A1 (**APOA1**) et une protéine prédite comme étant une bêta-microséminoprotéine (**BMSP**). Certaines de ces protéines sont impliquées dans le métabolisme lipidique (VTG1, 2 et 3, APOV1, APOB, ALB, APOA1), le système immunitaire (IgY, AVD, TF, CST3, BMSP), ou encore la nutrition de l'embryon (OVAL, VTG1, 2 et 3).

1.2 - La membrane vitelline

La membrane vitelline est la seconde structure de l'œuf à apparaître. Elle forme une matrice protéique extracellulaire tout autour de l'ovocyte contenant le jaune, et le sépare ainsi physiquement du blanc d'œuf (**Figure 4**).

- Formation -

D'une épaisseur de 10 μ m, la membrane vitelline se décompose en deux couches formant des réseaux de fibres protéiques : une couche interne qui fait face à l'ovocyte et une couche externe du côté du blanc d'œuf (Li-Chan et Kim, 2008). La membrane interne est l'équivalent chez les mammifères de la zone pellucide (Waclawek *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 1999). Ses constituants sont sécrétés dans l'ovaire par les cellules de la granulosa qui entourent l'ovocyte (**Figure 4**), et par le foie, tout comme les composés du jaune (voir section A1.1). A l'inverse, la membrane interne se forme après l'ovulation, dans l'infundibulum, le premier segment de l'oviducte qui est également le siège de la fécondation (**Figure 3**).

- Composition -

La membrane vitelline est constituée de 81,6% de protéines, 10% d'eau, 6,5% de glucides, 1,3% de lipides et 0,6% de minéraux (**Figure 3**) (Chung *et al.*, 2010). De par leurs fonctions respectives, les membranes externe et interne diffèrent dans leur composition. La membrane interne qui est le site de la fertilisation de l'ovocyte, contient principalement des protéines **ZP** pour zone pellucide (97% du contenu total en protéine de la membrane), qui participent au processus de fertilisation en permettant l'adhésion des spermatozoïdes à l'ovocyte (Waclawek *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 1999; Okumura *et al.*, 2004). La membrane externe, quant à elle, est composée d'environ 43% d'ovomucine, 37% de lysozyme (**LYZ**) et 20% de protéine de la membrane vitelline externe n°1 (**VMO1**) (Kido et Doi, 1988). La membrane vitelline assure une protection physique et chimique (molécules antimicrobiennes : LYZ, VMO1) afin de protéger l'ovocyte fertilisé et empêcher les pathogènes d'atteindre le jaune.

Plus récemment, une étude du protéome de la membrane totale a mené à l'identification de 137 protéines, dont 4 protéines majoritaires : OVAL (~ 75%), LYZ (~ 21%), VMO1 (~ 1%), et la bêta-défensine aviaire 11 (**AvBD11**), initialement appelée la protéine de la membrane vitelline externe n°2 (**VMO2**) (~ 1%) (Mann, 2008), et un ensemble de protéines mineures dont les fonctions prédites sur la base d'homologie avec les autres espèces animales restent encore à confirmer dans le modèle oiseau.

1.3 - Le blanc ou albumen

Le blanc déposé autour de la membrane vitelline constitue la réserve d'eau de l'œuf (Figure 3). Il concentre en outre une grande partie des protéines de l'œuf, et surtout des

protéines et peptides antibactériens, des antiprotéases et des chélateurs de vitamines et d'ions métalliques.

- Formation -

La formation du blanc se déroule dans le magnum (Figure 3). Les protéines sont produites par les cellules des glandes tubulaires qui tapissent 80% de l'intérieur du magnum (Edwards *et al.*, 1976). Pour une poule mature, cette production est régulée par les hormones stéroïdiennes qui agissent directement sur les gènes codants pour les protéines concernées (Palmiter, 1972). Ainsi, l'œstrogène induit la production d'OVAL, de TF, de l'ovomucoïde (SPINK7) et de LYZ, alors que la progestérone induit la production d'AVD. En seulement 2 à 4 heures, les protéines synthétisées au préalable par les cellules sont sécrétées dans la lumière du magnum, et déposées autour de la membrane vitelline. A ce stade, le blanc est peu hydraté (15 g sur 30 g final) ; il se présente sous la forme d'une masse de protéines gélifiée (Sauveur, 1988). Le phénomène de « plumping » qui finalise l'hydratation du blanc, se déroule dans les 6 à 7 premières heures passées dans l'utérus, une fois les membranes coquillères déposées au préalable dans l'isthme (Figure 3).

- Composition -

Le blanc est composé de 88,1% d'eau, 10,5% de protéines, 0,8 % de glucides, 0,5% de minéraux et 0,1% de lipides (Figure 3), pour un volume total d'environ 35 à 40 mL (Li-Chan et Kim, 2008). Il sert de source principale d'eau et de protéines pour l'embryon, lors du développement (Romanoff, 1960; Romanoff et Romanoff, 1967). Plus de 300 protéines ont été identifiées dans le blanc, dont huit comptent pour environ 90% du contenu en protéines : OVAL (54%), TF (12%), SPINK7 (11%), l'ovoglobuline G2 (BPIFB2/G2/TENP) (4%), l'ovomucine (3,5%), LYZ (3,4%), l'ovoinhibiteur (SPINK5) (1,5%) et l'ovoglyprotéine (**ORM1**) (1%) (Mann, 2007; Li-Chan et Kim, 2008; D'Ambrosio et al., 2008; Mann et Mann, 2011; Omana et al., 2011; Qiu et al., 2013; Liu et al., 2013). Si la fonction précise d'OVAL reste encore méconnue, l'hypothèse la plus probable serait qu'elle sert de source d'acides aminés pour l'embryon (Da Silva et al., 2015, Annexe 3). TF, LYZ, l'ovomucine, SPINK5 et SPINK7 participent à l'activité antibactérienne du blanc d'œuf (Ardelt et Laskowski, 1985; Baron et al., 1999, 2014; Chen et al., 2005b; Nakimbugwe et al., 2006; Bourin et al., 2011). En outre, SPINK5 et 7 sont des inhibiteurs de protéases majeurs du blanc d'œuf (Saxena et Tayyab, 1997), dont le rôle serait de protéger les protéines du blanc de la protéolyse, jusqu'à leur assimilation par l'embryon (Sugimoto et al., 1999; Shinohara et al., 2005). Par

conséquent, en plus de son rôle dans la nutrition de l'embryon, le blanc assurerait également d'autres fonctions *via* des protéines aux activités biologiques diverses (molécules antibactériennes, inhibiteurs de protéases, etc.).

1.4 - La coquille

L'étape finale dans la formation de l'œuf est le dépôt de la coquille, un processus qui dure environ 17 heures (**Figure 3**). Elle vient entourer toutes les autres structures de l'œuf, et forme la première barrière physique protégeant l'œuf contre les agressions physiques et microbiennes. La coquille comporte différentes couches dont la cuticule et la couche palissadique ancrées directement sur les membranes coquillières grâce aux noyaux mamillaires (**Figure 5**). Les pores qui la traversent de part en part régulent les échanges d'eau et de gaz avec l'extérieur, et sa composition riche en calcium permet un apport pour la formation du squelette de l'embryon lors de son développement (Romanoff, 1960; Freeman et Vince, 1974).



Figure 5 : Représentation schématique de la coquille d'œuf de poule (schéma d'après Hincke et al., 2012).

- Formation -

Les constituants des membranes coquillères sont produits et sécrétés par les cellules de l'isthme (Figure 3) (Du *et al.*, 2015). Les noyaux mamillaires qui sont ancrés sur la membrane coquillère externe dans l'isthme distal, sont les points d'initiation de la minéralisation de la coquille dans l'utérus. La composition du fluide utérin, riche en calcium et en ions bicarbonates, favorise la précipitation des cristaux de calcite (carbonate de calcium CaCO₃)

formant la couche palissadique (Li-Chan et Kim, 2008; Nys *et al.*, 2010; Hincke *et al.*, 2012). Ces derniers s'organisent en colonnes et se développent vers l'extérieur de l'œuf en suivant un axe perpendiculaire aux membranes coquillières, guidés par les protéines de la matrice organique (Marie *et al.*, 2015). L'inhibition de la croissance des cristaux est un processus encore mal connu, même si la matrice organique y joue un rôle essentiel (Hincke *et al.*, 2012; Marie *et al.*, 2015). Enfin, le dépôt de la cuticule dans le vagin finalise le processus de formation de l'œuf.

- Composition -

En tenant compte des membranes coquillières, la coquille contient 95% de minéraux, 3,3 à 3,5% de matière organique et 1,6% d'eau, pour une épaisseur totale de 0,3 mm environ (Li-Chan et Kim, 2008). Elle est composée de 94% de calcite (CaCO₃), soit 37,5 % de calcium, mais elle contient peu d'oligoéléments, et aucun lipide. La matrice organique se répartit entre les protéines des membranes coquillères et celles contenues dans la partie minéralisée. Les membranes coquillières sont ainsi composées de 10% de fibres de collagène (types I, V, et X) entrelacées et reliées par un ensemble de protéines et glycoprotéines (70% à 75%) (Hincke et al., 2012). Plus de 700 protéines ont été identifiées dans cette matrice organique (Mann et al., 2006; Marie et al., 2015), dont certaines ont été identifiées au préalable dans les autres structures de l'œuf (OVAL, LYZ et TF). D'autres, synthétisées uniquement par l'isthme ou l'utérus, sont spécifiques de la coquille : les ovocléidines 17 et 116 (OC-17, OC-116), et les ovocalyxines 21, 25, 32 et 36 (OCX36), qui sont impliquées dans la biominéralisation de la coquille (Tian et al., 2010; Nys et al., 2010). En outre, certaines de ces protéines sont retrouvées dans la cuticule, composée à 90% de protéines, 5% de sucres et 3% de minéraux (Rose-Martel et al., 2012). C'est aussi dans cette dernière couche que sont concentrés les deux tiers des pigments qui donne la couleur de la coquille.

2 - Les structures extra-embryonnaires de l'œuf

Les sacs vitellin, amniotique et allantoïque apparaissent dès les premiers stades du développement (**Figure 6**). Ils sont directement dérivés du blastoderme (feuillets embryonnaires), et possèdent chacun des propriétés distinctes en accord avec leurs fonctions au cours de l'incubation. Ils évoluent dans l'œuf en interaction avec les milieux intérieur et extérieur de l'œuf (Romanoff, 1960).



Figure 6 : Frise chronologique illustrant le développement embryonnaire chez la poule. En bleu : début de la formation des structures extra-embryonnaires ; en orange : évènements marquants en lien avec les structures extra-embryonnaires. Les flèches orange indiquent le terme du processus.

Les données présentées dans cette partie sont extraites des ouvrages de A. Romanoff (Romanoff, 1960) et de B.M. Freeman et M.A. Vince (Freeman et Vince, 1974) sur le développement embryonnaire chez les oiseaux. Les références complémentaires annotées correspondent à des résultats postérieurs à ces revues.

2.1 - Le sac vitellin

Le sac vitellin recouvre progressivement la totalité du jaune en s'appuyant sur la membrane vitelline. Il assure différentes fonctions vitales pour l'embryon dont la digestion et le transport des nutriments du jaune vers l'embryon, la production de protéines plasmatiques, et l'hématopoïèse (Yadgary *et al.*, 2014). Il permet, en outre, la respiration de l'embryon, dans les premiers jours de l'incubation, avant le développement d'autres structures relais. L'important réseau sanguin qui se développe à sa surface est l'élément essentiel à la réalisation de toutes ces actions.



Figure 7 : Illustration de la croissance du sac vitellin à la surface du jaune aux 2^{ème} et 4^{ème} jours d'incubation chez la poule (ED2 et 4) (Romanoff, 1960)

- Formation -

Les premières divisions cellulaires entrainent l'apparition des aires pellucide et vitelline, qui composent le sac vitellin (Figure 7). Ce dernier se présente sous la forme d'une membrane cellulaire vascularisée, dérivée du mésoderme et de l'endoderme (parties externe et interne de la membrane respectivement). Elle se développe à la surface du jaune d'œuf, directement sous la membrane vitelline, et progresse unilatéralement vers le pôle végétal de l'œuf qu'elle atteint au 5^{ème} jour d'incubation (ED5). Ce processus d'extension entraine la
disparition progressive de la membrane vitelline qui sert de matrice à la formation du sac vitellin (Haas et Spratt, 1976; Yoshizaki *et al.*, 2000) (voir section B3.2). Le sac vitellin est en outre le support d'un important réseau sanguin, appelé l'aire vasculaire, qui recouvre la totalité du sac vitellin à ED14-15 (Figure 7). Ce réseau est relié au système sanguin de l'embryon et se développe au sein du mésoderme. En parallèle, sur la partie intérieure du sac, l'endoderme subit d'importantes modifications qui aboutiront à la formation de structures proches de celles de l'intestin (replis, villosités, cellules musculaires, épithélium, etc.) (Bauer *et al.*, 2013; Yadgary *et al.*, 2013).

Quelques jours avant l'éclosion, le sac vitellin commence à se résorber dans l'abdomen de l'embryon (Noble et Cocchi, 1990). Le sac vitellin et le jaune résiduel constituent alors 18% du poids du poussin à l'éclosion ; ils apportent l'énergie essentielle au poussin dès les premiers jours de vie. La résorption complète du sac vitellin et la cicatrisation de l'ombilic à l'éclosion constituent des critères majeurs garantissant la santé et le bon développement du poussin (Tona *et al.*, 2003).

- Composition et fonctions -

La structure particulière du sac vitellin lui permet d'assurer plusieurs fonctions, dont l'absorption et la digestion des nutriments du jaune, pour fournir l'énergie nécessaire au développement et à la croissance de l'embryon. En effet, le sac vitellin est le principal responsable de la lipolyse et de la protéolyse des composés du jaune, en atteste la présence d'ARNm codants pour des protéases et des transporteurs de nutriments dans ses cellules (Yadgary *et al.*, 2011, 2014; Speier *et al.*, 2012). En outre, des vésicules de jaune ont été observées dans les cellules du sac vitellin dès les premiers jours d'incubation, ce qui témoigne de la mise en place rapide du processus d'absorption (Bauer *et al.*, 2013). Initialement, il s'agit d'un mécanisme d'absorption non-spécifique (endocytose massive de jaune), qui devient plus précis au cours de l'incubation avec l'apparition de récepteurs spécifiques sur l'endoderme du sac. Les constituants digérés servent dans un premier temps à la croissance du sac, et plus tard, ils sont transportés vers l'embryon *via* l'aire vasculaire (Bauer *et al.*, 2013).

Le réseau sanguin du sac vitellin assure non seulement le transport de nutriments vers l'embryon, mais également sa respiration, jusqu'à l'apparition de la membrane chorioallantoïque à ED5-6 (Figure 6) (voir section A2.3). En effet, le jaune étant moins dense que le blanc au début de l'incubation, il flotte à sa surface. L'aire vasculaire est alors projetée

contre la membrane coquillère, ce qui facilite les échanges gazeux avec l'extérieur. Cette aire est le siège principal de l'hématopoïèse, pendant la 1^{ère} moitié du développement, et de la synthèse de facteurs de coagulation et de protéines plasmatiques (APOB, APOA1, les apolipoprotéines A4 (**APOA4**) et C3 (**APOC3**), l'alpha-foetoprotéine (**AFP**), **ALB**) (Palazón et Rodríguez-Burgos, 1993; Bauer *et al.*, 2013; Yadgary *et al.*, 2014).

2.2 - Le sac amniotique

Le sac amniotique forme une poche autour de l'embryon (Figure 6), et le protège contre les chocs mécaniques, l'adhésion aux autres structures extra-embryonnaires et la déshydratation.



Figure 8 : Formation des structures extra-embryonnaires dans l'œuf de poule aux $2^{\text{ème}}$ et $3^{\text{ème}}$ jours d'incubation (ED2 et 3) vue en coupe sagittale (Pattern, 1920). Le chorion et la membrane du sac allantoïque fusionnent à partir d'ED5-6 pour former la membrane chorioallantoïque (en italique).

- Formation et structure -

La membrane amniotique aussi appelée amnios apparaît à ED2 et recouvre entièrement l'embryon à ED3 (**Figure 8**). Il s'agit d'une membrane très fine et élastique. La partie externe de l'amnios est dérivée du mésoderme, et se différencie progressivement en une couche cellulaire de muscle lisse, dont la contraction maintient le contenu du sac en mouvement à partir d'ED5. A l'inverse, la partie interne de l'amnios est dérivée de l'ectoderme, et prolonge celui de l'embryon. L'amnios croît de façon importante entre ED9 et ED14, puis son poids se stabilise. Pour faciliter la croissance de l'embryon lors de la dernière semaine d'incubation, la membrane s'étire. Le fluide amniotique (**AmF**) commence à remplir la cavité amniotique à partir d'ED3-4. Son origine reste encore inconnue, même si des hypothèses avancent la possible sécrétion des composés par la membrane amniotique et/ou leur transport depuis l'aire pellucide. Son volume augmente progressivement lors de l'incubation, surtout lors de la rupture de la connexion séro-amniotique (**Figure 8**), qui va permettre le passage des protéines du blanc dans le sac amniotique à partir d'ED12 chez la poule (Geelhoed et Conklin, 1966; Carinci et Manzoli-Guidotti, 1968; Sugimoto *et al.*, 1999) (**Figure 6**). A partir d'ED13, l'embryon commence à absorber oralement l'AmF contenant le blanc d'œuf, ce qui entraine la diminution rapide du volume de fluide.

A l'éclosion, la totalité du sac amniotique dégénère et reste dans l'œuf.

- Composition et fonctions -

Le rôle principal du sac amniotique est de maintenir l'embryon dans un milieu aqueux pour éviter les chocs mécaniques et la déshydratation. Pour cela, avant le transfert du blanc, l'AmF est composé d'environ 99% d'eau, à laquelle s'ajoutent des protéines (environ 0,02-0,05 g/L), ainsi qu'une concentration élevée en ions chlorure, responsable de l'influx d'eau dans le sac (Baggott, 2001). Le transfert du blanc à partir d'ED12 modifie cet équilibre, en augmentant notamment la quantité de protéines dans le compartiment (jusqu'à 240 g/L à ED16), ce qui diminue la concentration en eau qui passe de 99 à 75% (Geelhoed et Conklin, 1966; Carinci et Manzoli-Guidotti, 1968). A partir de ce stade, l'AmF devient une source importante de protéines pour l'embryon qui va ingérer oralement le mélange des deux fluides. Des protéines du blanc ont également été retrouvées non digérées au sein même des organes de l'embryon, attestant du transfert de ces protéines sous forme intacte (Sugimoto et al., 1999; Shinohara et al., 2005). La présence de nombreuses antiprotéases dans le blanc d'œuf (Saxena et Tayyab, 1997) explique très probablement que les profils protéiques du blanc au cours de l'incubation ne sont que peu modifiés (Liu et al., 2013; Guyot et al., 2016b). Cependant, l'impact exact du transfert du blanc dans le sac amniotique sur ses composés n'a encore jamais été exploré.

2.3 - Le sac allantoïque

Le sac allantoïque est le dernier compartiment extra-embryonnaire à apparaître (Figure6). Il se présente sous la forme d'un appendice relié à l'intestin, qui croît progressivement au

cours du développement embryonnaire (Figure 9). Il sert principalement de lieu de stockage pour les déchets du métabolisme de l'embryon, et sa fusion avec le chorion permet la respiration de l'embryon et la solubilisation du calcium de la coquille.



Figure 9 : Illustration de la formation du sac allantoïque dans l'œuf de poule aux $2^{\text{ème}}$ et $3^{\text{ème}}$ jours d'incubation (ED2 et 3) vue en coupe sagittale (Pattern, 1920).

- Formation et structure -

A la fin d'ED2, la partie postérieure de l'embryon en amont de la queue, commence à s'invaginer (Figure 9). Cette invagination forme à la fin d'ED3 une petite structure appelée le sac allantoïque, avec une couche cellulaire interne composée d'endoderme - directement reliée à l'endoderme de l'embryon, et une couche cellulaire externe composée de mésoderme vascularisé. La croissance du sac est influencée par la position de l'embryon et des autres structures de l'œuf, mais aussi par le flux d'excrétion (urine) en provenance des mésonéphros (reins embryonnaires) (Everaert *et al.*, 2011). Par conséquent, à ED11-12, le sac allantoïque recouvre déjà la totalité des autres structures de l'œuf. Ce contact étroit entre les membranes extra-embryonnaires entraine la fusion de la membrane allantoïque avec l'amnios, et avec le chorion (Figures 8 et 9).

Le fluide allantoïque (AIF) qui remplit la cavité de l'allantoïde est donc issu en grande partie des excrétions de l'embryon. L'accès à l'eau restant très difficile pour l'embryon jusqu'à ED3 à cause de la membrane vitelline et des feuillets embryonnaires, l'eau contenue dans le blanc est transférée vers le jaune d'œuf, grâce à un gradient osmotique établi au niveau du blastoderme (Baggott, 2001; Baggott *et al.*, 2002; Latter et Baggott, 2002) (Figure 10). L'eau transférée dans le jaune s'accumule sous l'embryon et forme le fluide subembryonnaire, qui isole l'embryon de l'acidité et des enzymes du jaune, et lui fournit une source d'eau pour assurer son métabolisme. L'eau issue du métabolisme embryonnaire est ensuite excrétée par les mésonéphros directement dans le sac allantoïque (urines), et forme l'AIF. Par conséquent, la suppression du fluide sub-embryonnaire entraine *in fine* une réduction du volume d'AIF.



Figure 10 : Formation du fluide subembryonnaire dans l'œuf de caille (d'après Latter et Baggott, 2002). L'eau du blanc est tranférée dans le jaune *via* un gradient osmotique établi au niveau du blastoderme, par un échangeur Na^+/H^+ (NHE), des ATPAases (Na^+/K^+ ATPase et V-ATPase) et une anhydrase carbonique (CA). La forte concentration en ion sodium dans le fluide subembryonnaire entraine un influx d'eau du blanc dans le jaune.

- Composition et fonctions -

Le sac allantoïque sert donc principalement de zone de stockage pour les déchets métaboliques de l'embryon. Il concentre de l'azote, de l'ammonium, de l'urée et de l'acide urique (Baggott, 2001), qui, à fortes doses, seraient toxiques pour l'embryon.

Le sac allantoïque participe aussi à l'équilibre acido-basique de l'œuf : 1) *via* le stockage des protons du métabolisme embryonnaire, ce qui acidifie son pH (*Boutilier et al.*, 1977; Everaert

et al., 2011), et d'autre part 2) *via* le stockage d'ions bicarbonates, qui seront transférés par la suite vers le sac amniotique pour compenser la chute du pH de l'AmF, dans le but de maintenir un pH stable autour de l'embryon (Boutilier *et al.*, 1977). La fusion des membranes allantoïque et amniotique au début de la seconde moitié de l'incubation, favoriserait ces échanges entre les deux compartiments (Busch *et al.*, 1997) (Figures 8 et 9), grâce au réseau sanguin très développé à la surface du sac allantoïque suite à sa fusion avec le chorion.

- La membrane chorioallantoïque -

A partir d'ED5-6, le mésoderme du sac allantoïque commence à fusionner avec celui du chorion, une membrane extra-embryonnaire issue du même tissu que l'amnios, et qui se développe en contact direct avec la coquille (Figures 8 et 9). La membrane chorioallantoïque recouvre toutes les autres structures internes de l'œuf à ED11-12, et 98 % de la surface totale des membranes coquillières (Figure 6).

Différentes fonctions ont été associées à cette membrane (Figure 11) : l'épithélium allantoïque absorbe les ions contenus dans l'AlF ; le mésoderme issu de la fusion des deux membranes forme un réseau sanguin à l'interface avec la coquille ; et l'épithélium du chorion se différencie en cellules capables de solubiliser le calcium de la coquille (Gabrielli et Accili, 2010). Dès la fusion, le système circulatoire se met en place et permet le transport des composés absorbés par la membrane vers l'embryon. Les ions sodium (Na⁺) et chlorure (Cl⁻) sont transportés de façon sélective par les cellules de l'épithélium allantoïque vers la circulation sanguine (Everaert et al., 2011). Le gradient osmotique alors formé entre l'AIF et le plasma sanguin, induit un transfert d'eau depuis la cavité allantoïque vers le plasma sanguin, à l'inverse du transfert d'eau formant le fluide sub-embryonnaire (Figure 10). De l'autre côté de la membrane, l'épithélium du chorion présente une structure différente de celle de l'épithélium allantoïque. Les cellules à sa surface adhèrent à la membrane coquillère interne (Figure 11), et des extensions cytoplasmiques s'étendent jusqu'à atteindre les réserves de calcium concentrées dans la coquille (Gabrielli et Accili, 2010). Le calcium de la coquille est alors solubilisé selon un mécanisme précis (voir section B1.3), puis transféré vers le réseau sanguin pour être transporté jusqu'à l'embryon, sous forme de phosphate de calcium, pour la minéralisation de son squelette.



Figure 11 : Observation au microscope d'une coupe transversale de la membrane chorioallantoïque colorée au bleu de Toluidine (Gabrielli *et al.*, 2010). Les fonctions associées à chaque sous-couche de la membrane ont été annotées en gris. AIF : fluide allantoïque.

A ED11-12, la membrane chorioallantoïque recouvre toutes les structures internes de l'œuf, ce qui inclut le blanc d'œuf au niveau du pôle végétal. Chez la caille, il a été démontré que cette section de la membrane avait la capacité d'endocyter de grandes quantités de blanc, ce qui pourrait également être une voie d'assimilation des composés du blanc, voire une voie de transfert du blanc dans le sac amniotique (Yoshizaki *et al.*, 2000).

B - 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 toxiinfections 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 μ m), 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 μ m de long sur 10 à 30 μ m 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).



100 µm

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, entrainant 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 entraine 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 entrainer 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 et al., 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 (Humain)	(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 et al., 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 et al., 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-microséminoprotéine-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, entrainant 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 extraembryonnaires 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 fraichement 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 CO_2 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 $12^{\text{ème}}$ jour (Guyot *et al.*, 2016b). Cette différence s'explique par le métabolisme respiratoire de l'embryon (diffusion de CO₂ dans l'œuf) qui entraine 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**) entraine 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 $4^{\text{ème}}-5^{\text{ème}}$ 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 chaines 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 μ g/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 μ g/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 nonspécifiques, 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 extraembryonnaires, 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'AlF (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 subembryonnaire, 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 (AIF)

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 extraembryonnaires 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 entrainent 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 entrainé des changements important 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'AlF. 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'AlF 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.

III - Objectifs de thèse

Lors de la formation de l'œuf de poule, nous avons vu qu'un certains nombres de défenses innées sont mises en place pour protéger le futur embryon contre les pathogènes. Le système immunitaire adaptatif de l'embryon n'étant actif qu'après éclosion, ce dernier s'appuie sur les ressources que lui procurent les constituants et les structures de l'œuf pour se protéger. Ainsi, la coquille, le blanc, la membrane vitelline et le jaune participent tous à la défense de l'œuf et de l'embryon, à différents niveaux, autant moléculaires que physicochimiques. Cependant la fertilisation et la mise en incubation de l'œuf entraine une altération, voire une dégradation de ces structures ou fluides, ce qui, sans système relais, rendrait l'embryon plus vulnérable face aux infections. Les compartiments extraembryonnaires qui apparaissent progressivement avec l'embryon, ajoutent un niveau supplémentaire dans sa protection. Ils servent notamment de supports physiques pour le déplacement et la migration des cellules immunitaires innées de l'embryon. En outre, les transferts d'eau et de composés du jaune et du blanc dans les sacs amniotique, allantoïque et vitellin, peuvent également entrainer une relocalisation des défenses initialement présentes dans l'œuf, dont les protéines et les peptides antibactériens du blanc et de la membrane vitelline. Comme le fluide amniotique chez l'humain, les fluides extra-embryonnaires de l'œuf de poule auraient par conséquent un rôle majeur dans la protection de l'embryon.

Dans ce contexte, et pour mieux comprendre l'évolution des défenses innées de l'œuf au cours du développement embryonnaire, nous avons étudié les propriétés et la composition protéique des fluides amniotique (AmF) et allantoïque (AlF) de l'œuf de poule, à différents stades de l'incubation.

- Objectif 1 -

A l'inverse du jaune et du blanc d'œuf, la bibliographie est peu fournie sur les propriétés de l'AmF et de l'AlF, ainsi que leur évolution au cours de l'incubation. Les données existantes datent pour certaines d'il y a plus de 50 ans. Le premier objectif a donc été de réactualiser et de compléter ces données, en mesurant certains des paramètres physicochimiques des fluides, à différents stades de l'incubation (Figure 24). Les stades sélectionnés, soit ED8, 10, 11, 12, 14 et 16, couvrent l'ensemble des périodes clés associées à la formation et la disparition de l'AmF et de l'AlF, dont le transfert du blanc dans le sac amniotique à ED12. Une mise au point préalable a été effectuée sur les phases de stockage et d'incubation des œufs, notamment pour homogénéiser les stades du développement, et éliminer les œufs de l'analyse hors-normes (clairs, microfêlés. etc.).

65

	1 - Acquérir de nouvelles données sur l'évolution des fluides au cours de l'incubation		Stockage et incubation des œufs embryonnés		
OBJECTIFS		 3 jours de stockage (synchroniser le développement des embryons) et 21 jours d'incubation standard Sélection des œufs : détection et élimination des œufs clairs (mirage), microfêlés (Acoustic Egg Tester), et hors normes (tailles et poids) 			
			Prélèvements		
		 Prélèvements de l'AmF, de l'AIF et du blanc d'œuf (ED8, 10, 11, 12, 14 et 16) Sélection des embryons : détection et élimination des embryons non synchronisés (table d'Hamburger et Hamilton, 1951) et sexage par PCR 			
		Mesure des paramètres physicochimiques			
		Elimination des contaminants (cellules, méconium, etc.) par centrifugation			
		GIE	Mesures : volume, pH, osmolalité et concentration protéique		
	2 - Analyser les grandes fonctions des fluides et identifier des candidats antibactériens	Identification des protéines et analyse fonctionnelle			
		 Visualisation des profils protéiques des fluides par SDS-PAGE Pools des fluides homogènes selon leurs profils protéiques et leurs paramètres physicochimiques (autant de mâles que de femelles), et identification des protéines par spectrométrie de masse (à ED11 pour l'AmF et ED16 pour l'AIF) Prédiction des fonctions par Gene Ontology (identification de candidats antibactériens) 			
	3 - Evaluer le potentiel antibactérien des fluides		Analyse des activités antibactériennes et protéolytiques		
	au cours de l'incubation		 Mesure des activités protéolytiques par zymographie et test en solution Mesure des activités antibactériennes par test de diffusion en gélose (fractions totales et enrichies en molécules antibactériennes) 		
	4 - Déterminer les spécificités moléculaires du modèle oiseau	Comparaison avec les autres espèces ovipares et vivipares			
		 Etude de la répartition des protéines et des peptides au sein des animaux et des champignons par reconstruction phylogénétique Comparaison du protéome de l'AmF de poule avec celui de l'humain 			

Figure 24 : Résumé des objectifs de thèse et des stratégies appliquées pour analyser les fluides amniotique (AmF) et allantoïque (AlF) de l'œuf de poule, à différents stades de l'incubation (ED8-16)

Après avoir éliminé les contaminants des fluides (cellules, méconium, etc.), les mesures de volume, de pH, d'osmolalité et de profil d'absorbance ont mis en évidence des différences non seulement entre les fluides, mais aussi entre les stades d'incubation. Par exemple, le transfert du blanc dans l'AmF et l'accélération du métabolisme de l'embryon lors de la seconde moitié de l'incubation, entrainent une chute significative du pH et de l'osmolalité dans les deux fluides. Nous avons vu précédemment que ces changements de pH

pouvaient non seulement affecter la croissance bactérienne, mais aussi moduler l'activité des protéines antibactériennes de l'œuf (LYZ, TF, etc.).

- Objectif 2 -

Les transferts des protéines du blanc et du jaune d'œuf entre les structures extraembryonnaires facilitent leur assimilation par l'embryon, mais peut également induire la relocalisation, l'activation ou la dégradation de précurseurs antibactériens. Nous avons donc analysé la composition, et plus particulièrement le contenu en protéines des deux fluides pour identifier les protéines de l'AmF et de l'AlF, les classer par grandes fonctions biologiques, et faire ressortir des candidats potentiellement impliqués dans la défense innée de l'œuf (Figure 24). Une première analyse par SDS-PAGE nous a permis de visualiser les profils protéiques des deux fluides pour les six stades prélevés, pour cibler les stades les plus pertinents à analyser par spectrométrie de masse. Alors que la composition de l'AlF évolue sensiblement d'ED8 à ED16, la composition de l'AmF subit un changement plus radical à ED12, avec le transfert du blanc. Par conséquent, deux stratégies distinctes ont été mise en place pour l'analyse de chacun des fluides : 1) la première visait à caractériser le protéome de l'AmF à ED11, pour s'affranchir des protéines du blanc, et ainsi identifier uniquement les protéines intrinsèques du fluide; 2) la deuxième, avait pour but de comprendre les différences observées dans l'AlF au cours de l'incubation, à l'aide d'une étude comparée entre les stades ED11 et ED16. Cette dernière est actuellement en cours de réalisation dans notre équipe. Néanmoins, une première approche globale réalisée sur l'AlF a révélé la présence de nombreuses protéines associées au transport et au métabolisme des vitamines, des lipides, des hormones et des ions, et quelques-unes associées à la défense innée de l'œuf (LYZ et TF). Concernant l'AmF, l'analyse globale par spectrométrie de masse, en solution et en gel, a mené à l'identification de 91 protéines non redondantes à ED11. Des outils d'analyse bio-informatique de séquence et d'ontologie de gènes nous ont permis de classer au moins 20 d'entre elles dans les processus biologiques liés à la réponse immunitaire. Certaines, comme LYZ, TF ou OVALX, proviennent probablement du blanc d'œuf, et ce, alors que le transfert massif de protéines n'a lieu qu'à partir d'ED12.

- Objectif 3 -

La signification biologique de la fonction prédite des protéines identifiées par des approches à haut débit, est parfois surestimée car ces approches ne prennent pas toujours en considération d'éventuelles modifications (dégradation protéolytique, sous forme de précurseurs, complexes avec des inhibiteurs) qui régulent l'activité biologique de la plupart des protéines. Par conséquent, pour vérifier l'activité des protéines prédites comme antibactériennes, nous avons testé les activités antibactériennes, ainsi que les activités protéolytiques des deux fluides, sachant que de nombreuses protéases sont connues pour être impliquées directement (dégradation des protéines bactériennes) ou indirectement (activation de précurseurs antibactériens de l'hôte) dans la régulation des mécanismes de défense. L'utilisation de zymographies a permis de visualiser des métalloprotéases et des protéases à sérine actives dans l'AmF et l'AlF, d'ED8 à ED16. Des tests en solution ont confirmé l'augmentation de cette activité au cours de l'incubation, pour les deux fluides, soulevant la question de la régulation de ces activités. Curieusement, malgré sa composition riche en inhibiteurs de protéases, le transfert du blanc d'œuf dans l'AmF semble augmenter l'activité protéolytique de l'AmF. L'identification des protéases par spectrométrie de masse, et l'analyse par Gene Ontology a fait ressortir la présence de protéases digestives identifiées initialement chez le poulet adulte, spécifiquement dans l'AIF. Ce fluide pourrait donc être impliqué dans la digestion des composés de l'œuf, avant réabsorption par la membrane chorioallantoïque, ou dans l'activation potentielle de précurseurs protéiques, notamment antibactériens.

Partant de l'hypothèse que l'AmF aurait un rôle majeur dans la protection antibactérienne de l'embryon, au même titre que l'AmF humain, ses activités antibactériennes ont été analysées directement sur gel SDS-PAGE, avec une méthode dérivée du test de diffusion en gélose de Lehrer. Nous avons donc visualisé l'activité de LYZ dans la fraction totale de l'AmF (ED11 et 16), contre deux bactéries responsables de toxi-infections alimentaires, soit Salmonella *enterica Enteritidis* et *Listeria monocytogenes*. Pour mieux appréhender les propriétés antibactériennes de l'AmF, nous avons également testé l'activité d'une fraction de l'AmF enrichie en molécules antibactériennes, obtenue par chromatographie d'affinité à l'héparine. A ED16, le potentiel antibactérien de la fraction enrichie de l'AmF augmente fortement, *via* l'apparition de nouvelles protéines et peptides antibactériens actifs dans le fluide. Leur analyse par spectrométrie de masse a permis l'identification de nombreuses protéines et peptides initialement identifiés dans le blanc d'œuf, dont OVALX, VMO1, BMSP, AvBD11, etc. Il semblerait donc que les protéines et peptides antibactériens du blanc soient toujours actifs après leur transfert dans l'AmF, ce qui pourrait renforcer la protection de l'embryon dans son environnement proche. Cette observation souligne le fait que les protéases de l'AmF n'altèrent pas la fonctionnalité des molécules antibactériennes du blanc (pas de dégradation protéolytique). La forte concentration protéique dans l'AmF à ED16, constitue également une des spécificités du modèle de reproduction de l'oiseau, tout comme la présence de protéines et de peptides spécifiques à ces espèces.

- Objectif 4 -

L'évolution du modèle de reproduction ovipare au modèle vivipare a entrainé non seulement des changements anatomiques et structuraux, mais aussi des changements protéiques et métaboliques au sein des structures extra-embryonnaires. Chez l'humain par exemple, l'embryon sécrète directement ces urines dans l'AmF, à l'inverse de l'embryon d'oiseau, qui sécrète ses urines dans un compartiment indépendant. L'AmF d'oiseau pourrait donc avoir une composition protéique bien différente de celui de l'humain. C'est dans ce contexte que nous avons comparé le protéome de l'AmF humain avec celui de l'AmF de poule pour identifier les caractéristiques protéiques voire fonctionnelles de l'AmF de chacune des deux espèces.

Dans un premier temps, la comparaison du protéome de l'AmF de poule établi à ED11 (91 protéines) avec ceux de l'AmF humain publiés (plus de 900 protéines), a mené à l'identification de 48 protéines communes. Malgré les différences observées au niveau du contenu protéique, il semblerait que les processus biologiques majoritaires associées aux protéines de chaque fluide soient conservées d'une espèce à l'autre (le métabolisme, la réponse immunitaire et la morphogénèse). Toutefois, la fonction associée à OVAL et VTG, en tant que source d'acides aminés ou source énergétique, semble être spécifique de notre modèle. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons également réalisé une étude phylogénétique sur l'ensemble des protéines de l'AmF, qui a mis en avant non seulement des spécificités protéiques du modèle ovipare (VTG, RBP), mais aussi des spécificités de l'oiseau (OVAL, OVALX, OVALY, AvBD11).

- Conclusion -

L'ensemble des résultats présentés ici ont été détaillés et retranscrits sous la forme de deux publications scientifiques. Le 1^{er} article, publié en mars 2017 dans le journal « Poultry Science », s'applique à exposer l'évolution des paramètres physicochimiques, de la composition en protéines majeures, ainsi que des activités protéolytiques de l'AmF et de

l'AlF d'ED8 à ED16, pour mettre en avant les rôles potentiels des deux fluides au cours de l'incubation. Le 2^{ème} article, en cours de soumission auprès du journal « Molecular and Cellular Proteomics », privilégie l'étude du fort potentiel antibactérien de l'AmF, surtout après le transfert du blanc. Ainsi, une analyse fonctionnelle (annotation et tests biologiques) et phylogénétique du protéome complet de l'AmF à ED11 y est présentée, incluant la recherche de candidats antibactériens et d'orthologues protéiques et fonctionnels chez d'autres espèces, et en particulier chez l'humain. Cet article met en lumière le rôle majeur de l'AmF d'oiseau dans la nutrition de l'embryon et dans sa protection face aux bactéries, en particulier après le transfert du blanc dans le sac amniotique.

IV - Résultats expérimentaux
Publication 1: Investigating proteins and proteases composing amniotic and allantoic fluids during chicken embryonic development

Mylène Da Silva¹, Valérie Labas², Yves Nys¹, Sophie Réhault-Godbert¹*

 ¹ INRA, UR83 Recherches Avicoles, Fonction et Régulation des Protéines de l'Œuf, F-37380 Nouzilly, France.
² INRA, Plateforme d'Analyse Intégrative des Biomolécules, Laboratoire de Spectrométrie de Masse, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, CNRS, UMR7247, Université François Rabelais de Tours, IFCE, Nouzilly F-37380, France.

Mots clés : fluides amniotique et allantoïque, œuf de poule, protéine, protéase, développement embryonnaire

NB : les données supplémentaires (Supplementary Data S1) sont affichées à la suite de l'article.

- Résumé -

Chez les ovipares, les structures extra-embryonnaires maintiennent les fonctions vitales de l'embryon : le sac vitellin assure la digestion des composés du jaune, le sac amniotique protège l'embryon contre les chocs mécaniques et la déshydratation, et le sac allantoïque stocke les déchets du métabolisme. Les transferts de nutriments du jaune et du blanc d'œuf entre ces différents compartiments permettent leur assimilation, et peuvent entrainer des modifications de la composition et des propriétés des fluides amniotique (AmF) et allantoïque (AIF). Pour mieux comprendre l'impact de ces échanges sur les deux fluides, et ainsi mettre en avant leurs spécificités, l'origine de leurs protéines et leur régulation, nous avons caractérisé leurs propriétés physicochimiques, leur composition et certaines de leurs activités protéolytiques, du 8^{ème} au 16^{ème} jour de l'incubation (ED8 à 16), dans l'œuf de poule.

A partir d'ED12, des changements drastiques dans la composition de l'AmF ont été observés par SDS-PAGE, avec une augmentation importante de la concentration en protéine (de 0,01 g/L à ED11 jusqu'à 200 g/L à ED16), suite au transfert des protéines du blanc dans le sac amniotique. Toutefois, l'analyse par spectrométrie de masse a révélé que les protéines majoritaires de l'AmF à ED11 étaient également des protéines du blanc (l'ovalbumine, l'ovotransferrine, etc.), suggérant un transfert préalable - potentiellement par diffusion passive, avant ED12. A l'inverse, l'AlF conserve une composition protéique stable sur la période étudiée, avec des protéines majeures provenant du jaune d'œuf (l'apolipoprotéine B, l'albumine sérique, etc.). Ces dernières semblent particulièrement impliquées dans le métabolisme des vitamines et des lipides, ainsi que dans le transport d'ions, alors que celles de l'AmF sont des protéines vraisemblablement associées à la nutrition de l'embryon et à sa protection contre les pathogènes.

En parallèle, nous avons démontré que même si le pH de l'AmF chute légèrement à ED12, il reste stable tout au long de l'incubation (~7,5), pour maintenir un environnement physiologiquement viable autour de l'embryon. En revanche, le pH et l'osmolalité de l'AlF diminuent significativement lors de la seconde moitié de l'incubation, avec l'accélération du métabolisme de l'embryon (de 8,26 à 7,26 unités pH, et de 231 à 183 mOsm/kg respectivement, d'ED8 à ED16). Cependant, l'impact exact de ces variations sur les activités des protéines reste encore inconnu.

D'autre part, des métalloprotéases et des protéases à sérine actives ont été détectées directement sur gel SDS-PAGE par zymographie, et des tests enzymatiques en solution ont confirmé l'augmentation de leurs activités d'ED8 à ED16. Leur analyse par spectrométrie de masse a mené à l'identification de 12 protéases dans l'AIF contre seulement 5 dans l'AmF. Ces protéases sont décrites comme associées à la morphogénèse (l'activateur de facteur de croissance des hépatocytes, le suppresseur de tumeur 14 et la métalloendopeptidase astacin-like), et l'hémostase (la prothrombine et le facteur de coagulation 10). Quatre d'entre-elles, identifiées uniquement dans l'AIF, sont des protéases digestives chez la poule : l'aminopeptidase N, la dipeptidyl peptidase-4, la méprine A et la métalloprotéinase de matrice 2.

L'ensemble de ces résultats suggèrent une implication importante des deux fluides dans les processus du développement embryonnaire, tels que l'assimilation des composés du jaune et du blanc d'œuf (protéases digestives et transporteurs), la nutrition de l'embryon (protéines comme sources d'acides aminés), et la protection de l'embryon face aux pathogènes (protéines antibactériennes), ainsi qu'aux contraintes thermiques et mécaniques inhérentes à l'incubation, aux mouvements et à la croissance de l'embryon.

Investigating proteins and proteases composing amniotic and allantoic fluids during chicken embryonic development

M. Da Silva,^{*} V. Labas,[†] Y. Nys,^{*} and S. Réhault-Godbert^{*,1}

* URA, INRA, 37380, Nouzilly, France; and [†]PRC, CNRS, IFCE, INRA, University of Tours, 37380, Nouzilly, France

ABSTRACT In amniotes, the amniotic fluid is a significant contributor to fetal development and health. While numerous studies have been conducted in mammalian amniotic fluid, the composition of amniotic and other extraembryonic fluids in avian egg along with their physiological functions remain largely unexplored. In such a context, our objective was to characterize the chicken amniotic fluid (AmF) and allantoic fluid (AlF) properties, protein composition, and some associated functions from day 8 to day 16 of incubation. SDS-PAGE combined to mass spectrometry analysis revealed common and specific proteins to each fluid, suggesting distinct properties and functions. Indeed, major AlF proteins are mostly "egg yolk" proteins involved in lipid, vitamin metabolisms, and metal ion transport, while major AmF proteins resemble those of albumen. Drastic changes in the AmF protein profiles were observed during incubation, when the albumen transfers from day 12 onwards, while few changes were detected for the AIF protein profile. The decreases in osmolality (from 231 to 183 mOsm/kg) and pH (from 8.26 to

7.26) observed in the AlF during incubation are associated with water and electrolytes reallocation for the embryo needs. In contrast, AmF pH value remained stable (≈ 7.5). Active proteolytic enzymes have been identified in the 2 fluids using gelatin zymography, followed by mass spectrometry analysis for protease identification. A total of 12 proteases was detected in the AlF, compared to 5 in the AmF. We have shown that AlF concentrates proteolytic enzymes assumed to participate in digestive processes: aminopeptidase N, dipeptidyl peptidase-4, meprin A, and 72 kDa type IV collagenase preproprotein. The other proteases identified in both fluids also could have a role in morphogenesis (hepatocyte growth factor activator, suppressor of tumorigenicity 14, astacin-like metalloendopeptidase) and hemostasis (prothrombin and coagulation factor X). Altogether, these data suggest that the roles of chicken AlF and AmF are not merely associated with protection of the embryo and regulation of metabolic disposable wastes, but also they could have more sophisticated roles during embryonic development.

Key words: amniotic fluid, allantoic fluid, chicken egg, proteases, embryonic development

INTRODUCTION

The avian egg is basically composed of the eggshell (\mathbf{ES}) , the albumen (\mathbf{EW}) , and the egg yolk (\mathbf{EY}) , which contain all the nutrients and biological activities required to support the development of an embryo outside the hen's body (Figure 1A, ED0). However, during its development, the avian embryo requires additional egg structures to maintain its vital functions, such as breathing and digesting, since its organs are not fully functional. These compartments, called the amniotic, (chorio) allantoic, and yolk sacs (Figure 1A, ED4) are found in birds, reptiles, and mammals but might have different roles in these oviparous or viviparous

species. In humans, the amniotic fluid (AmF) protects the embryo by cushioning against shocks, and by providing molecules with antimicrobial activities (Cho et al., 2007; Michaels et al., 2007). However, in birds, the biochemical properties of the AmF have not been fully studied yet, and the transfer of EW proteins in the amniotic sac from day 11 of the development (ED11)onwards suggests an additional role of the fluid in nutrition and possibly digestion. Indeed, the impact of the AmF on the EW components before its oral absorption by the embryo is not well characterized, as well as the fate of EW components. It is believed that the resulting mix is somehow digested to provide essential amino acids to the embryo (Romanoff, 1960; Freeman and Vince, 1974). The sequential transfer of the EW from the amniotic sac to the embryo, then to the yolk and allantoic sacs is the ongoing hypothesis for EW transfer and its assimilation by the embryo (Figure 1B) (Romanoff, 1960; Geelhoed and Conklin, 1966; Carinci and Manzoli-Guidotti, 1968; Yoshizaki et al., 2002;

2017 Poultry Science 0:1-11

http://dx.doi.org/10.3382/ps/pex058

^{© 2017} Poultry Science Association Inc.

Received November 23, 2016.

Accepted March 1, 2017

¹Corresponding author: Sophie.rehault-godbert@inra.fr



Figure 1. Schematic representation of the formation and the evolution of the extraembryonic structures of the chicken egg from day 0 to day 16 (ED0-16) (A); (B) diagram showing the assimilation of the egg white (EW) and egg yolk (EY) proteins by the embryo as described in the literature (adapted from Yoshizaki et al., 2002): EW proteins are transferred into the anniotic sac from ED12 onwards $(1\rightarrow 2)$, and orally absorbed by the embryo $(2\rightarrow 3)$. Proteins are partly absorbed by the intestine and redirected to the embryonic organs, while the remaining proteins are transferred to the yolk sack $(3\rightarrow 4)$. Then, EW and EY proteins are digested and absorbed by the YSM $(4\rightarrow 5)$ and transported to the embryo via the area vasculosa $(5\rightarrow 6)$. After being metabolized by the embryo, the remaining proteins/peptides are secreted into the allantoic sac $(6/3\rightarrow 4')$ via the allantoic stalk. We hypothesized that this fraction of proteins/peptides could be digested and reabsorbed by the allantoic membrane $(4'\rightarrow 5')$ and redirected to the embryo via the chorioallantoic capillary plexus $(5'\rightarrow 6)$.

Moran, 2007). After being transported in the yolk sac through the intestine and then the yolk stalk, EW proteins, but also yolk proteins, are thought to be digested by yolk proteases (Yadgary et al., 2011; Speier et al., 2012) and then taken to the embryo via the area vasculosa (Figure 1B) (McIndoe, 1960; Bauer et al., 2013). As suggested first by Romanoff, once they are metabolized by the embryo, the EW components are probably secreted in the allantoic sac, which collects fetal urine and form a part of the allantoic fluid (AlF) (Romanoff, 1960; Freeman and Vince, 1974; Yoshizaki et al., 2002). Until the post-hatch transition to intestinal absorption of nutrients, the main digestive organ of the avian embryo has been described as the yolk sac (Yadgary et al., 2014). Specific enzymes and amino acid transporters have been reported to be expressed by the yolk sac membrane (YSM) (Yadgary et al., 2011; Speier et al., 2012), but information is still missing concerning the other extraembryonic structures. Knowing that EW contains many antiproteases, which are assumed to prevent EW proteins from early proteolytic degradation (Saxena and Tayyab, 1997), we hypothesized that other fluids such as the AmF and the AlF would participate in such digestive processes.

The hypothesis is further strengthened by the fact that in birds the allantoic sac, like the yolk sac, has been defined as a diverticulum of the embryonic intestine, and thus could be a possible extension of its capacities in absorbing nutrients. At ED5 to 6, the allantoic sac starts to fuse in some areas with the chorion, and forms the chorioallantoic membrane (CAM) (Figure 1A, ED16), a highly vascularized membrane that functions in calcium and oxygen transport (Gabrielli and Accili, 2010; Everaert et al., 2011). The chorioallantoic capillary plexus, as the area vasculosa, could therefore be a way for the digested products to be redirected to the embryo (Figure 1B).

The characterization of physicochemical and biochemical properties of both the chicken AmF and AlF and their role in digestion processes remain poorly understood. In this article, we explored first the evolution of their protein contents by SDS-PAGE combined to mass spectrometry analysis, while measuring some of their physicochemical properties. In parallel, we investigated the presence and activity of proteolytic enzymes using enzymatic assays and mass spectrometry analysis at various phases of development, to better appreciate the potential role of each fluid in proteolytic activation of protein precursors and/or digestion-degradation processes.

MATERIALS AND METHODS

Incubation Procedures and Fluid Sampling

Fertile eggs were obtained from laying hens (ISA Brown, Hendrix Genetics, St Brieuc, France) at 62 wk of age in the UE1295 (INRA, F-37380 Nouzilly, France). Eggs were incubated under standard conditions (45%) RH, 37.8°C, automatic turning every hour), after a 3day storage at 16°C, 85% RH to favor synchronization of developmental stages. For each embryonic day studied (ED8, 10, 11, 12, 14, and 16), 25 eggs of the same size and weight $(60.60 \pm 4.80 \text{ g})$ containing viable embryos (checked by candling) were selected. Eggs were tested with the Acoustic Egg Tester (KU, Leuven, Belgium), and the cracked eggs were discarded. At each stage, AlF was sampled with a syringe through the chorioallantoic membrane, after removing the eggshell at the blunt end of the egg. EW was sampled with a syringe after drilling a hole in the eggshell in the pointed end of the egg. The egg content was further poured into a Petri dish and the AmF was recovered with a syringe through the amniotic membrane. By ED14 and ED16. the EW was collected in the Petri dish with pliers due to its high viscosity. In case of contamination by other components (blood, extraembryonic membranes), sampling was immediately stopped. All samplings were conducted under sterile conditions. All experiments were conducted in compliance with the European legislation on the "Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes" (2010/63/UE) and under the supervision of an authorized scientist (S. Réhault-Godbert, Authorization no. 37-144).

Physicochemical Parameter Measurements

Immediately after collecting, AlF and AmF samples were centrifuged at 3,000 g (10 min, 4°C) to remove contaminants such as blood cells or meconium. Volumes and pH (Microelectrode pH InLab 423, Fisher Scientific, Illkirch, France) of each sample were measured. Osmolality was determined using a freezing point depression osmometer (Fiske Mark 3 Osmometer, Advanced Instruments, Niederbronn Les Bains, France). Osmolality from AmF samples at ED12, 14, and 16 was assessed after removal of protein content (which interferes with osmolality measurements) using a filter system with a cut-off of 3 kDa (Amicon Ultra 0.5 ml 3 K, UFC500396, Millipore, Molsheim, France).

Samples Preparation

After analysis of their physicochemical parameters and their protein profiles on SDS-PAGE, 9 homogenous samples were pooled for each stage and each fluid studied, and used for SDS-PAGE, mass spectrometry, and zymography analyses (equal volume of samples with equivalent protein concentration). Total protein concentration was determined by the method of Lowry with the BioRad DC Protein Assay Kit II (500-0116, BioRad, Marnes-la-Coquette, France), using the bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) as the standard. For analysis of the proteolytic activity in solution, 3 independent samples among the 9 initially sampled were used as biological replicates.

Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide Gel Electrophoresis

AlF (ED8 to 16) and AmF (ED8 to 11) samples were concentrated 10 times using a SPD1010 speedvac system (ThermoSavant, Thermofisher Scientific, Bremen, Germany). The resulting fluids were sonicated 10 min and stored at 4°C. SDS-PAGE was conducted under non-reducing conditions using a Mini-Protean II electrophoresis cell (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Concentrated samples containing loading buffer (0.25 M Tris-HCl, 0.05% bromophenol blue, 50% glycerol, and 5% SDS, pH 6.8) were loaded onto a 12.5% acrylamide-bisacrylamide gel. Because protein concentrations of ED12–16 AmF samples and ED0, ED8–16 EW samples were very high $(>200 \ \mu g/\mu L)$, only 10 μg of each sample were loaded. After migration, gels were further stained with Coomassie blue solution.

Proteolytic Activities

Proteolytic activities in AmF and AlF were detected using gelatin zymography, as previously described (Réhault-Godbert et al., 2008). Samples were separated by SDS-PAGE as described above, while maintaining the electrophoresis system at 4°C to avoid protein degradation. After migration, gels were washed in 2.5% Triton X-100 and incubated in activation buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 mM $CaCl_2$, and pH 7.5) overnight at 37 °C to allow gelatin proteolysis, followed by Coomassie blue staining. MMP-2 (Cat#PF069, Calbiochem, Darmstadt, Germany) and trypsin (T9201-500MG, Sigma-Aldrich) were used as positive controls for metalloprotease and serine protease activity, respectively. In parallel, a gelatin-free SDS-PAGE was conducted; bands corresponding to gelatinolytic activities on gelatin gel were cut and further analyzed by mass spectrometry. In addition, the proteolytic activities of biological samples were assayed in solution using 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, and pH 7.5 buffer. The reaction mixture consisted of 0.3 mM of N-(p-Tosyl)-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilide substrate (T1637, Sigma-Aldrich) and trypsin as the control (2 nM) or 50 μ l of crude samples. The presence of proteolytic activities in samples was assessed by measuring the absorbance at 410 nm during 20 min at 37°C, under stirring. Each reaction was performed in triplicate using a microplate reader (Tecan, Infinite M200, Tecan France S.A.S., Lyon, France).

Identification of Proteases by Mass Spectrometry

The SDS-PAGE bands corresponding to major proteins or to gelatinolytic activities (assessed by zymography) were excised from the gel after Coomassie blue staining and further rinsed separately in water and then acetonitrile. They were then reduced with dithiothreitol, alkylated with iodoacetamide, and incubated overnight at 37° C in 25 mM NH₄HCO₃ with 12.5 ng/ μ L trypsin (Sequencing grade, Roche, Paris, France) as described by Shevchenko et al. (Shevchenko et al., 1996). Peptide extractions were pooled and dried using a SPD1010 speedvac system and the resultant peptide mixture was analyzed on a LTQ Orbitrap Velos Mass Spectrometer (ThermoSavant, ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) coupled to an Ultimate® 3000 RSLC chromatographer (Dionex, Amsterdam, The Netherlands), as previously described by Marie et al. (Marie et al., 2015). MS/MS ion searches were performed using Mascot search engine v 2.2 (Matrix Science, London, UK) via Proteome Discoverer 1.3 software (ThermoFisher Scientific) against the NCBI database with chordata taxonomy, using the same parameters as described by Marie et al. (Marie et al., 2015). Mascot results obtained from the target and decoy database searches were subjected to Scaffold 4 software (v 4.4, Proteome Software, Portland, Oregon). Peptide and protein identifications and validations were performed using the Peptide Prophet algorithm and by the Protein Prophet algorithm, respectively (95.0%) probability, at least 2 different unique peptides).

Statistical Analysis

Physicochemical parameter measurements were analyzed by R Statistical Software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The data were log-transformed to maintain normality and homogeneity of variance. Comparison between stages and fluids was performed using a 2-way ANOVA. The results were expressed as means \pm SD. Significant effects and interactions (*P*-value < 0.05) were further evaluated with Tukey's test for pairwise comparisons.

RESULTS AND DISCUSSION

Amniotic and Allantoic Fluids have Common and Specific Proteins with Distinct Functions

Similarities among the AmF, AlF, and EW contents have already been observed (Geelhoed and Conklin,

1966; Carinci and Manzoli-Guidotti, 1968; Sugimoto et al., 1999), but the specific protein compositions of both AmF and AlF have never been elucidated. To gain a better understanding of the evolution of their compositions during development, we have studied the SDSelectrophoretic patterns of proteins under non-reducing conditions, selecting 8 stages of the embryonic development: ED8 and ED16, which correspond to the limit stages for which we had a significant volume of AmF and AlF; and ED10, 11, 12, and 14 to assess the kinetics of the EW transfer. Results are illustrated in figure 2A, 2B, and 2C for AmF, AlF, and EW, respectively. AmF electrophoretic profiles were similar from ED8 to ED11 (Figure 2A) and exhibit 6 major bands at 250, 60, 55, 52, 37, and 31 kDa. By ED12, the EW transfer in the amniotic sac was clearly visible, with a protein concentration largely increased from about 0.01 $\mu g/\mu l$ at ED11 to 200 $\mu g/\mu l$ at ED14. Biochemical characterization of the chicken EW proteins has been well documented (Mann, 2007; D'Ambrosio et al., 2008; Omana et al., 2011; Liu et al., 2013), and the major bands appearing on the SDS-PAGE gel (Figure 2C) have been assigned to ovomucin (233 kDa), ovotransferrin (70 and 76 kDa), ovoinhibitor (50 kDa), ovalbumin (37-40 kDa), and lysozyme C (14 kDa). No significant alteration in EW protein profiles throughout incubation (ED8 to ED16) could be detected, which is consistent with previous publications reporting the stability of EW protein profile during the first stages of the embryo development (Liu et al., 2013). Protein profiles of AmF in the late stages (ED>11 d) (Figure 2A) clearly resemble those of EW (Figure 2C), suggesting that the EW content is not modified, even after its transfer to the AmF. EW protease inhibitors are assumed to prevent EW proteins from early proteolysis (Saxena and Tayyab, 1997) and might also control proteolysis in the AmF, after EW transfer. However, although no changes have been observed in the major protein contents, putative changes in minor proteins, and, therefore, fluid activities, cannot be excluded, as shown recently by Guyot et al. (Guyot et al., 2016). Unlike AmF, the AlF protein profile remained relatively stable over the period analyzed, with no evidence of EW transfer at ED12 (Figure 2B). However, previous studies reported the presence of EW proteins in both AmF and AlF, such as ovalbumin and cystatin, even before EW transfer (Sugimoto et al., 1999; Cirkvenčič et al., 2012).

Altogether, these data suggest a 2-step mechanism: a first transport of EW components in small amounts into the AmF and the AlF before ED12, followed by a massive transfer of EW (after ED11) into the AmF, which is then orally absorbed by the embryo and may be then partly recovered in the AlF (Figure 1B). To test this hypothesis, the major bands appearing on the SDS gel at ED11 for the AmF and ED16 for the AlF were excised from the gel (6 bands for AmF, Figure 2A; 10 bands for Alf, Figure 2B) and analyzed by mass spectrometry to identify the major proteins, and better appreciate the potential origins of AmF and AlF



Figure 2. SDS-PAGE analysis of the amniotic (A) and allantoic (B) fluids and the egg white (C) from embryonic day 0 (ED0) to 16 (ED16), with the corresponding zymographics (D, E, and F, respectively), conducted under non-reduced conditions. Molecular weights are expressed in kDa. Equal volumes of crude amniotic and allantoic fluids were analyzed (16 μ l/lane), except for the amniotic fluid from ED12 to ED16 (and egg white ED0 and ED8-16 samples) for which 10 μ g of proteins per lane were used for the experiment. A pH 7.5 buffer with Ca²⁺ was used for the zymographies (incubation overnight at 37°C). Numbers and letters correspond to bands analyzed by mass spectrometry analysis to identify major proteins and proteases, respectively.

protein contents (Table S1). Correspondence with the AlF at ED11 has been made based on similarities between ED11 and ED16 profiles. Thus, 10 major proteins were identified in the AmF (Table 1), whereas 15 major proteins were identified in the AlF (Table 2). Ten proteins were common to both fluids. According to the normalized total spectra and emPAI (Table S1), the major bands in the AlF fractions (Figure 2B) were assigned to apolipoprotein B (**APOB**) and fibronectin (**FN1**) at about 250 kDa, ovotransferrin (**TF**) at 73 and 60 kDa, alpha-fetoprotein (**AFP**) at 55 kDa, serum albumin (**ALB**) at 52 kDa, vitamin D-binding protein (**GC**) at 48 kDa, ovalbumin (**OVAL**) at 40 kDa, transthyretin (**TTR**) at 31 kDa, apolipoprotein AI (**APOAI**) and extracellular fatty acid-binding protein (**Ex-FABP**) at about 17 kDa, and, finally, lysozyme (**LYZ**) at 14 kDa (Table 2). APOB, APOAI, ALB, Ex-FABP, GC, TTR, and TF proteins are originally synthesized by the hen liver and stored in the follicles/EY during its formation (Mann and Mann, 2008; Bourin et al., 2012). Another synthesis of some of these precursors (ALB, AFP, APOB, TTR, and APOA1) occurs during the development in the YSM while the embryo liver is not fully functional (Yadgary et al., 2014). The presence of these proteins in the AIF would confirm a transfer of EY and YSM proteins to the embryo

Table 1. List of the major proteins in the amniotic fluid corresponding to the SDS-PAGE gel bands (Figure 2A) identified by mass spectrometry analysis. The asterisk refers to localizations that are exclusive to fertilized eggs. Normalized total spectra (TS $_{\rm N}$) and emPAI (emPAI $_{\rm N}$) values for each fluid correspond to the previous "Gel bands" column numbers. MW, molecular weight.

Gel bands	Gene ID	Gene name	Accession number	Protein name	MW (kDa)	TS $_{\rm N}$	emPAI $_{\rm N}$	Localization
1	_	_	AHX37590	Immunoglobulin Y heavy chain constant region, partial	42	117	3	EW, EY
2; 3	396241	TF	2D3I_A	Ovotransferrin	76	711; 546	22; 12	EW, EY, VM, ES, ESM [*] , CAM, Blood
4	422652	AFP	P84407	Alpha-fetoprotein	71	312	3	EY [*] , ESM [*] , CAM, Blood, YSM
	3961197	ALB	NP_990592	Serum albumin	70	283	6	EW, EY, VM, ES, ESM*, CAM, Blood, YSM
5	396058	OVAL	1UHG_A	Ovalbumin	43	827	19	EW, EY, VM, ES, ESM [*] , CAM, Blood
6	396277	TTR	1TFP_A	Transthyretin	14	56	9	EY, ES, YSM
	424547	VTG1	NP_001004408.1	Vitellogenin-1 precursor	211	43	9	EW, EY, VM, ESM [*] , Blood

Table 2. List of the major proteins in the allantoic fluid corresponding to the SDS-PAGE gel bands (Figure 2B) identified by mass spectrometry analysis. The asterisk refers to localizations that are exclusive to fertilized eggs. Normalized total spectra (TS_N) and emPAI (emPAI_N) values for each fluid correspond to "Gel bands" column numbers. MW, molecular weight.

Gel bands	Gene ID	Gene name	Accession number	Protein name	MW (kDa)	TS $_{\rm N}$	emPAI $_{\rm N}$	Localization
1	396535	APOB	NP_001038098	Apolipoprotein B precursor	523	459	1	EW, EY, VM, ES, ESM*, CAM, Blood, YSM
	396133	FN1	XP_015144618	Fibronectin	264	183	1	EW. EY. ES. ESM [*] , CAM. Blood
2.3	396241	TF	2D3LA	Ovotransferrin	76	960: 600	28: 20	EW, EY, VM, ES, ESM [*] , CAM, Blood
4	422652	AFP	P84407	Alpha-fetoprotein	71	757	13	EY*, ESM*, CAM, Blood, YSM
5	3961197	ALB	NP_990592	Serum albumin	70	1031	32	EW, EY, VM, ES, ESM*, CAM, Blood, YSM
6	395696	GC	NP_990213	Vitamin D-binding protein precursor	54	199	9	EW, EY, ES
7	396058	OVAL	1UHG A	Ovalbumin	43	742	26	EW. EY. VM. ES. ESM [*] . CAM. Blood
8	396277	TTR.	1TFP A	Transthyretin	14	201	15	EY. ES. YSM
9	396393	Ex-FABP	NP_990753	Extracellular fatty acid-binding protein	20	377	19	EW, EY, VM, ES, ESM*
	396536	APOA1	16131684	Apolipoprotein AI	29	147	4	EW EY VM ES ESM* CAM Blood VSM
10	396218	LYZ	630460A	Lysozyme	14	392	6	EW, EY, VM, ES, ESM*, CAM

via the area vasculosa (Bauer et al., 2013), and then to the AlF after being metabolized by the embryo (Figure 1B) (Romanoff, 1960; Geelhoed and Conklin, 1966; Carinci and Manzoli-Guidotti, 1968; Yoshizaki et al., 2002).

On the other hand, the major bands in the AmF fractions at ED11 (Figure 2A) were attributed to immunoglobulin Y (IgY) at about 250 kDa, TF at 60 and 55 kDa, AFP and ALB at 52 kDa, OVAL at 37 kDa, and TTR and vitellogenin-1 (VTG1) at 31 kDa (Table 1). As mentioned above, some of these proteins originate from the EY (TTR, ALB, and VTG1), which could indicate a transport of specific EY proteins into the amniotic sac, maybe via the area vasculosa (Bauer et al., 2013), or via the sub-embryonic fluid, which is described as the primary source of both the AmF and the AlF (Romanoff, 1960; Everaert et al., 2011). Indeed, the sub-embryonic fluid is formed from ED2 onwards by a transfer of EW water into the yolk sac. It accumulates within the yolk, in contact with the embryo's body, and progressively results in AmF and AlF via an unknown mechanism. This mechanism could be associated with a transfer of EW and EY proteins into the extraembryonic compartments (Figure 1B). Furthermore, TF, OVAL, and LYZ, which mainly originate from the EW (Mann, 2007; Omana et al., 2011; Liu et al., 2013), are also found in the extraembryonic fluids before ED12 (Tables 1 and 2).

On the other hand, the AFP and the TF also have been described as synthesized at a lower level by the CAM and the amniotic membrane at ED14 (Palazón and Rodríguez-Burgos, 1993), and could be secreted by the membranes into the AlF and the AmF. In addition, Cordeiro et al. demonstrated the presence of the ALB, APOAI, APOB, OVAL, LYZ, and FN1 in the CAM (Cordeiro and Hincke, 2016). However, to date, there is still no evidence of the expression of these proteins by the CAM itself. Overall, the AlF protein content is similar to the EY content with major proteins involved in lipid and vitamin metabolisms (APOAI, APOB, Ex-FABP, TTR, and GC), as well as in metal ion transport (ALB, TF, and AFP). In contrast, the AmF proteins seem to arise mainly from the EW, even before the transfer of EW proteins at ED12, with OVAL and TF composing about 40% of the AmF protein content at ED11.



Figure 3. Evolution of the volume (A), pH (B), and osmolality (C) of the amniotic and allantoic fluids in the chicken egg from embryonic day 0 to 16 (ED0-16) (mean \pm SD). Significant differences among stages and fluids are expressed with a, b, c, and d values (p > 0.05).

Changes in Amniotic and Allantoic Fluids' Physicochemical Properties Maintain Homeostasis and Water Balance

As described previously by Romanoff, the AmF volume increased slightly from ED8 (1.02 ml +/-0.32) to ED16 (2.36 mL +/-1.42) due to the gradual transfer of the EW into the amniotic sac (Figure 3A) (Romanoff and Romanoff, 1967). Similarly, AlF volume increases from ED8 (0.71 ml + /-0.40) onwards under the urinary inflow and reaches a peak at ED14 (5.7 ml +/-1.47), before dropping to 3.07 ml + /-1.20 at ED16 as a result of the reabsorption of ions by the allantoic membrane. Briefly, the mature allantoic inner membrane starts to transport selectively the sodium and chloride ions from the AlF to the plasma on ED13 (Gabrielli and Accili, 2010; Everaert et al., 2011). This phenomenon, combined with the removal of soluble uric acid to urates (salt form), causes a significant decrease in the AlF osmolality from 238 mOsm/kg +/-12 at ED12 to 183 mOsm/kg + / -21 at ED16 (Figure 3C). This drop may generate an osmotic gradient between the AlF and the plasma (about 270 mOsm/kg), resulting in a flow of water from the AlF, through the allantoic membrane, to the bloodstream and then to the embryo. Furthermore, during the growth phase from ED11 onwards, the embryonic metabolism increases to fulfill embryo requirements in water. Because of the evaporation of water through the eggshell, the allantoic sac serves as a water supply for the embryo. This process of water resorption continues after hatching in the cloaca (Romanoff and Romanoff, 1967).

Water, ion, and proton transfer also impact the AmF and AlF pHs. From ED8 to ED11, the pH values for the AmF and AlF were stable around 7.7 and 8.3, respectively (Figure 3B). These values started to decrease at ED12, when the EW transfer into the amniotic sac begins. Even though the difference is significant (P-value < 0.05), the drop in the AmF pH values remains limited (from 7.78 +/-0.08 at ED8 to 7.04 +/-0.16 at ED16), especially since the pH has been shown to increase again up to its initial value at ED17 (Boutilier et al., 1977) to maintain homeostasis. In contrast to the AmF, the AlF pH drops from more than one unit (from 8.37 + -0.18 at ED8 to 7.26 at ED16 + -0.42), and this difference has been described as more important at ED17 to 18, for the AlF remaining in the sac (Boutilier et al., 1977). Indeed, at ED11 to 12, the embryo metabolism increases to support organ growth causing a general acidosis with an increase in proton secretion in the amniotic and allantoic sacs (Everaert et al., 2011). To compensate this effect, bicarbonate ions contained in the AlF, mainly originating from the increasing embryo metabolism and from the eggshell solubilization (ED10), are transported in the amniotic sac to maintain homeostatic pH in the vicinity of the embryo (Boutilier et al., 1977; Everaert et al., 2011). Thus, protons accumulate in the AlF causing a fall in pH, which reaches 5.9 at ED19. Such pH values could have some effect on the AlF proteins and/or protease structures and activities as demonstrated by Banerjee et al., who reported how pH can alter muramidase activity of egg-derived lysozyme (Banerjee et al., 2011).

Amniotic and Allantoic Fluids are Likely to be Involved in Digestive Processes

The impact of the AmF properties on the EW components and activities after its transfer into the amniotic sac is still unknown, as well as the physiological role of both the AlF and the AmF in EW assimilation (Figure 1B). Even if the allantoic sac has been referred to as a diverticulum of the embryo's intestine (Romanoff, 1960; Freeman and Vince, 1974), its contribution as a digestive organ has not been explored yet. In this context, we studied the proteolytic activities of the 2 extraembryonic fluids to better appreciate their involvement in the EW protein degradation, which is essential to generate free amino acids that are further assimilated by the embryo. AmF, AlF, and EW proteolytic activities were first analyzed in gel using gelatin zymography (Figure 2D, 2E, 2F, respectively) at a pH value of 7.5 corresponding to the physiological pH measured previously in biological samples (Figure 3B). In these conditions, we expected to detect activities of endogenous serine proteases and some metalloproteases but not cysteine or aspartic proteases (which are essentially active in reducing and acidic conditions, respectively). It has to be noticed that the AmF ED12 to 16 and EW fractions have been diluted before gel analysis because of their high protein concentrations. Only 4 proteolytic bands appeared in the AmF fractions from ED8 to ED11 (Figure 2D, 250, 140, 85, 50 kDa) vs. 8 for the AlF fractions from ED8 to ED14 (Figure 2E, 250, 140, 85, 53, 45, 40, 38 kDa) with 3 additional bands at ED16 (75, 70, and 30 kDa). The global signal of both fluids tends to increase slightly during development. However, proteolytic bands detected in AmF disappear after EW transfer at ED12 to 16 (Figure 2D). Interestingly, in comparison with the EW at ED12 to 16 (Figure 2F), the AmF samples seemed to retain low proteolytic activity, with slight lysis bands around a darker one (Figure 2D, ED12 to 16). But, since these samples have been diluted before testing, the reduced activity at these stages might rather reflect sample dilution. To test this hypothesis, the proteolytic activities of AmF and EW samples were measured in solution using first N-(p-Tosyl)-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilide as a chromogenic peptide substrate for serine proteases with trypsin-like activities (Figure 4A and 4C, respectively). In-solution assays using these peptidic substrates are complementary to zymographies, since the latter reveal only proteases with gelatinolytic activities but also zymogen/precursor forms of proteases that are normally inactive in solution. A first test using the same protein quantity as that used for zymographies (Figure 2D) did not reveal any trypsin-like activity in the AmF ED12 to 16 fractions (data not shown). But, using crude samples, we were able to demonstrate a trypsin-like activity in the AmF ED12 to 16 fractions (Figure 4A). Surprisingly, in AmF and EW crude samples, lower trypsinlike activity was detected in AmF ED8 to 11 samples as compared with AmF ED12 to 16 samples that received EW (Figure 4A, Table 3), while no trypsin-like activity was noticed in EW samples (Figure 4C). This reveals that the EW protease inhibitors do not seem to inhibit AmF protease activity, which is quite surprising considering that EW ovomucoid and ovoinhibitor



Figure 4. Measurements of trypsin-like activities of the amniotic fluid (A), the allantoic fluid (B) and the egg white (C) of the chicken egg from embryonic day 0 (ED0) to 16 (ED16). Absorbance due to paranitroaniline release after hydrolysis of the substrate N-(p-Tosyl)-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilide was measured at 410 nm during 20 min at 37°C. Three independent crude samples were used per stage.

are potent inhibitors of trypsin-like enzymes (Saxena and Tayyab, 1997). In contrast, the mix between the AmF and the EW seemed to enhance the trypsin activity (Table 3). On the other hand, an in vitro mix of AmF and EW at ED11 for 24 h at 37°C to reproduce in vivo mixing of AmF and EW as seen in ED12 sample revealed no trypsin activity (data not shown). This observation suggests additional in vivo mechanisms, such as the possible secretion of proteases by the surrounding membranes to stimulate AmF proteolytic activities, or activation of precursors of EW proteases by membrane-bound proteases during their transfer into

Table 3. Measurements of trypsin-like activities of the amniotic fluid, the allantoic fluid, and the egg white of the chicken egg from embryonic days 0 to 16 (ED0-16) expressed as hydrolysis rates, optical density/hours (mean slopes \pm SD). Absorbance due to paranitroaniline release after hydrolysis of the substrate N-(p-Tosyl)-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilide was measured at 410 nm during 20 min at 37°C. Three independent crude samples were used per stage.

	ED0	ED8	ED10	ED11	ED12	ED14	ED16
Amniotic fluid Allantoic fluid Egg white	- 0.056 (±0.013) ^a	$\begin{array}{c} 0.069 \ (\pm 0.053)^{\rm a} \\ 0.10 \ (\pm 0.041)^{\rm a} \\ 0.019 \ (\pm 0.021)^{\rm a} \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.022 \ (\pm 0.021)^{\rm a} \\ 0.13 \ (\pm 0.036)^{\rm a} \\ 0.021 \ (\pm 0.022)^{\rm a} \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.094 \ (\pm 0.061)^{\rm a} \\ 0.16 \ (\pm 0.063)^{\rm a} \\ 0.034 \ (\pm 0.061)^{\rm a} \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.61 \ (\pm 0.18)^b \\ 0.23 \ (\pm 0.14)^a \\ 0.021 \ (\pm 0.041)^a \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.79~(\pm0.26)^{\rm b}\\ 0.29~(\pm0.10)^{\rm a}\\ 0.078~(\pm0.11)^{\rm a} \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.71 \ (\pm 0.088)^{\rm b} \\ 0.55 \ (\pm 0.13)^{\rm b} \\ 0.49 \ (\pm 0.28)^{\rm b} \end{array}$

^{a,b}Values express significant differences between stages, for each fluid (P > 0.05).

Table 4. List of the proteases identified by mass spectrometry analysis in the amniotic and allantoic fluids at d 11 and 16 of development, respectively. Proteases are classified according to their presence in the amniotic fluid first, and then, for the allantoic fluid, by their molecular weight (MW), in decreasing order. Normalized total spectra (TS $_{\rm N}$) and emPAI (emPAI $_{\rm N}$) values for each fluid correspond to "Gel bands" column letters.

							Allanto	ic fluid	An	nniotic f	luid
Gene ID	Gene name	Protein accession number	Protease name	Protease type	MW (kDa)	Gel bands	TS $_N$	emPAI _N	Gel bands	TS $_N$	em PAI _N
428320	TMPRSS9	XP_425880.4	Transmembrane protease serine 9	Serine endopeptidase	120	J	4	0.13	C, D	11;7	0.243; 0.311
419731	ST14	XP_004948038.1	Suppressor of tumorigenicity 14 protein isoform X3	Serine endopeptidase	92	B; C	16;3	0.68; 0.11	В	7	0.363
421580	PLG	XP_419618.2	Plasminogen	Serine endopeptidase	91	В	38	1.44	В	8	0.371
417843	CPM	NP_001186554	Carboxypeptidase M precursor	Metallopeptidase, Carboxypeptidase	50	C; D; E	6,4,3	0.36; 0.17; 0.16	Between C and D	5;5	0.240; 0.748
423176	ASTL	NP_001292019.1	Astacin-like metalloendopeptidase precursor	Metalloendopeptidase	46	E	2	0.17	Between C and D	4	0.516
395667	ANPEP	ACZ95799.1	Aminopeptidase N	Metallopeptidase, Aminopeptidase	109	A	14	0.31	-	-	-
424187	DPP4	NP_001026426.2	Dipeptidyl peptidase-4	Serine peptidase, Aminopeptidase	86	A	3	0.15	-	-	-
422060	MEP1A	NP_001264650.1	Meprin A subunit alpha precursor	Metalloendopeptidase	80	A	7	0.24	-	-	-
386583	MMP2	NP_989751.1	72 kDa type IV collagenase preproprotein	Metalloendopeptidase	75	E	3	0.10	-	-	-
395306	F2	NP_989936.1	Prothrombin precursor	Serine endopeptidase	69	С	20	0.95	-	_	-
422876	HGFAC	XP_420819.4	Hepatocyte growth factor activator	Serine endopeptidase	66	C; J	26;12	1.01; 0.26	-	-	-
395876	F10	NP_990353.1	Coagulation factor X precursor	Serine endopeptidase	53	С	8	0.56	_	-	-

the amniotic sac. Moreover, the pH cannot explain this increased activity (some proteases are activated at a specific pH), since the EW and AmF pHs were of similar values (around 7.5) before they mixed (Figure 3B). As for other serine protease activities, no chymotrypsinlike activity was detected in the samples studied in the present work using N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe pnitroanilide as the substrate and chymotrypsin as the control (data not shown).

Unlike the AmF, the AlF proteolytic activities increased throughout the period studied for in-gel and in-solution assays (Figure 2E and 4B, respectively; Table 3). These data suggest either an increase in the AlF protease concentrations or their progressive activation during incubation. Presence of activators, changes in physicochemical parameters, or inactivation of inhibitors constitute potential hypotheses to explain these observations. But, since specific bands related to metalloproteases appeared on the zymogram in the late stages of the development (75 and 70 kDa), a change in the protein content also should be investigated.

To identify proteases responsible for the proteolytic activities on the AmF and AlF zymograms, each band was cut on the corresponding SDS-PAGE (corresponding bands on figures 2D and 2E, respectively), and further analyzed by mass spectrometry (Table S1). Surprisingly, for the AmF, the first and most intense lysis band at 250 kDa did not correspond to any known pro-

teases, likely due the presence of highly abundant proteins, including immunoglobulins Y (Table 1, Gel band #1), which interferes with the identification of minor proteins. The other lysis bands were associated with the proteolytic activity of suppressors of tumorigenicity 14 (ST14), plasminogen (PLG), and/or transmembrane protease serine 9 (TMPRSS9) (see Table 4 for detailed bands attribution). Two additional proteases were identified at approximately 60 kDa: carboxypeptidase M (CPM) and astacin-like metalloendopeptidase precursors (ASTL), but did not correspond to any lysis band, suggesting that they were inactive in the fluid or inactive against gelatin substrate at this pH. These 5 proteases also were identified in the AlF, with 7 additional proteases, which seemed specific to the AlF: aminopeptidase N (ANPEP), dipeptidyl peptidase 4 (DPP4), meprin A subunit alpha precursor (MEP1A), prothrombin precursor (F2), hepatocyte growth factor activator (HGFAC), coagulation factor X precursor (F10), and 72 kDa type IV collagenase preproprotein (MMP2) (see Table 4 for detailed bands attribution). Some serine proteases have already been identified as active in the AlF (Kandeil et al., 2014), such as F2 and F10, which are assumed to be responsible for the cleavage and activation of pathogenic virus in viral culture assay in chicken AlF (Gotoh et al., 1990; Ogasawara et al., 1992; Wanitchang et al., 2010). Of all these proteases, 4 are known to be digestive enzymes in chicken embryo and/or adult: ANPEP, DPP4, MEP1A, and MMP2 (Packialakshmi et al., 2014; Recoules et al., in press), which suggests that the allantois may be a digestive organ. In addition, since the AlF pH decreases in the last stages of the development (Boutilier et al., 1977) to reach intestinal pH value, optimal conditions can be found in the allantois for protein pre-digestion. Nonetheless, additional experiments are needed to explore whether these proteases are secreted by the embryo intestine or by the CAM.

On the other hand, 2 additional functions in anatomical structure morphogenesis and blood vessels remodeling have been suggested for both the AmF and AlF proteases identified in the present study. Indeed, MMP2 is involved in feather morphogenesis (Jiang et al., 2011), while HGFAC participates in the gastrointestinal tract and kidney morphogenesis (Matsubara et al., 1998; van Adelsberg et al., 2001). ST14 and ASTL are found in neural tube and are assumed to participate in its closure (Szabo et al., 2009; Acloque et al., 2012). Furthermore, PLG and F2 and their potential activators, TMPRSS9 and F10, are known to be associated with blood vessels remodeling (Lijnen, 2001; Archiniegas et al., 2004), as well as MMP2 (Ribatti et al., 1999). The presence of a well-developed capillary plexus on the CAM could explain their presence in the AlF, but the presence of PLG in the AmF still remains unclear.

It seems that some of these proteolytic enzymes have already been found in the AmF of other species, including human (Cho et al., 2007; Michaels et al., 2007), supporting the hypothesis of a specific role of these enzymes in the embryonic development, regardless of the species, oviparous or viviparous. Altogether, these data open new horizons to define more precisely the role of extraembryonic structures in the development and the growth of the avian embryo.

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1. List of proteins identified by mass spectrometry analysis in amniotic and allantoic fluids at ED11 and ED16, respectively.

Supplementary data are available at *PSCIEN* online.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Maryse Mills, Justine Renault, and Magali Chessé for their excellent technical assistance. We wish to thank Thierry Moreau for his comments and his careful reading of the present manuscript, and Lucie Combes-Soia who conducted the high-resolution mass spectrometry analysis of gel filtration fractions (PRC, CNRS, IFCE, INRA, University of Tours, 37380, Nouzilly, France). The high-resolution mass spectrometer was financed (SMHART project) by the European Regional Development Fund (ERDF), the Conseil Régional du Centre, the French National Institute for Agricultural Research (INRA) and the French National Institute of Health and Medical Research (Inserm). We thank Joël Delaveau and Christophe Rat (INRA, UE-PEAT609, F-37380 Nouzilly, France) for providing fertilized Isa-brown eggs. We thank Région Centre - Val de Loire, France for financing M. Da Silva's PhD.

REFERENCES

- Acloque, H., F. Lavial, and B. Pain. 2012. Astacin-like metalloendopeptidase is dynamically expressed in embryonic stem cells and embryonic epithelium during morphogenesis. Dev. Dyn. 241:574–82.
- van Adelsberg, J., S. Sehgal, A. Kukes, C. Brady, J. Barasch, J. Yang, and Y. Huan. 2001. Activation of hepatocyte growth factor (HGF) by endogenous HGF activator is required for metanephric kidney morphogenesis in vitro. J. Biol. Chem. 276:15099–15106.
- Archiniegas, E., C. Y. Neves, D. Candelle, and J. E. Cardier. 2004. Thrombin and its protease-activated receptor-1 (PAR1) participate in the endothelial-mesenchymal transdifferentiation process. DNA Cell Biol. 23:815-825.
- Banerjee, P., K. M. Keener, and V. D. Lukito. 2011. Influence of carbon dioxide on the activity of chicken egg white lysozyme. Poult. Sci. 90:889–95.
- Bauer, R., J. A. Plieschnig, T. Finkes, B. Riegler, M. Hermann, and W. J. Schneider. 2013. The developing chicken yolk sac acquires nutrient transport competence by an orchestrated differentiation process of its endodermal epithelial cells. J. Biol. Chem. 288:1088– 1098.
- Bourin, M., J. Gautron, M. Berges, Y. Nys, and S. Rehault-Godbert. 2012. Sex- and tissue-specific expression of "similar to nothepsin" and cathepsin D in relation to egg yolk formation in Gallus gallus. Poult. Sci. 91:2288–2293.
- Boutilier, R. G., M. A. Gibson, D. P. Toews, and W. Anderson. 1977. Gas exchange and acid-base regulation in the blood and extraembryonic fluids of the developing chicken embryo. Respir. Physiol. 31:81–89.
- Carinci, P., and L. Manzoli-Guidotti. 1968. Albumen absorption during chick embryogenesis. J. Embryol. Exp. Morphol. 20:107–18.
- Cho, C.-K. J., S. J. Shan, E. J. Winsor, and E. P. Diamandis. 2007. Proteomics analysis of human amniotic fluid. Mol. Cell. Proteomics 6:1406–15.
- Cirkvenčič, N., M. Narat, P. Dovč, and D. Benčina. 2012. Distribution of chicken cathepsins B and L, cystatin and ovalbumin in extra-embryonic fluids during embryogenesis. Br. Poult. Sci. 53:623–30.
- Cordeiro, C. M. M., and M. T. Hincke. 2016. Quantitative proteomics analysis of eggshell membrane proteins during chick embryonic development. J. Proteomics 130:11–25.
- D'Ambrosio, C., S. Arena, A. Scaloni, L. Guerrier, E. Boschetti, M. E. Mendieta, A. Citterio, and P. G. Righetti. 2008. Exploring the chicken egg white proteome with combinatorial peptide ligand libraries. J. Proteome Res. 7:3461–74.
- Everaert, N., H. Willemsen, E. Willems, L. Franssens, and E. Decuypere. 2011. Acid-base regulation during embryonic development in amniotes, with particular reference to birds. Respir. Physiol. Neurobiol. 178:118–28.
- Freeman, B. M., and M. A. Vince. 1974. Development of the Avian Embryo. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Gabrielli, M. G., and D. Accili. 2010. The chick chorioallantoic membrane: A model of molecular, structural, and functional adaptation to transpithelial ion transport and barrier function during embryonic development. J. Biomed. Biotechnol. 2010:940741.
- Geelhoed, S. E., and J. L. Conklin. 1966. An electrophoretic study of proteins in chick embryonic fluids. J. Exp. Zool. 162:257–261.
- Gotoh, B., T. Ogasawara, T. Toyoda, N. M. Inocencio, M. Hamaguchi, and Y. Nagai. 1990. An endoprotease homologous to the blood clotting factor X as a determinant of viral tropism in chick embryo. EMBO J. 9:4189–95.
- Guyot, N., V. Labas, G. Harichaux, M. Chessé, J.-C. Poirier, Y. Nys, and S. Réhault-Godbert. 2016. Proteomic analysis of egg white heparin-binding proteins: Towards the identification of natural antibacterial molecules. Sci. Rep. 6:27974.

- Jiang, T.-X., T. L. Tuan, P. Wu, R. B. Widelitz, and C.-M. Chuong. 2011. From buds to follicles: Matrix metalloproteinases in developmental tissue remodeling during feather morphogenesis. Differentiation. 81:307–14.
- Kandeil, A., O. Bagato, H. Zaraket, J. Debeauchamp, S. Krauss, R. El-Shesheny, R. J. Webby, M. A. Ali, and G. Kayali. 2014. Proteolytic enzymes in embryonated chicken eggs sustain the replication of egg-grown low-pathogenicity avian influenza viruses in cells in the absence of exogenous proteases. J. Virol. Methods 202:28–33.
- Lijnen, H. R. 2001. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. Thromb. Haemost. 86:324–33.
- Liu, Y., N. Qiu, and M. Ma. 2013. Comparative proteomic analysis of hen egg white proteins during early phase of embryonic development by combinatorial peptide ligand library and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight. Poult. Sci. 92:1897–904.
- Mann, K. 2007. The chicken egg white proteome. Proteomics 7:3558– 3568.
- Mann, K., and M. Mann. 2008. The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. Proteomics 8:178–191.
- Marie, P., V. Labas, A. Brionne, G. Harichaux, C. Hennequet-Antier, A. B. Rodriguez-Navarro, Y. Nys, and J. Gautron. 2015. Quantitative proteomics provides new insights into chicken eggshell matrix protein functions during the primary events of mineralisation and the active calcification phase. J. Proteomics 126: 140–154.
- Matsubara, Y., M. Ichinose, N. Yahagi, S. Tsukada, M. Oka, K. Miki, S. Kimura, M. Omata, K. Shiokawa, N. Kitamura, Y. Kaneko, and H. Fukamachi. 1998. Hepatocyte growth factor activator: A possible regulator of morphogenesis during fetal development of the rat gastrointestinal tract. Biochem. Biophys. Res. Commun. 253:477–484.
- McIndoe, W. 1960. Changes in the protein content of yolk during chick embryogenesis. J. Embryol. Exp. Morphol. 8:47–53.
- Michaels, J.-E. A., S. Dasari, L. Pereira, A. P. Reddy, J. A. Lapidus, X. Lu, T. Jacob, A. Thomas, M. Rodland, C. T. Roberts, M. G. Gravett, and S. R. Nagalla. 2007. Comprehensive proteomic analysis of the human amniotic fluid proteome: gestational agedependent changes. J. Proteome Res. 6:1277–85.
- Moran, E. T. 2007. Nutrition of the developing embryo and hatchling. Poult. Sci. 86:1043–1049.
- Ogasawara, T., B. Gotoh, H. Suzuki, J. Asaka, K. Shimokata, R. Rott, and Y. Nagai. 1992. Expression of factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo. EMBO J. 11:467–72.
- Omana, D. A., Y. Liang, N. N. V Kav, and J. Wu. 2011. Proteomic analysis of egg white proteins during storage. Proteomics 11: 144–53.
- Packialakshmi, B., R. Liyanage, K. S. Rasaputra, J. O. Lay, and N. C. Rath. 2014. Isolation and characterization of chicken bile matrix metalloproteinase. Poult. Sci. 93:1495–502.

- Palazón, L. S., and A. Rodríguez-Burgos. 1993. Protein synthesis by chick (Gallus domesticus) extraembryonic membranes. Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem. 104:689–693.
- Recoules, E., H. Sabboh-Jourdan, A. Narcy, M. Lessire, G. Harichaux, V. Labas, M. Duclos, and S. Réhault-Godbert. Exploring the in vivo digestion of plant proteins in broiler chickens. Poult. Sci. In press DOI: https://doi.org/10.3382/ps/pew444 Réhault-Godbert, S., J. Gautron, V. Labas, M. Belghazi, and Y.
- Réhault-Godbert, S., J. Gautron, V. Labas, M. Belghazi, and Y. Nys. 2008. Identification and characterization of the precursor of chicken matrix metalloprotease 2 (pro-MMP-2) in hen egg. J. Agric. Food Chem. 56:6294–6303.
- Ribatti, D., B. Nico, A. Vacca, M. Iurlaro, and L. Roncali. 1999. Temporal expression of the matrix metalloproteinase MMP-2 correlates with fibronectin immunoreactivity during the development of the vascular system in the chick embryo chorioallantoic membrane. J. Anat. 195:39-44.
- Romanoff, A. L. 1960. The Avian Embryo. Structural and functional development. The Macmillan Compagny, New York.
- Romanoff, A. L., and A. J. Romanoff. 1967. Biochemistry of the Avian Embryo: A Quantitative Analysis of Prenatal Development. John Wiley & Sons, Inc., London, Sydney.
- Saxena, I., and S. Tayyab. 1997. Protein proteinase inhibitors from avian egg whites. Cell. Mol. Life Sci. 53:13-23.
- Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal. Chem. 68:850–8.
- Speier, J. S., L. Yadgary, Z. Uni, and E. A. Wong. 2012. Gene expression of nutrient transporters and digestive enzymes in the yolk sac membrane and small intestine of the developing embryonic chick. Poult. Sci. 91:1941–9.
- Sugimoto, Y., S. Sanuki, S. Ohsako, Y. Higashimoto, M. Kondo, J. Kurawaki, H. R. Ibrahim, T. Aoki, T. Kusakabe, and K. Koga. 1999. Ovalbumin in developing chicken eggs migrates from egg white to embryonic organs while changing its conformation and thermal stability. J. Biol. Chem. 274:11030–7.
- Szabo, R., J. P. Hobson, K. Christoph, P. Kosa, K. List, and T. H. Bugge. 2009. Regulation of cell surface protease matriptase by HAI2 is essential for placental development, neural tube closure and embryonic survival in mice. Development 136:2653–63.
- Wanitchang, A., S. Wongwisarnsri, S. Yongkiettrakul, and A. Jongkaewwattana. 2010. Extraction of catalytically active neuraminidase of H5N1 influenza virus using thrombin proteolytic cleavage. J. Virol. Methods 163:137-143.
- Yadgary, L., E. A. Wong, and Z. Uni. 2014. Temporal transcriptome analysis of the chicken embryo yolk sac. BMC Genomics 15:690.
- Yadgary, L., R. Yair, and Z. Uni. 2011. The chick embryo yolk sac membrane expresses nutrient transporter and digestive enzyme genes. Poult. Sci. 90:410-6.
- Yoshizaki, N., Y. Ito, H. Hori, H. Saito, and A. Iwasawa. 2002. Absorption, transportation and digestion of egg white in quail embryos. Dev. Growth Differ. 44:11–22.

Refer to Figure 2 for bands numbers and letters TS Normolised Trotal S most set EmD AL Normolised EmD AT			Bands#	land#A	Band	#B	Band	#C	Bane	1#2	Bane	1#3	Bands#4	and # D	Bane	1#5	Banc	9#
Protein Name	NCBI-Accession	Molecular	TS_N	EmP AI _N	TS _N	EmP AI _N	TS_N	EmPAI _N	TS_N	Em P AI _N	TS _N	EmP AI _N	TS_N	EmP AI _N	TS_N	EmPAI _N	TS_N	EmPAI _N
lg gamma chain (clone 36) - chicken (fragment) [Gallus gallu	Version S00390	54kDa	116	3.0627	9.3463	0.41877	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of Rec Name : Full=Ov albumin; Alt Name : Full=Allerger	P01012.2	43 kDa	59	1.4571	161.56	6.4805	221.31	8.1682	27.148	1.2236	0	0	0	0	827.47	19.29	323.51	5.6598
Cluster of PREDICTED: fibronectin isoform X4 [Gallus gallus]	XP_015144618.1	264kDa	51	0.32432	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of a polipoprotein B precursor [Gallus gallus]	NP_001038098.1	523kDa	47	0.26627	0	0	0	0	6.0329	0.03251	5.2504	0.043284	7.3025	0.070024	0	0	0	0
Cluster of immunoglobulin heavy chain variable region, parti	CA079252.1	13 kDa	38	3.4811	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P REDICTED: ovost at in [Gallus gallus]	XP_423478.5	170kDa	32	0.31788	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P REDICTED: uncharacterized protein LOC 101998036 [Micro	XP_013204527.1	208kDa	31	0.25634	18.693	0.32239	7.5019	0.067286	2.011	0.054723	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of glypican-1precursor [Gallusgallus]	NP_001291989.1	61kDa	29	1.4358	6.6759	0.56491	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of Chain H, Structure Of The Anti-ptau Fab (pt 231/ps	4GLR_H	24kDa	25	1.1573	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of PREDICTED: alpha-enolase isoform X2 [Gallus gall	XP_015152320.1	47kDa	15	1.1144	6.6759	0.48175	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P REDICTED: mucin-16 [Gallus gallus]	XP_015155310.1	110 kDa	12	0.29231	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of Chain A, Crystal Structure Of P km2 Mutant	4YJ 5_A	57kDa	п	0.58999	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of Chain A, Crystal Structure Of Aluminum-Bound O	2D31_A	76kDa	6	0.58946	68.095	2.8582	196.3	6.6531	710.87	22.138	546.04	12.149	127.79	3.0436	0	0	0	0
P REDICTED: mesothelin-like protein [Gallus gallus]	XP_001234087.3	78kDa	6	0.27285	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
immunoglobulinlight-chain VI region, partial [Gallus gallus]	AAA48908.1	10 kDa	~	2.6007	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of lysozyme [Gallus gallus]	630460A	14 kDa	5	1.741	0	0	5.0013	1.1731	0	0	3.9378	1.912	12.779	3.0933	0	0	0	0
Cluster of Rec Name: Full=Alpha-fet oprotein; Alt Name: Full=	P 84407.1	71kDa	5	0.3023	0	0	13.754	0.42926	53.29	0.79187	227.08	2.7903	3 12. 18	3.154	4.949	0.20755	0	0
P REDICTED: leucine-rich repeat neuronal protein 4 [Gallus g	XP_425260.3	87kDa	5	0.24371	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ovomacroglobulin, ovostatin [Gallus gallus]	CAA55385.1	164kDa	5	0.12542	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of vitellogenin [Gallus gallus]	AAA49139.1	205kDa	4	0.10151	0	0	3.751	3.7363	0	0	0	0	0	0	0	0	43.397	9.5532
P REDICTED: plasminogen [Gallus gallus]	XP_419618.2	91kDa	0	0	8.0111	0.37089	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HEMCAM [Gallusgallus]	CAA70081.1	64 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16.827	0.48396	18.411	0.28235
Chain A, Transthyretin (Formerly Known As Prealbumin)	ITFP_A	14 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	56.548	9.0441
a xonal surface protein [Gallus gallus]	AAA48602.1	66kDa	0	0	17.357	0.7146	6.2516	0.21909	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
celladhesion molecule [Gallus gallus]	AAA82572.1	98kDa	0	0	0	0	16.254	0.30199	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of carboxypeptidase Mprecursor [Gallus gallus]	NP_001186554.1	50kDa	0	0	0	0	0	0	5.0274	0.23971	5.2504	0.74792	0	0	0	0	0	0
se ma phorin-7 A precursor [Gallus gallus]	NP_001186678.1	72 kDa	0	0	0	0	3.751	0.19977	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P REDICTED: plasma protease C1 inhibitor [Gallus gallus]	XP_003641424.1	54kDa	0	0	30.709	1.4169	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of ovalbumin-related Y[Gallus gallus]	BAMI3279.1	44kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	43.815	1.3903	0	0	0	0
Cluster of vitamin D-binding protein precursor [Gallus gallus	NP_990213.1	54kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.3025	1.5351	0	0	0	0
Cluster of annexin A2 [Gallus gallus]	NP_990682.1	39 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13.151	0.66174
Cluster of L-lactate dehydrogenase B chain[Gallus gallus]	NP_989508.1	36kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.8904	0.38607
Cluster of gelsolin precursor [Gallus gallus]	NP_990265.1	86kDa	0	0	0	0	2.5006	0.1664	0	0	0	0	0	0	11.878	0.25984	0	0
P IT54 protein precursor [Gallus gallus]	NP_997063.1	51kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	45.641	1.1782	0	0	0	0
Cluster of hepatic alpha-amylase [Gallus gallus]	AAT34994.1	58kDa	0	0	0	0	2.5006	0.25135	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of SP ARC, partial [Anas platyrhynchos]	EOB07950.1	32 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.9796	0.48095	71.014	2.7012
beta-galactosidase preproprotein[Gallus gallus]	NP_001265076.1	73 kDa	0	0	4.0056	0.3017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P REDICTED: suppressor of tumorigenicity 14 proteinisoform	XP_004948038.1	92 kDa	0	0	6.6759	0.36341	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P REDICTED: transmembrane protease serine 9 isoform XI [G	XP_425880.4	120kDa	0	0	0	0	11.253	0.24309	0	0	0	0	7.3025	0.31083	0	0	0	0
Cluster of vitellogenin-1 precursor [Gallus gallus]	NP_001004408.1	211kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.9184	0.10258	88.11	0.18924
glucose-6-phosphate isomerase [Gallus gallus]	NP_001006128.1	62 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.4769	0.61329	0	0	0	0
Cluster of PREDICTED: beta-actin-like protein 2 [Nannospal	XP_008830814.1	42 kDa	0	0	4.0056	0.54604	0	0	0	0	2.6252	0.57726	0	0	0	0	0	0
astacin-like metalloendopeptidase precursor [Gallus gallus]	NP_001292019.1	46kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	3.9378	0.51575	0	0	0	0	0	0
Cluster of serum albumin precursor [Gallus gallus]	NP_990592.2	70kDa	0	0	0	0	0	0	2.011	0.16757	9.1882	0.70816	282.97	6.0935	9.898	0.56843	5.2603	0.18864
P REDICTED: he mopexin [Gallus gallus]	XP_015136422.1	50kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21.908	1.2.1	0	0	0	0
Cluster of PREDICTED: a cidic mammalian chitinase [Gallus g	XP_015154454.1	43kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20.082	1.5612	11.878	0.54337	39.452	0.72321
P REDICTED: 4F2 cell-surface antigen heavy chain, partial [C	XP_015130357.1	20kDa	0	0	0	0	2.5006	0.81653	3.0164	1.0967	0	0	0	0	0	0	0	0

Supplementary Data 1 - Protéines identifiées dans le fluide amniotique (page 83) et le fluide allantoïque (pages 84 à 86) de l'œuf de poule à ED11 et 16 respectivement.

Refer to Figure 2 for bands numbers and let TS _N : Normalized Total Spectra: EmPAIN: N	ters ormalized EmPAI		Bands	s#1and	Ban	d # B	Band	#C	Bands# #1	2 and 1	ands#3 #E	and	3and#4	Banc	ls#5an #F	d Band	- 9#	3ands#6 #H	and E	ands#7	and	Band#	8	sand#J	Ban	6#P	Band	# 10
Protein Name	VCBI-Accession version	Mole cular Weight	TS_{N}	EmPA	TSN	EmPA Iv	TS_N	EmPA Is	TSN	3mPA Iv	TS _N En	PA TS	EmP	A TS _N	EmP	A TS _N	EmPA Iv	TS _N Er	nPA Iv	IS _N En	PA T	S _N En	PA TS	EmPA N Iv	TS _N	EmPA Iv	TSN	∃mPA Iv
Cluster of apolipoprotein B precursor [Ga	NP_001038098.1	523 kDa	459.30	5 1.1054	98.397	0.9806	17.679	.08500	0	0	.1157 0.0	14412.2	5021.037	165 0	0	10.2060	.24305 3	.7021).0	1948:	0	. 0	0	0	. 0	0	0	0	0
Cluster of PREDICTED: fibronectin isofor	XP_015144618.1	264 kDa	182.97	1.1671	9.5223	3 0.35 18:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 0	0	0	0	0	0
Ig gamma chain (clone 36) - chicken (frag	S 00390	54 kDa	58.67	5 2.3524	4 19.045	1.853	3.7218	0.19896	0	0	0	0	0	0	0	0	0	.2552 0.3	309352	5347).05	5294	0	0	•	0	0	0	0
Cluster of RecName: Full=Ovalbumin; Alt	P01012.2	43 kDa	39.37	4 1.6099	0	0	190.74	2.7212	29.912	.779033	4.298 0.8	164121.7	152 1.39	89 6.938	90.279	82 178.99	3.0192	398.9 11	1.323 7	11.82 25	.719 20	7.62 2.4	111.	23 2.734	14.263	0.2829	0	0
Cluster of PREDICTED: LOW QUALITYPR	XP_015129602.1	66 kDa	37.83	1.1284	•	0	0	0	0	0	0	0	•	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	•	•	0	0	0
Cluster of Chain A, Crystal Structure Of /	2D3LA	76 kDa	21.617	1.0321	1 79.353	3 2.7505	122.82	3.023	960.03	8.391	91 00.9	855 71.2	2.64	74 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of PREDICTED: tenascin isoform 2	XP_015134826.1	228 kDa	16.985	0.1863	9 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of complement C3 precursor [Ga]	NP_990736.1	184 kDa	16.213	0.2894	5 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of RecName: Full=Alpha-fetoprot	P84407.1	71kDa	15.44	1703.01	7 0	0	79.088.	.81562	71.219	.653032	94.96 4.3	8766 756	.81 13.3	32 193.6	6 0.822	34 63.589 0	.907452	2.212 0.	4982 4	2245).03	3970	0	0	0	0	0	0	0
aminopeptidase N[Gallus gallus]	ACZ95799.1	109 kDa	13.897	0.3072	9 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PREDICTED: transmembrane protease se	XP_425880.4	120 kDa	12.353	0.2759	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 3.53	312 0.1303	7 0	0	0	0
PREDICTED: periostin isoform XI [Gallus {	XP_015133077.1	96 kDa	10.808	0.5108	4 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	•	0	0	0
PREDICTED: mucin-16 [Gallus gallus]	XP_015155310.1	110 kDa	10.036	0.1761	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
fibulin-1precursor [Gallus gallus]	NP_989496.1	78 kDa	7.7203	3).4406	2 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
meprin A subunit alpha precursor [Gallus,	NP_001264650.1	80 kDa	6.948	3).2446	0 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of PREDICTED: LOWQUALITYPR	XP_015152746.1	436 kDa	6.9483	3 0.0723	244.438	30.2831	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2938).0	1256 16.	053).02	293 51.2	03 0.1263	0	0	0	0
PREDICTED: mesothelin-like protein [Ga	XP_001234087.3	78 kDa	4.6323	20.1643	8 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
collagen alpha-l(XII) chain precursor [Ga	NP_990352.2	340 kDa	4.6323	069301	0 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of apolipoprotein AI[Gallus gallus	1613168A	29 kDa	3.8602	2 1.0803	25.393	3 2.329	65.132	7.435	4.9853 (.311372	0579 0.2	876 (0	0	0	7.0655	0.6868 1	2.032 0.8	86445	06940.1	6536 16.	053 0.	739 60.0	31 4.2618	147.39	4.478	8.162 0	.75857
collagen alpha-1(VI) chain precursor [Gal	NP_990438.1	108 kDa	3.8602	20.1793	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of glypican-1precursor [Gallus ga	NP_001291989.1	61kDa	3.088	0.2119	2 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of serum albumin precursor [Gallt	NP_990592.2	70 kDa	3.088	0.1842	3 0	0	14.887	.40862	4.9853 (.116482	8.124 0.5	2557216	.02 8.09	93 1031	4 32.2	33 300.68	4.1562 1	20.32 2.	.1231 2	9.5710.3	1678 9.6	318 0.1	5466 15.8	3910.3509	0	0	0	0
dipeptidylpeptidase 4 [Gallus gallus]	NP_001026426.2	86 kDa	3.088	0.1481	9 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PREDICTED: alpha-2-macroglobulin-like	XP_004938161.2	162 kDa	3.088	0.1175	8 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PREDICTED: alpha-2-macroglobulin-like	XP_015154891.1	163 kDa	3.088	0.1167	6 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PREDICTED: ovomucin isoform XI [Gallus	XP_003641415.1	234 kDa	3.088	05356	5 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PREDICTED: alpha-2-macroglobulin-like	XP_013811678.1	161kDa	2.316	07799	9. 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 0	0	0	0	0	0
PREDICTED: mucin-19-like isoform XI [G	XP_015146939.1	209 kDa	2.316	05987	7 19.045	0.2942	5.5827	.074218	0	0	0	0	0	0	0	2.35521.	03806: 6	.4786).0	9.8666	7591).02	2656 23	544).0	5117: 30.0	016 0.1900	0	0	0	0
Cluster of PREDICTED: sushi, von Willebra	XP_015136185.1	402 kDa	2.316	360201	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
collagen alpha- l(III) chain precursor [Gal	NP_990711.2	139 kDa	1.544	09056	5: 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of lysozyme [Gallus gallus]	630460A	14 kDa	0	0	0	0	3.7218	.85925	0	0	.3719 0.6	365é (0	0	0	5.4954	1.1419	0	0	0	0	0	0	0	3.5658	0.33802	391.78	6.8979
Cluster of PREDICTED: alpha-enolase iso:	XP_015152320.1	47 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40.823	1.1629 8	.3297 0.	3549	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of vitellogenin [Gallus gallus]	AAA49139.1	205 kDa	0	0	19.045	0.4548	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 35	317 5.	7114 10.5	94).0756	•	0	0	0
PREDICTED: follistatin-related protein 1	XP_015730282.1	36 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.49540	.526024	.62760.3	30583	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of PREDICTED: growth arrest-spe	XP_015705002.1	78 kDa	0	0	0	0	3.7218	0.13526	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase pr	NP_001038151.1	50 kDa	0	0	0	0	13.026	.46185	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PREDICTED: vitamin K-dependent protei	XP_416641.2	74 kDa	0	0	0	0	18.609	.56383	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PREDICTED: plasminogen [Gallus gallus]	XP_419618.2	91kDa	0	0	38.085	9 1.4384	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PREDICTED: he parin cofactor 2 [Gallus g.	XP_001232767.1	56 kDa	0	0	0	0	14.887	.52682	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hemoglobin subunit epsilon [Gallus gallus	NP_001075173.1	17 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.5344	.0447
neuron-glia cell adhesion molecule (Ng-C	CAA99303.1	138 kDa	0	0	31.741	0.4479	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
fructose-bisphosphate aldolase B [Gallus	NP_001007978.1	39 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.139 0.3	3285	0	0 0	0	0	0	0	0
HEMCAM[Gallusgallus]	CAA70081.1	64 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	.433).06	5746.	0	0	0	0	0	0	0
Chain A, Transthyretin (Formerly Known.	ITFP_A	14 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	.588 1.2	323 20	1.2 15	516 40.6	609 6.9916	•	0	0	0
Cluster of aminoimida zole -4-carboxamic	ABY55309.1	64 kDa	0	0	0	0	5.5827.	.29954	2.8488	.17434]	3.719 0.4	0987	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cadherin-7 precursor [Gallus gallus]	NP_989518.2	87 kDa	0	0	0	0	4.6523.	0.18378	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 0	0	0	0	0	0
inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain	NP_001124213.1	107 kDa	0	0	0	0	14.887	0.2565	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 0	0	0	0	0	0

alpha-globin-D[Gallus gallus]	AAA48584.1	16 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 4.5	344 1.11	5
aminotransferase, Asp [Gallus gallus]	0608196A	46 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.7021)	370183	.37961.0	9835	0	0	0	0	0	0	0	
hypotheticalprotein BRAFLDRAFT_1137	XP_002595117.1	56 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 5.4	413 0.162	39
Cluster of carboxypeptidase Mprecursor	NP_001186554.1	50 kDa	0	0	0	0	.5827).	35956 3.	561 0.1	5844 2.74	380.1599	3 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cluster of cystatin precursor [Gallus galh	NP_990831.2	16 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 14	4.2 5.152	5
fructose-bisphosphate aldolase C[Gallus	NP_001193425.1	39 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	.9143 0.	16195	0	0	0	0	0	0	0	
Cluster of PREDICTED: EGF-containing fi	XP_426097.3	51kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35.327	1.2717	22.2.12	89304	0	0	0	0	0	0	0	0	0 0	
PREDICTED: fibulin-7 [Gallus gallus]	XP_003640934.1	48 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 7	.49140.	17043	0	0	0	0	0	
PREDICTED: plasma protease C1 inhibitor	XP_003641424.1	54 kDa	0	0	5.393 1.	1731	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 0	
PREDICTED: antithrombin-III [Gallus gall	XP_422282.3	52 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.1402	.24924	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cluster of Chain A, The Siderocalin Ex-Fa	3SAO_A	18 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 37	6.79 19.	186 28	.114 1.37	15
Cluster of pigment epithelium-derived fa	NP_001244218.1	47 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30.617	.71257	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cluster of ovalbumin-related Y[Gallus ga	BAMI3279.1	44 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16.401	0.21752	64.374	1.1724	15.734 0	.7028	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
heart fatty acid binding protein [Gallus g	AFP 43354.1	15 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 4.5	344 0.703	94
lumic an precursor [Gallus gallus]	NP_001263286.1	39 kDa	0	0	0	0	0	0 6.4	097 0.2	2225 14.4	05 0.762	57.500	0.5629	8 1.2616	.08736	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Rab GDP dissociation inhibitor beta, parti	EMC89472.1	49 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.1402	0.16954	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
neuronal growth regulator 1 precursor [G	NP_990187.1	38 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.851)	28755	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
interleukin-6receptor subunit beta prect	NP_990202.1	102 kDa	0	0	0	0	4.887).	15505	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 0	
Cluster of vitamin D-binding protein prec	NP_990213.1	54 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	199.4	8.7406	32.393	.7151	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cluster of ezrin [Gallus gallus]	NP_990216.1	69 kDa	0	0	0	0	.44360.	15193	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 0	
Cluster of annexin A2 [Gallus gallus]	NP_990682.1	39 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.983 0.	49985	0	0	0	0	0 0	
retinol-binding protein 4 precursor [Gallu	NP_990569.1	23 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 95	.088 3.6	102	0	
hepatocyte growth factor-like protein pr	NP_990544.1	79 kDa	0	0	0	0	.3741).	27725	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	
riboflavin-binding protein precursor [Gal	NP_990794.1	27 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.264 0.	32219	56.5 1	9218	0		0 0	
cholinesterase precursor [Gallus gallus]	NP_989977.1	68 kDa	0	0	0	0	5.122 0.	72617	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0 0	
prothrombin precursor [Gallus gallus]	NP_989936.1	69 kDa	0	0	0	0	20.47 0	9509	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
72 kDa type IVcollagenase preproprotein	NP_989751.1	75 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0 2.74	38 0.103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
prostaglandin-H2 D-isomerase precursor	NP_989590.1	21kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21.187 0.	8377£83	.202 1.5	498	0	
Cluster of L-lactate dehydrogenase B ch	NP_989508.1	36 kDa	0	0	0	0	.7218 0.	30133	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.7766 0	.3018 5	.9143).(80.19 7	0.633 1	.1267 6	0.031 1.	0087	0	0	0 0	
ICOS ligand precursor [Gallus gallus]	NP_990415.1	33 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.1402	.25755	5.5531)	33245	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
coagulation factor Xprecursor [Gallus ga	NP_990353.1	53 kDa	0	0	0	0	.3741 D.	55882	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 0	
fatty acid-binding protein, brain [Gallusg	NP_990639.1	15 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 5.4	413 1.199	3
Cluster of gelsolin precursor [Gallus gallu	NP_990265.1	86 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.1402	.09458	14.808)	18708	0	0	0	0	0	0	0	0	.51 0.218	Ξ
apolipoprote in A-IVprecursor [Gallus gal]	NP_990269.1	41kDa	0	0	0	0	.8609).	26546	0	0	0	0	0	0	0	1.5701	0.206	0	0	01.39 2.	92.19 8	.56160.	28266	0	0	0	0	0	
vitronectin precursor [Gallus gallus]	NP_990392.1	52 kDa	0	0	.5223 1.	2423	0	0	0	0	0	21.75	2 0.7324	74.4157	.06419	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
collagen alpha-1(V) chain precursor [Gall	NP_990121.1	i	0	0	2.696	7	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PIT54 proteinprecursor [Gallus gallus]	NP_997063.1	51kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18.293	0.18208	3.9253	.16329	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cluster of hepatic alpha-amylase [Gallus	AAT34994.1	58 kDa	0	0	0	0	.7218 0.	18411	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
fetuin-B precursor [Gallus gallus]	NP_001264337.1	44 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.4206	0.2972	58.308 3	.3104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
serpin peptidase inhibitor, clade A(alpha	NP_001264421.1	48 kDa	0	0	0	0	0	0 2.1	366 0.1	7575 15.0	910.585	254.500	3 0.4452	0	0	9.4206	.61307	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cluster of serpin peptidase inhibitor, clad	NP_001264422.1	49 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.50(60.4351	0	0	3.1402	0.3686	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
protein AMBP precursor [Gallus gallus]	NP_001264627.1	38 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	.53471.0	7546	0	0	0	0	0	0	0 0	
Cluster of SPARC, partial [Anas platyrhy	EOB07950.1	32 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 3	9.5970.	96731	0	0	0	0	0	
cadherin-2 precursor [Gallus gallus]	NP_001001615.1	100 kDa	0	0	0	0	3.957 0	2737	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 4.5	344 0.135	66
Cluster of beta-2-glycoprotein 1 precurse	NP_001264923.1	39 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14.131	.34197	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
fructose-1,6-bisphosphatase 1[Gallus gal	NP_001264977.1	37 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.829).4	133622	3.5440.	791791	5.8910.	70845	0	0	0	
hemoglobin subunit beta [Gallus gallus]	NP_990820.1	16 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 18	138 2.23	46
PREDICTED: 3-hydroxybutyrate dehydrc	XP_420669.1	27 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 7	.06250.	63168	0	0	0	

P REDICTED: c ytokine-like protein 1 [Gall XP_4207	795.1 15 k	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11.7	1.1876
P REDICTED: anne xin A8 [Gallus gallus] XP_4210	646.1 37k	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22.953 1.3	093 (0	0	0
P REDICTED: type Illendosome membrant XP_4223	399.1 43 k	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.2808	0.1925	5 0	0	0	0	0
P REDICTED: alpha-2-HS -glycoprotein [(XP_422)	764.1 37k	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10.20	6).503	85 21.28	7 0.6503	28 0	0	0	0	0	0	0	0	0
PREDICTED: thioredoxin domain-contain XP_4159	925.1 14 k	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.348	2 0.74337
PREDICTED: uroplakin-3a [Gallus gallus] XP_0049380	099.1 29 k	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19.264	0.4280	2.29690.93	339é (0	0	0
P REDICTED: de smogle in-2 [Gallus gallus] XP_4260	083.4 1181	Da	0	0	0 12	.0960.	3083	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P REDICTED: angiotensinogen isoform X7 XP_0049355	549.1		0	0	-1 9.	3045	-1 15.	668	-1 35	- 67	0	7	0	0	0	7	0	7	0	7	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of PREDICTED: he patocyte growt XP_4208	819.4 66k	Da	0	0	0 24	5.053 1.	0106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11.772	0.2620	0 7	0	0	0	0
PREDICTED: tissue factor [Gallus gallus] XP_4266	640.2 32 k	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.1404	0.1686	4	0	0	0	0
P REDICTED: tyrosine - protein kinase rect XP_4224	400.4 127	(Da	0 19	.045 0.4	9101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PREDICTED: carboxypeptidase N subunit XP_425;	710.4 62 k	Da	0	0	0 6.	5132 0.2	6476	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P REDICTED: protocadherin-12 [Gallus ga XP_4145	518.4 1211	Da	0 12	.696 0.:	5136	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PREDICTED: suppressor of tumorigenicit XP_0049480	038.1 92k	Da	0 15	5.871 D.6	76912.	7914 0.	1284	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P REDICTED: thrombospondin-4 isoform Σ XP_0049372	375.1 105	(Da	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 3.5	5581.059	44, 0	0
Cluster of cadherin-11 precursor [Gallus g NP_001004.	371.1 88 k	Da	0	0	0 4	.314 0.0	89319.2	585 0.	595	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
lymphocyte antigen 86 precursor [Gallus NP_0010043	399.1 18 k	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.72(7 0.55984
Cluster of vitellogenin-1precursor [Gallu NP_0010044	408.1 2111	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.379	6).01296	50.295	.04819	: 5.29691.07	358.	0	0	0
procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dio NP_0010050	618.1 84 k	Da	0	0	0	.165 0.2	5954	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
alcoholdehydrogenase [NADP(+)] [Gally NP_0010065	539.1 37k	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.534	7).0783	0	0	0	0	0	0	0
hypothetical protein RCJ MB04_7p22 [Gi CAH652	209.1 64k	Da	0	0	0 1.	8609 0.1	6453	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B-cadherin, partial [Gallus gallus] CAA414	408.1 80k	Da	0	0	0	0	0 6.4	097 0.1	76712.0	579 0.14	959 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of chickentransferrin receptor [6 CAA390	035.1 86k	Da	0	0	0	1.87 0.9	0894	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
phosphatidylcholine-sterolacyltransfer: NP_0012800	023.1 53 k	Da	0	0	0	0	0	0	0 2.0	579 0.15	0 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cluster of PREDICTED: beta-actin-like pr XP_008830	814.1 42 k	Da	0 6.3	3482 1.5	563 5.	58270.3	5943	0	0	0	0	0	0	0	10.20	6 0	73.1	6 1.445	5 16.05	3 0.2482	0	0	0	0	0	0	0
beta-2 microglobulin, partial [Gallus gallt AAF35]	313.1 11k	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20.8	8 2.8111
e pididy mal secretory protein El precurso NP_0010262	374.1 16k	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 5.5	43 0.49	21 0	0
complement factor B-like protease [Gall 2002:	336A 27k	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12.842	0.2014	6 12.359 0.62	2596 (•	0	0
astacin-like metalloendopeptidase precu NP_001292	019.1 46k	Da	0	0	0	0	0	0	0 2.0	579 0.17	171 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	•	0	0
apovitellenin-1precursor [Gallus gallus] NP_9908	814.2 12 k	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	•	•	0	•	0	0	0	0	•	0	•	0	0	0	•	21.76	5 2.5271
ovoinhibitor precursor [Gallus gallus] NP_0010257	783.2 52 k	Da	0	0	0	0	0	0	0 10.	975 0.6	112 14.2	51 1.09	87 0	•	0	0	0	0	•	0	0	0	0	0	•	0	0
collagen alpha-3(VI) chain precursor [Ga NP_9908	865.2 340	Ĵ	0	0	0 2:	2.3310.	2421	0	0	0	0	0	0	•	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PREDICTED: vinculin isoform XI [Apteryx XP_013815(679.1 125	çDa	0 28	3.567 1.3	043	0	0	0	0	0	•	•	0	•	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	•	0	0
PREDICTED: cystatin-A[Gallus gallus] YP_4164	493.4 11k	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	•	•	0	•	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	•	9.97	8 1.0044
Cluster of P REDICTED: pantetheinase iso XP_0151395	595.1 55 k	Da	0	0	0	.957 0.4	3.1929 7.8	3410.1	2383 23.	323 0.61	114 27.0	020.73	147 0	•	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	•	0	0
PREDICTED: insulin-like growth factor-b XP_4205	577.4 33 k	Da		0	0	0	0	0	0	0	•	•	0	•	0	0	0	0	0	0	18.193	0.480	1 26.4840.79	9812 (•	0	0
PREDICTED: nidogen-2 isoform XI [Gallus XP_0151322	254.1 143	Ĝ	0	0	0	0	0	0	0	0	•	0	0	•	0	0	0	0	6.759	1).02914	₽ 8.5616	.0532	r 3.5312 0.10	0883 (•	0	0
P REDICTED: myocilin isoform XI [Gallus g XP_0151459	920.1 60 k	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	•	•	0	•	0	0	0	0	0	0	3.2106	.0866	0	0	•	0	0
Cluster of PREDICTED: interleukin-lrece XP_015147(073.1 54k	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	3.75	030.250	37 0	•	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	•	0	0
P REDICTED: cadherin-5 isoform XI[Gallu XP_0151479	985.1 87k	Da	0	0	0 2	.7740.9	0015	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P REDICTED: alpha-2-antiplasmin isoforn XP_0151515	526.1 58k	Da	0 53	3.96 1.7	7176 7.	44360.	8486	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P REDICTED: collage n alpha-1(XVI) chain: XP_015153.	313.1 160	(Da	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28.25 0.14	1794 (0	0	0
P REDICTED: peptidyl-prolylcis-transiso XP_0012313	333.3 38 k	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 4.7.	544 0.11	26 0	0
P REDICTED: natterin-3-like [Gallus gallu XP_0049507	772.2 41k	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.140	2 0.20	54 19.43	6 0.4160	5 0	0	0	0	0	0	0	0	0
PREDICTED: celladhesion molecule 4-lik XP_0049505	515.2 12 k	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.495	4 1.415	5 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PREDICTED: celladhesion molecule 4-lik XP_0151302	390.1 27k	Da	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.280	14 0.324	65 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
complement component C7 precursor [G NP_001305.	(331.1 93k	Da	0	0	0 7.	44360.2	3365	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Publication 2 : The unique features of proteins depicting the chicken amniotic fluid

Mylène Da Silva ‡, Clara Dombre §, Aurélien Brionne ‡, Philippe Monget §, Magali Chessé ‡, Marion De Pauw ‡, Maryse Mills ‡, Lucie Combes-Soia §¶, Valérie Labas §¶, Nicolas Guyot ‡, Yves Nys ‡, Sophie Réhault-Godbert ‡||

‡ INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France.

§ INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, CNRS, UMR 7247, Université François
Rabelais de Tours, IFCE, Nouzilly F-37380, France.

¶ INRA, Plateforme d'Analyse Intégrative des Biomolécules, Laboratoire de Spectrométrie de Masse, Nouzilly F-37380, France.

Mots clés : fluide amniotique, œuf de poule, protéomique, analyse fonctionnelle, activités antibactériennes, phylogénie, développement embryonnaire

- Résumé –

Chez la plupart des amniotes, le fluide amniotique protège l'embryon face aux agressions physiques (chocs, déshydratation, adhésion aux membranes) et microbiennes. Cette défense contre les pathogènes réside essentiellement dans la présence de protéines et de peptides antibactériens mis en évidence en particulier dans le fluide amniotique humain. Toutefois, la présence de telles protéines n'a jamais été vérifiée dans le fluide amniotique d'œuf d'oiseau, dans lequel l'embryon se développe indépendamment de la mère. Chez la poule, les premières études sur le contenu de ce fluide ont souligné les changements drastiques de sa composition protéique, apportés par le transfert du blanc d'œuf à partir du 12^{eme} jour d'incubation. En revanche, à l'inverse de l'humain, les urines de l'embryon ne sont pas sécrétées dans la poche amniotique, ce qui suggère que le profil protéique du fluide chez l'oiseau pourrait être significativement différent de celui de l'humain.

L'analyse par spectrométrie de masse du fluide amniotique chez la poule a mené à l'identification de 91 protéines avant le transfert du blanc (11^{ème} jour d'incubation). Celles-ci semblent essentiellement associées au métabolisme des lipides et des vitamines (les apolipoprotéines, l'albumine sérique, l'alpha-foetoprotéine, etc.), la morphogenèse (collagènes, protéases, etc.) et la réponse immunitaire (principalement le lysozyme et l'ovotransferrine). Les nombreux effecteurs du système immunitaire identifiés dans le fluide amniotique ont déjà démontré leur potentiel antibactérien chez l'oiseau (l'ovomucine, la protéine TENP, la protéine de liaison aux acides gras extracellulaires, l'ovalbumin-related protein X, l'ovoinhibiteur, l'ovomucoïde et la midkine), mais leur faible concentration au 11^{ème} iour d'incubation suggère que l'implication du fluide amniotique dans la défense de l'embryon reste peu significatif à ce stade. En revanche, le transfert des protéines du blanc dans le sac amniotique accroit la concentration en molécules antibactériennes, en amenant, entre autres, un ensemble de nouvelles protéines et peptides antibactériens : la protéine de la membrane vitelline externe n°1, la bêta-défensine aviaire 11, la bêta-microséminoprotéine, l'ovocléidine-17, etc. Cette relocalisation des défenses autour de l'embryon améliore l'activité anti-Listeria monocytogenes (bactérie gram positive) du fluide, et entraine l'apparition d'une activité anti-Salmonella enterica Enteritidis (bactérie gram négative), une bactérie responsable de toxi-infections alimentaires liées à la consommation des œufs.

Parmi les 91 protéines identifiées au total, 48 d'entre-elles présentent des orthologues dans le fluide amniotique humain. Certaines de ces protéines sont classées parmi les plus abondantes dans le fluide amniotique pour les deux espèces (l'apolipoprotéine A1, l'ovotransferrine, l'albumine sérique, l'alpha-foetoprotéine, la protéine qui lie la vitamine D), ce qui confirme que les fonctions principales du fluide, essentielles à la survie de l'embryon, sont conservées entre les espèces vivipares et ovipares (surtout dans les modèles étudiés ici, l'humain et la poule). Toutefois, le ratio et la composition en protéines associées dans la protection de l'embryon face aux pathogènes diffèrent selon le mode de reproduction. Le développement de l'embryon dans l'œuf, soumis aux pressions microbiennes de l'environnement, dont la flore bactérienne à la surface de la coquille, nécessite en effet l'implication de facteurs antibactériens recouvrant un large spectre d'action et spécifiques à l'oiseau, comme la bêta-défensine aviaire 11, l'ovalbumin-related protein X ou la bêtamicroséminoprotéine. Ces protéines constitueraient donc une adaptation du modèle de reproduction pour assurer le bon développement de l'embryon dans la coquille, malgré un environnement riche en pathogènes.

Cette étude met en avant le rôle essentiel du fluide amniotique de l'œuf dans la protection de l'embryon face aux agressions physiques et microbiennes, particulièrement après le transfert du blanc dans le sac amniotique. Cette protection s'établit dans l'œuf, mais pourrait perdurer après l'éclosion sous la forme d'un biofilm protecteur déposé sur les plumes et la peau du poussin, ainsi que dans son tube digestif, après absorption orale. L'identification d'indicateurs (physicochimiques) et biomarqueurs moléculaires attestant du bon développement de l'embryon dans le fluide amniotique permettrait une meilleure compréhension de l'état de santé (stress, pathologie, etc.) de l'embryon et du futur poussin, pour garantir une meilleure gestion des risques de contamination et de mortalité en élevage, et surtout obtenir des meilleures performances chez le poussin et l'adulte.

The unique features of proteins depicting the chicken amniotic fluid

Mylène Da Silva ‡, Clara Dombre §, Aurélien Brionne ‡, Philippe Monget §, Magali Chessé ‡, Marion De Pauw ‡, Maryse Mills ‡, Lucie Combes-Soia §¶, Valérie Labas §¶, Nicolas Guyot ‡, Yves Nys ‡, Sophie Réhault-Godbert ‡||

‡ INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France.

§ INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, CNRS, UMR 7247, Université François Rabelais de Tours, IFCE, Nouzilly F-37380, France.

¶ INRA, Plateforme d'Analyse Intégrative des Biomolécules, Laboratoire de Spectrométrie de Masse, Nouzilly F-37380, France.

|| Corresponding author: sophie.rehault-godbert@inra.fr; +33 (0)2 47 42 78 39

Running title: Proteome of the chicken amniotic fluid

SUMMARY

In many amniotes, the amniotic fluid is depicted as a dynamic milieu that participates in the protection of the embryo (cushioning, hydration, and innate immunity). However, in birds, the protein profile of the amniotic fluid unexplored. even though remains its proteomic signature is predicted to differ compared to human's. In fact, unlike humans, chicken amniotic fluid does not collect excretory products and its protein composition strikingly changes at middevelopment due to the massive inflow of egg proteins, white which are thereafter swallowed to support the rapid embryonic growth. Using both in-gel and liquid-based nano-LC-MS/MS analyses, we identified 91 non-redundant proteins delineating the chicken amniotic fluid at day 11 of development, prior egg white transfer. These proteins were essentially associated with the metabolism of nutrients, immune response and developmental processes. Forty-eight proteins were common to both chicken and human amniotic fluids, including serum apolipoprotein A1 albumin. and alphafetoprotein. We further investigated the

effective role of the chicken amniotic fluid in innate defense and revealed that it exhibits significant antibacterial activity at day 11 of development. This antibacterial potential is drastically enhanced after egg white transfer, with lysozyme, avian beta-defensin 11, vitelline membrane outer layer 1 protein, and beta-microseminoprotein being the most likely antibacterial candidates. Interestingly, several proteins recovered in the chicken amniotic fluid prior and after egg white transfer (ovalbumin and its related proteins X and Y, avian beta-defensin 11), are uniquely found in birds, or oviparous species (vitellogenins 1 and 2, riboflavin binding protein). This study provides an integrative overview of the chicken amniotic fluid proteome and opens very stimulating perspectives in deciphering the role of the avian egg-specific proteins in embryonic development, including innate immunity. These proteins may also constitute valuable biomarkers for poultry production to detect perilous situations (stress, infection, etc.), that may negatively affect the proper development of the chicken embryo.

ABBREVIATIONS

AF, Amniotic fluid; ATCC, American Type Culture Collection; Av-BD11, Avian beta defensin 11; BMSP, Beta-microseminoprotein-like; ED, Embryonic day; emPAI: Exponentially modified Protein Abundance Index; EW, Egg white; LC-MS/MS, Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry; HBP, Heparin-binding protein; *L.m., Listeria monocytogenes*; MYA:

Million years ago; NCBI, National Center for Biotechnology Information; OVAX, Ovalbumin-related protein X; PCR, Polymerase chain reaction; SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; S.E., Salmonella enterica Enteritidis; TSB, Trypticase soy broth.

INTRODUCTION

oviparous embryonic In species, the development depends the various on components, nutrients and structures composing the eggshell, the egg yolk, the egg white and the vitelline membrane (1). It also relies on the proper development of extraembryonic structures, namely the yolk sac, the amniotic sac and the allantoic sac (the chorioallantois) (1) (Fig. 1). These structures develop at the very early stages of development and originate from embryonic tissues, but are not considered to be part of the embryo's body (2). They are discarded or resorbed at hatching. These living structures are partly preserved among amniotes species, evolutionary but exhibit particularities depending on the embryonic development mode (3). The yolk sac, which appears in the first stages of the development, degenerates rapidly in mammals (Fig. 1), while in some birds, it participates in digestive processes until the last stages of incubation prior complete abdominal resorption at hatch. The yolk sac may have many other functions, which are temporally regulated all along incubation: it resembles the liver in the synthesis of plasma proteins, the bone marrow in erythropoiesis, and the intestine, in digestion of nutrients and their transport to the embryo (4). Thus, the yolk sac plays different roles to support or replace the functions of several organs that have not yet reached their full functional capacity. The chorioallantoic sac is composed of the chorioallantoic membrane, which results from the fusion of the chorion and the allantois at ED5-ED6, and it includes the allantoic fluid. It's a very vascularized structure that ensures many functions during chicken embryonic development: it collects nitrogenous and excretory products from the embryonic metabolism, it participates in respiratory exchanges, in calcium transport from the eggshell towards the embryo, in ion and water

reabsorption from the allantoic fluid and thus in acid-base homeostasis (2, 5). In humans, the allantoic sac forms only a part of the umbilical cord. As for the amniotic sac, it was described in all amniotes as a structure, filled out with the amniotic fluid (AF) protecting the embryo against mechanical shocks, dehydration or adhesion to the other extra-embryonic membranes. It also serves as a source of nutrients (6). It provides a favorable environment to accompany the development of the embryo: pH about 7.1 to 7.3, stable temperature, and sensorial stimulation (taste, sense of smell and hearing) (7).

Human amniotic fluid is a fluctuating milieu mainly composed of water (about 96.4%), carbohydrates. minerals. trace elements, hormones, glucose, free amino acids, lipids, urea, cells, proteins and peptides (6, 8). Its biochemical composition changes with gestational age/developmental stage as a result physiological of various mechanisms including feto-maternal exchanges: expiration and swallowing of lung fluid, excretion of fetal urine and transfer of solutes and fluids across amniotic, uterine membranes, and skin especially before keratinization (6, 9). In humans, before skin keratinization (25 weeks of age), the composition of the amniotic fluid is very similar to fetal plasma. As a dynamic reflecting the physiological process or status of the embryo, pathological its biochemical composition AF has been extensively characterized in humans as it contains molecular markers for embryonic development, abnormal inflammation. infection or pregnancy-related complications (10). Its role as a mechanical cushioning of the embryo, together with the fact that 25% of its total protein content is associated with the immune response or related to defense (9), corroborate its primary role in the protection of the embryo. However, it seems that proteins of the human AF are not solely involved in the nutrition and protection of the embryo, but they display many other functions related to metabolism and development (11). In oviparous species, however, the functions of the AF are still poorly understood and there several structural and biochemical are particularities that suggest similar but also diverging functions. First, there are two major extra-embryonic fluids in birds, the amniotic and allantoic fluids that are physically separated to ensure different functions. Similar to humans, the bird AF is contained in the amniotic sac and bathes the embryo, whereas the allantoic fluid is secreted in the chorioallantoic sac, which is an intestinal intussusception of the embryo that receives disposable wastes directly from the mesonephros. These anatomical specificities deeply influence the biochemical composition of the AF, which thus in birds does not collect fetal urine. The chicken AF is mainly composed of water and mineral elements, such as chloride, sodium, potassium, phosphorus, magnesium, calcium, iron, and sulfur, until the 11th day of incubation (ED11), like human AF (12, 13). The second main difference, as compared with mammals, is that after ED12, egg white proteins are massively transferred into the amniotic sac after absorption into the extraembryonic cavity through the albumen sac, where they are further taken up into the amniotic cavity through the amnion (14). They are then absorbed orally by the embryo as a source of amino acids to support its rapid growth (15-19) until hatching (ED21). Consequently, this process drastically impacts protein concentration of AF, which is barely measurable before ED11 of incubation (about 0.01g/L) to reach 200 g/L following egg white transfer (20). More recently, a study analyzing the major proteins of the chicken AF, revealed that it contains egg white proteins even before the massive egg white transfer at ED12 (20). Some of these proteins are egg yolk proteins while others may originate from the embryo (skin, feather, swallowing) or its extraembryonic membranes. All these proteins have been associated with functions

comparable to those described for human AF including metabolism, immune system or tissue remodeling, but they also serve as a major source of amino acids and energy for the embryo, especially during the second half of incubation. The avian specificity of some egg white and yolk proteins (21) recovered in the AF, together with the physical separation of amniotic sac from the embryonic urinary system and the transfer of egg white proteins at mid-incubation, suggests that this fluid may have very specific biological functions related to birds or even oviparity.

In such an interesting context, we explored the avian AF proteins and specificities using the chicken as a model of birds. Similar to human AF. with albumin, immunoglobulins, transferrin and haptoglobin (9, 11), chicken AF contains a few major proteins (ovalbumin, ovotransferrin, etc.) that complicate proteome profiling, masking the presence of proteins of lower abundance. Therefore, we designed two complementary approaches combining gel and liquid-based approaches coupled with nano-LC-MS/MS to give an exhaustive view of the proteome of AF at ED11, before the substantial transfer of egg white (which completely changes the global protein profile). We performed a functional annotation of AF proteome using gene ontology approaches: 1) on the 10 most abundant proteins representing 66 to 81% of the total protein contents for ingel and in-solution analyses, respectively, and 2) on the complete list of proteins resulting from both analyses. This approach was compulsory because many of the major proteins composing egg structures do not have assigned functions in databases yet and consequently, the functional annotation of the entire list would enrich functions, which biological significance may be overestimated. To better appreciate the role of the chicken AF in defense and innate immunity, we used an in-gel antibacterial assay combined to mass spectrometry, to identify antibacterial proteins and peptides contained in AF or in enriched fractions of AF, before and after egg white transfer. As the protein composition of the chicken AF is temporally regulated during incubation, AF functions are thoroughly modified following egg white transfer. Finally, a comparison with the published proteomes of the human AF and a phylogenetic study on all proteins identified in this study, allowed us to highlight chicken AF specificities, revealing a set of proteins, which are only present in birds and which physiological roles remain fully opened.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Samplings

Fluids were sampled as previously described in Da Silva et al. (20). Briefly, fertile eggs were incubated under standard conditions (45% relative humidity, 37.8°C, automatic turning every hour), after a three-day storage at 16°C and 85% relative humidity to ensure synchronization of developmental stages (UE1295, INRA, F-37380 Nouzilly, France). At ED11 and ED16, 40 eggs of comparable weight $(62.4 \pm 4.3 \text{ g})$ containing viable embryos (checked by candling) were tested with the Acoustic Egg Tester (KU Leuven, Belgium), and cracked eggs were discarded. By ED11, egg white was sampled with a syringe after drilling a hole in the eggshell. After removing the eggshell, the egg content was further poured in a Petri dish and the AF was recovered with a syringe through the amniotic membrane. By ED16, the egg white was collected in the Petri dish with pliers due to its high viscosity. All samplings were performed under sterile conditions. Sex of individual embryos was determined using PCR (22).

Fluid characterization

After samplings, AF were centrifuged at 3,000 g (10 min, 4°C) to remove insoluble components. Volumes, pH (Microelectrode

pH InLab 423. Fisher Scientific. Illkirch. France). osmolality (Fiske Mark 3 Advanced Osmometer. Instruments. Niederbronn Les Bains, France), and absorbance spectrum (Nanodrop, ND-100 Spectro, Wilmington, USA) were analyzed for each sample. The total protein concentration for each sample was assessed using BioRad DC Protein Assay Kit II (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). All samples (25 µL) containing loading buffer (0.25M Tris-HCl, 0.05% bromophenol blue, 50% glycerol, 5% SDS, pH 6.8) were independently loaded on a 12.5% SDS-PAGE using a Mini-Protean II electrophoresis cell (BioRad, Marnes-la-Coquette, France), and further stained by Coomassie Blue or silver nitrate. This overall characterization (pH, osmolality, protein concentration, absorbance and electrophoretic patterns, and embryo's sex) helped us to select homogenous samples that were stored for further analyses by mass spectrometry.

In-Gel and in-Solution Digestion

Twelves homogenous AF samples including six males and six females were pooled for protein identification. Proteins were either separated by a 4-20% SDS-PAGE followed by Coomassie Blue staining (in-gel analysis), or directly identified in solution (in-solution analysis) as described previously (20). SDS-PAGE slices were rinsed separately in water and then acetonitrile. Protein were then reduced with dithiothreitol, alkylated with iodoacetamide, and incubated overnight at 37°C in 25mM NH₄HCO₃ with 12.5 ng/µL trypsin (Sequencing grade, Roche, Paris, France) as described by Shevchenko (23). Peptides were pooled and dried using a SPD1010 speedvac system. Peptide mixtures associated to each band and in-solution samples were analyzed using nano-LC-MS/MS.

Nano-LC-MS/MS

Resulting peptide mixture was analyzed using a LTQ Orbitrap Velos Mass Spectrometer (Thermo Savant, Thermo Fisher Scientific) Ultimate® 3000 RSLC coupled to an chromatographer (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) controlled by Chromeleon 6.8 (Dionex. Amsterdam. software The Netherlands). Five microliters of sample were pre-concentrated desalted and on an LCPackings trap column (Acclaim PepMap 100 C18, 100 µm inner diameter x 2 cm long, 3 µm particles, 100 Å pores) for 10 min at 5 ul/min with 4% solvent B (0.1% formic acid. 15.9% water, 84% acetonitrile) in solvent A formic acid, 97.9% water. (0.1%)2% acetonitrile). Separation was conducted using a LCPackings nano-column (Acclaim PepMap C18, 75 μ m inner diameter × 50 cm long, 3 um particles, 100 Å pores) at 300 nL/min by applying a gradient of 4 to 55% of solvent B during 90 min.

Data were acquired using Xcalibur 2.1 software (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). The instrument was operated in positive mode in data-dependent mode. Survey full scan MS spectra (from 400 to 1800 m/z) were acquired with a resolution set at 60,000. The 20 most intense ions with charge states ≥ 2 were sequentially isolated (isolation width: 2 m/z; 1 microscan) and fragmented using Collision Induced Dissociation mode (energy of 35% and wideband-activation enabled). Dynamic exclusion was active during 30 s with count of а repeat one. Polydimethylcyclosiloxane (m/z,445.1200025) ions were used for internal calibration.

Protein Identification and Data Validation

MS/MS ion searches were performed using Mascot search engine v 2.3.2 (Matrix Science, London, UK) *via* Proteome Discoverer 2.1 software (ThermoFisher Scientific) against National Center for Biotechnology Information (NCBI) database with Chordata taxonomy. Fragments and parents' tolerances were set at 0.80 Da and 5 PPM, respectively. The search parameters included trypsin as a protease with two allowed missed cleavages and carbamidomethylcysteine, methionine oxidation and acetylation of N-term protein as modifications. variable Mascot results obtained from the target and decoy databases searches were subjected to Scaffold 4.8.2 software (Proteome Software, Portland, USA). and displayed as clusters. Keratins were not taken into consideration in the subsequent analysis as they might be either contaminant from human skin and/or chicken skin. The list of keratins identified in the analysis is however available as supplementary data (Supplementary Data S2).

Functional Annotation Using Gene Ontology

Biological processes, compartments, and molecular functions were investigated using UniprotKB (http://www.uniprot.org), Ensembl (http://www.ensembl.org), and NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov), as databases.

Comparison between Human and Chicken AF proteomes

IPI numbers and gene symbols corresponding to the proteins identified in the human AF were retrieved from the publication of Cho et al. (11), which integrated all previous studies on the human AF proteome. Old human protein sequences were recovered at European **Bioinformatics** Institute (ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/IPI/) and updated using the Ensembl database. Human and chicken gene symbols were compared and for associated genes, protein sequences were aligned using BLAST to identify similarity and identity percentages between both species. orthologues systematically Human were explored to confirm previous alignments.

Phylogenetic analysis

Phylogenetic branches of emergence were defined in order to determine the moment of appearance of each gene in the tree of life. Eight possible branches for gene birth were considered: Opisthokontas (animals and fungi ~ 1215 million years ago (MYA), Bilateria (bilateral animals ~ 937 MYA), Chordata MYA). (chordates ~ 722 Vertebrata ~ 535 MYA), (vertebrates *Tetrapoda* (tetrapods ~ 371 MYA), Amniota (amniotes~ 296 MYA), Sauria (reptiles and birds ~ 276 MYA), and Neognathae (birds ~ 104 MYA). For all identified proteins, the corresponding Ensembl protein ID was retrieved from the Ensembl database and the related phylogenetic trees were analyzed to highlight the specificity of proteins evolution (http://www.ensembl.org/index.html) (24).Eighty-nine trees were studied. In order to complement the phylogenetic trees, the conservation of synteny was systematically using Genomicus studied (http://www.genomicus.biologie.ens.fr) and Mapviewer

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview) (21, 25).

Purification of heparin binding proteins

Heparin-Sepharose chromatography was performed according manufacturer's to instructions. Briefly, 2 mL of beads (Heparin sepharose 6 Flast Flow, Ge Healthcare, Sweden) were loaded onto a polypropylene column (QIAGEN, Courtaboeuf, France) and washed with 10 volumes of water and 10 volumes of washing buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4). After loading the crude sample (pool of ten individuals, five males and five females), the beads were washed extensively with the washing buffer until the absorbance at 220 nm reached zero, as previously reported (26). Elution of bound proteins was achieved with 50 mM Tris-HCl, 2 M NaCl, pH 7.4, until the absorbance at 220 nm reached zero. Eluted fractions were desalted and concentrated by ultracentrifugation (Ultracel-3K, Merck Millipore, Molsheim, France), and analyzed by 12.5% SDS-PAGE under non-reducing and non-boiling conditions to preserve protein integrity, followed by Coomassie Blue staining.

Antibacterial assays

Antibacterial tests were conducted by direct detection of antibacterial activities after SDS-PAGE, a method adapted from Bhunia (27). Pathogenic bacterial strains. Salmonella enterica serovar Enteritidis ATCC 13076 (S.E.) and Listeria monocytogenes EGD strain (L.m.) were provided by the International Centre for Microbial Resources from the French National Institute for Agricultural Research (INRA, France). Pre-cultures of S.E. and L.m. were performed overnight in Trypticase Soy Broth (TSB, BD Biosciences) and in Brain Heart Infusion broth (BHI, BD Difco), respectively. This pre-culture was then used to inoculate a new culture broth (TSB or BHI) so that the mid-exponential phase was obtained after 3 to 4 hours of incubation depending on strains, with shaking at 37 °C. Bacteria were centrifuged at 2000 g for 10 min at 4 °C, washed twice with cold 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), and resuspended in cold sodium phosphate buffer. Bacteria (7.5E10⁶ Colony Forming Unit) were mixed with 25 mL of autoclaved nutrient-poor agar (10 mM phosphate buffer containing 0.03% TSB medium, 1% low-endosmosis (Sigma-Aldrich, agarose (wt/vol) Saint Quentin Fallavier, France)), and 0.02% Tween 20.

In parallel, maximum of 20 μ g of protein pools (see above) were loaded on two identical gels and further separated by 15% SDS-PAGE under non-reducing conditions, maintaining the electrophoresis system at 4°C to avoid protein degradation. The first gel was stained with Coomassie Blue for further identification of antibacterial proteins by mass spectrometry. The second gel was dedicated to the antibacterial assay and was washed separately with 2.5% Triton X100 and MilliQ water (4 x 15 min, 4°C), to eliminate SDS and renature proteins. Thereafter, the washed gel was covered with the nutrient-poor agar containing bacteria and incubated 3 h at 37°C to allow protein diffusion in the agar. A second nutrient-rich agar (10 mM phosphate buffer containing 6% TSB medium, 1% lowendosmosis agarose (wt/vol)) was poured on the nutrient-poor agar to allow bacteria growth. After an overnight incubation at 37°C, clear zones were defined as inhibition zones. These inhibition zones were super-imposed on the Coomassie-stained gel to locate bands containing antibacterial proteins. These bands were cut from the Coomassie-stained gel and further processed as described above, for protein identification by mass spectrometry.

Beta-microseminoprotein-like (BMSP) and avian beta defensin 11 (AvBD11), two recently characterized antibacterial proteins from egg white were used as positive external controls (2 μ g of proteins/well, data not shown). They were obtained as previously described (26).

Experimental Design and Statistical Rationale To address our scientific questions, we first decided to use a conventional chicken laying strain (ISA Brown, Hendrix Genetics, St Brieuc, France) at 38 weeks of age, that were raised at the UE1295 Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours (INRA, F-37380 Nouzilly, France). Eighty fertilized eggs were incubated under standard conditions after a three-day storage at 16°C and 85% hygrometry to favor synchronization of developmental stages knowing that conditions and length of storage prior incubation impact negatively embryo survival and development. The developmental stages were confirmed using the atlas of chicken developmental stages (28). Egg weight and eggshell quality were both checked and protein profiles of each individual samples were analyzed by SDS-PAGE (Supplementary data S1, sheets #1 and #2). In parallel, the sex of the embryo was determined for all corresponding samples as described in

Experimental Procedures to encompass most proteins composing AF, regardless of the sex. The combination of all these parameters allowed us to define 12 samples with an were equilibrated ratio that sex all homogenous in term of stages of development, biochemical parameters, (pH, osmolality, absorbance spectrum, etc.) and protein profiles. All experiments were conducted in compliance with the European legislation on the "Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes" (2010/63/UE) and under the supervision of an authorized scientist (S. Réhault-Godbert, Authorization 37-144). no. Two complementary mass spectrometry approaches were combined to give a representative overview of protein diversity in chicken AF samples. For mass spectrometry data analysis, peptide and protein identification and validation were performed using the Peptide and Protein Prophet algorithms, respectively (95.0% probability, at least two different unique peptides), from three replicates. Each protein sequences were retrieved from Scaffold and blasted to check their accession numbers in NCBI, and to find corresponding Ensembl and Uniprot IDs. Chicken proteins identified in other species were also searched by blasting. Functional annotation and search for antibacterial candidates were performed by combining Ensembl, Uniprot and NCBI data on chicken proteins and their orthologues. The identification of antibacterial candidates was completed by investigating protein and peptide antibacterial domains using specific sequence analyzing tools such as Interpro. For the production of enriched fractions, we defined optimal conditions (volume of samples, heparin-sepharose volume of beads) depending on the initial concentration of proteins in AF and egg white samples from ED0, 8, 11, 14 or ED16 stages. All samples (raw, flow-through and eluted fractions) were analyzed by SDS-PAGE. Protein profiles of egg white at ED11 and ED16 were compared to previously published data for experimental validation (26, 29). For antibacterial assays, at least three independent assays were performed on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Enteritidis strains, using two positive controls (one peptide and one protein) purified from chicken egg white. The phylogenetic analysis and corresponding figures were conducted combining data available in Ensembl databases and literature.

RESULTS

Proteomic profiling of AF – The global protein profile of AF assessed by SDS-PAGE is completely different when comparing the first half (ED8-11) to the second half of development (ED12-16), due to the massive transfer of egg white from ED12 onwards (Fig. 2A). In this context, to better appreciate the intrinsic protein composition of chicken AF, a proteomic study combining two different approaches was conducted on AF samples collected at ED11, the very last day before egg white transfer. AF of 40 eggs corresponding to 17 females and 22 males (plus one embryo for which tissue sample was discarded) were collected as detailed in Experimental procedures. Individual SDS-PAGE profiles (using both Coomassie blue and Silver stainings, Supplementary Data S1, protein concentrations, #2), sheet pH. osmolality values, and spectra of absorbance were determined for each AF sample (Supplementary Data S1, sheet #1). Since no significant differences could be detected between individuals and regardless of sex after integration of all parameters, we constituted a pool representing 12 homogenous samples with equilibrated sex-ratio for further analyses by high-resolution mass spectrometry. We performed both in-gel and in-solution independent digestions followed by nano-LC-MS/MS analysis. For in-gel analysis, a 4-20% SDS-PAGE gel was cut into 20 gel sections (Fig. 2B), which were further processed as

mentioned in Experimental procedures. We filtered data for keratins and other proteins that could reflect sample contamination by experimenters. Most keratins identified were indeed associated with human and/or mammalian species and were essentially identified "in-gel" in the dataset (Supplementary Data S2). Ninety-one nonredundant proteins were identified, including 49 for in-solution analysis and 70 for in-gel analysis (Fig. 3). Twenty-eight proteins were common to both approaches (Fig. 3). Some of the proteins identified sometimes refer to other bird species than Gallus gallus, such as *Coturnix japonica* or fish Tachysurus fulvidraco (Supplementary Data S3). Raw files, proteins, peptides scores, information and quantitative values are compiled in Supplementary Data S2 and S3.

Figure 3 illustrates the results using log10 of Exponentially Modified the Protein Abundance Index (emPAI), and log10 of the percentage of the protein sequence coverage (Supplementary Data S3). According to this graph, a set of ten proteins emerged to be very abundant compared with others. Regardless of the methods, apolipoprotein A1 (APOA1), ovotransferrin (TF) and alpha-fetoprotein (AFP) were three of the most abundant proteins found in AF at ED11 (Fig. 3). If we consider the ten proteins with the highest emPAI for both in-solution and in-gel approaches, seven were common to both approaches: APOA1, TF. AFP. TTR (transthyretin), OVAL (ovalbumin), LYZ (lysozyme) and ALB (serum albumin). APOC3 (apolipoprotein C-III), SPINK7 (ovomucoid) and MDK (midkine) were found in the top ten resulting from in-solution method whereas GC (vitamin-D protein), FSTL1 (follistatin-related protein A) and ACTB (actin, cytoplasmic 1) were identified in the top ten resulting from in-gel method (Supplementary Data S3). The ten major proteins of AF after integration of quantitative values from both approaches are compiled in Table 1. These proteins represent about 66% to 81% of the total protein content for in-gel and in-solution analyses, respectively. A primary gene ontology analysis on these major proteins revealed that six of them are associated with lipid, vitamin or hormone metabolisms (APOA1, AFP, ALB, GC, TTR, APOC3), while two additional proteins participate in embryo's defense against pathogens (TF and LYZ) (Table 1). On the other hand, OVAL, which is specific to birds (30), is assumed to have a role in embryo's nutrition as a source of amino acids while SPINK7 is a very potent protease inhibitor containing three inhibitory kazal-like domains. Despite the lack of information related to its physiological targets, it presumably regulates endogenous proteolytic activities, preventing uncontrolled protein degradation.

Except APOC3, all these proteins were described to be secreted (Table 1).

Gene ontology analysis of the chicken AF proteome – A gene ontology analysis revealed that the most representative function of AF proteins is associated with cellular adhesion migration, followed by functions and associated with metabolism and transport of lipids, vitamins and carbohydrates (Fig. 4). We defined six categories of general functions knowing that many proteins have multiple functions and appear in various groups (Supplementary Data S3, sheet #2). Three processes seem to be exacerbated when comparing the first approach on the ten major proteins (Table 1) and the second performed on the whole list of proteins (Fig. 4): cellular migration and adhesion, metabolism (and transport) of lipids and vitamins, and immunity (defense). Twenty-one genes are classified in "immune response" (Fig. 4). This category includes effectors/antibacterial molecules such as TF and LYZ, but also (CAO79236.1 immunoglobulins and LOC107051274), mucins (MUC5ACL, MUC5B), protein TENP (BPIFB2),

ovoinhibitor (SPINK5) or ovalbumin-related protein X (OVALX). It is noteworthy that ten proteins could not be assigned to any known function including two of the major proteins identified in this work: OVAL and SPINK7 (Table 1). Interestingly, among these 10 proteins, seven are potent protease inhibitors whose functions in the egg are still unknown.

Comparison with the human AF proteome – Chicken AF proteome at ED11 was compared with the 936 proteins identified in the human AF proteome (11) to shed light on chicken AF specificities. Out of the 936 proteins identified by Cho et al. (11), after removal of redundancies and considering the new annotation release, we ended with 842 proteins, plus 81 proteins retrieved from the other studies (11) (Supplementary Data S3, sheet #4). This data integration led to 923 proteins that are identified so far in the human AF. When considering gene symbols, 48 proteins were found to be common to both chicken and human AF Fig. 5). Although they do not share the same gene symbol, LOC107051274 and CAO79236.1 (immunoglobulins) can be regarded as human immunoglobulins G, which are omnipresent in human AF (11).

Assessing the antibacterial potential of the chicken AF and comparison to egg white – To further assess the biological significance of AF as a source of antibacterial proteins, we adapted a method from Bhunia et al. (27) that allows the direct detection of antibacterial activities after a SDS-PAGE. Briefly, AF proteins and peptides were separated by SDS-PAGE under non-boiling and non-reducing conditions. After removing SDS from the gel, a nutrient-poor agar containing bacteria was poured on the SDS-PAGE gel and left on the bench for three hours to allow for proteins diffusion. Thereafter, a nutrient-rich agar was added to favor bacterial growth. Regions were bacteria could not grow, because of the presence of antibacterial proteins and peptides, were detected as translucent areas. Antibacterial activity was tested against *Listeria monocytogenes* (*L.m.*; gram-positive) and Salmonella enterica Enteritidis (S.E.; gram-negative), two bacteria against which egg proteins have already demonstrated their activity (26). Because AF protein composition at ED11 is thoroughly modified from ED12 onwards, due to the presence of egg white masking the intrinsic proteins protein composition of AF, we explored the antibacterial potential of AF at both ED11 and ED16 (Fig. 6A and 6B). Assays were performed on both pools of total AF, but also fractions enriched antibacterial on in molecules obtained after heparin-affinity heparin-binding chromatography (HBP, proteins), as previously described (26). At ED11, results show only weak antibacterial activity against gram-positive L.m. for crude AF, flow-through and eluted (HBP) fractions collected from heparin-chromatography (Fig. 6A). Overall, the antibacterial activity against both L.m. and S.E. increases with the egg white transfer, with new inhibition zones appearing for both bacterial strains at ED16, particularly for the eluted fraction (Fig. 6B). Roughly, the chicken AF demonstrated an anti-L.m. activity greater than the anti-S.E. activity, with one to five anti-L.m. zones from ED11 to ED16, versus only three anti-S.E. zones at ED16 (Fig. 6A and 6B).

The HBP fraction of egg white has been previously reported to contain antibacterial proteins and activities (26, 29). In order to explore regulation the of egg white antibacterial activities all along incubation, we performed antibacterial assays on egg white HBP, sampled and purified at ED0, 8 and 14 (Fig. 7). These stages of development were chosen knowing that egg white transfer into the AF is complete at ED16 (almost no residual egg white at this stage). Antibacterial activity of the egg white HBP against both L.m. and S.E. changes during embryonic

development. Indeed, the strong activity detected at ED0 at 19 kDa (Fig. 7, ED0) against L.m., progressively disappears to the benefit of anti-L.m. activities in the higher masses (> 250 kDa) or lower masses (<14 kDa) (Fig. 7, ED8 and 14). In addition, two bands exhibiting anti-S.E. activities at ED0 (19 kDa and 14 kDa, were barely detectable at ED8 and ED14 (Fig. 7). Antibacterial activity of egg white HBP at ED14 is in agreement with the antibacterial activities of the HBP in the AF at ED16: one inhibition zone in the higher masses (> 250 kDa), and two bands in the lower masses (< 15 kDa) for L.m., as opposed to one inhibition zone at 14 kDa for S.E., An anti-L.m. zone between 25 and 37 kDa for the HBP at ED16 solely appears in AF, which might be associated with specific activation of antibacterial proteins in this fluid at this stage.

Identification of candidate proteins responsible for antibacterial activity in AF at ED11 and ED16, by mass spectrometry - In parallel to gels prepared for antibacterial assays, a SDS-PAGE realized under the same conditions was stained with Coomassie blue. The superposition of both the stained SDS-PAGE gel and the gel exhibiting antibacterial activities allowed us to select SDS-PAGE bands (labeled A to H, Fig. 6A and 6B), which were susceptible to contain antibacterial proteins or peptides. These bands were analyzed by mass spectrometry at ED11 (band A, Fig. 6A) and at ED16 (bands B to H, Fig. 6B), which led to the identification of 29 proteins (Table 2). Among the most likely candidates possessing antibacterial activity, we could only find LYZ for AF at ED11. For sample at ED16, the most probable molecules are LYZ, but also AvBD11, vitelline membrane outer layer protein 1 (VMO1), avidin (AVD), beta-microseminoprotein (LOC101750704 G. gallus/LOC104403769 N. notabilis), OVALX, TF, BPIFB2, OC-17, midkine/pleiotrophin (MDK) (26, 29, 31). The antibacterial activity of SPINK5 was previously demonstrated against *Bacillus* but not against the two strains tested in the present study (32).

Phylogenetic analysis - To further explore specificities of the chicken model, we analyzed the evolutionary history of the 91 proteins identified in chicken AF at ED11 (Fig. 8), combined to the 18 new genes identified from the antibacterial assays at ED16 (Table 2). Among the 109 proteins analyzed, the corresponding genes of 100 of them were found in Ensembl database, but the evolution of only 90 of them was referenced. The 19 genes without an Ensembl referencing may be located in the non-sequenced or nonannotated region of the chicken genome (AFP; APOA2; APOC3; ASTL; COL1A1; DCHS1; DMBTIL3; DSG4: LOC104403769 LOC101750704; LOC107051274; LOC107323914; MUC6; OC-17; OVSTL; PSAP; SLC3A2; SPINT4; immunoglobulin heavy chain variable region CAO79236.1 (no geneID); transferrin ADK35120.1 (no geneID)). Studying the moment of appearance in the tree of life of each gene coding for these proteins, revealed that most of them (88%) appeared before 371 MYA (tetrapods) with a peak between 937 MYA and 722 MYA (bilateria) for almost 50% of them (Fig. 8A). Orthologues of most of these genes (80 genes) are present in primates and other mammals. Nine proteins lacking orthologues in mammals were identified. Four of these genes, AvDB11, OVAL, OVALY and OVALX are birdspecific and could also be found in chicken and other bird species like duck or turkey, but not in lizard or turtle (30, 33) (Fig. 8B). These genes appeared 104 MYA after divergence between birds and reptiles. APOV1, present in bird and reptile genomes, emerged 276 MYA. AVD and RBP appeared in vertebrates and chordates, respectively (21, 34, 35). These genes are present in reptile and bird genomes but also in fishes or frogs, which suggests that they have been likely lost in mammalian branch. Concerning RBP, the death of the gene in mammalian genome could not be validated because we could not find any pseudogenes. Genes encoding VTG1 and VTG2, which appeared in bilateria, are found in all egg-laying species including platypus (VTG), which is the only oviparous mammal. Some have shown that these VTG1- and VTG2-encoding genes progressively lost their functions and became pseudogenes during mammalian evolution (36) with the appearance of lactation and placentation. Several authors have described the process of pseudogenization of VTG genes during mammalian evolution (21, 35). OC-116 gene has been described as orthologous to MEPE gene in other species, although OC-116 have likely acquired some functional specificities (eggshell biomineralization) resulting from divergent and adaptive evolution (21). For (ovomucoid) SPINK5 SPINK7 and (respectively (ovoinhibitor) genes ENSGALG0000003512 and ENSGALG0000031496), which appeared between 296 MYA and 276 MYA, the story is quite tricky as the data available in Ensembl were not sufficient to better define their evolutionary fate in various amniotes (Fig. 8). Both chicken proteins share 50.24% sequence identity. In Gallus gallus, they are located right next to each other on chromosome 13 within a 33-kb region, closed to other SPINK genes, which have all probably arisen by duplication from a common ancestor gene. All these proteins are characterized by one to 14 Kazal-like domains, which are known as evolutionary conserved domains, commonly occurring in tandem arrays and usually associated with inhibitory activities against serine proteases. This SPINK gene family to evolve very quickly, seems and unfortunately, synteny analysis of these genes help in strengthening does not the corresponding phylogenetic tree, because all these genes are located within the same locus.
Nevertheless, both chicken genes seem to have specifically duplicated in saurians before speciation of chicken and other birds and reptiles. SPINK7 (ovomucoid) and SPINK5 (ovoinhibitor) genes encode proteins of 210 acids and amino amino 472 acids. respectively, the latter being characterized by a C-terminal extension of 252 amino acids containing four additional Kazal-like domains. In comparison with mammalian SPINK5 proteins, a low percentage of sequence identity is also observed (less than 30%), partly due to a difference in the length of protein sequences and the number of corresponding Kazal-like for domains (three chicken ENSGALG0000003512, seven for chicken ENSGALG00000031496, and 14 for human SPINK5). Ultimately, the phylogenetic tree strongly suggests that both genes have been lost in several mammals, in particular in primates, suggesting a pseudogenization in mammals, in parallel to a speciation after duplication in birds.

DISCUSSION

In amniotes, AF plays a crucial role in maintaining a stable and protecting milieu, thus limiting any disturbance that could affect the proper development of the embryo. Besides its role as a source of nutrients, AF possesses many different properties that contribute to the protection of the embryo: hydration, neutral pH, acid-base balance, prevention against mechanical and thermal shocks, as well as the presence of several antimicrobial molecules (6). Indeed, amongst the several hundreds of proteins identified in the human AF, about 25% are associated with immune defense and include antimicrobial proteins and peptides such as lysozyme, defensins, immunoglobulins, lactotransferrin and secretory leucocyte proteinase inhibitor (9, 11). The exhaustive characterization of its biochemical components at various stages of gestation in normal and pathological situations, constitutes an extremely valuable approach to help in the diagnosis of human fetal disorders and infections. In avian species, there is evidence that AF also participates in homeostasis around the embryo (20) and in its protection against physical constraints (12). Nevertheless, little is known about the physiological role of AF proteins, and there is to date only few proteomic data available on this fluid in avian species. Yet, we suspect that the development of the embryo in an egg, with no mother-connected tissues, requires some inherent specificities and structural particularities that may influence AF protein profile and composition in birds. At least two major points need to be considered when compared with human AF. The first one is that, in avian species, unlike humans, AF does not collect fetal urinary waste and meconium. Indeed, this function is ensured by the allantoic fluid, which is biochemically and physically distant from AF. The second point is the complete reshape in AF protein profiles, as a consequence of the transfer of egg white proteins into the amniotic sac from ED12 onwards (mid-incubation) (Fig. 2A) (15, 18, 20).

In the present work, we identified 91 nonredundant proteins with high confidence, using liquid-based and in-gel mass spectrometry analysis of the chicken AF at ED11, before egg white transfer, which is higher than the 47 proteins identified in a preliminary study (20). This number is however far less than the number of proteins performed identified in two surveys simultaneously on the human AF (219 (9) and 923 (11)). This difference can be partly explained by the several exchanges with maternal tissues existing during gestation, which results in some specific AF protein profile and the fact that in humans, metabolic wastes originating from the embryo are indeed recovered in the AF, which is actually not the case in the chicken model (6).

All combined results, indicates that more than half of the proteins identified in the chicken AF at ED11 have orthologues that have been identified as components of the human AF, which highlights that the overall protein composition of the AF before egg white transfer exhibits high similarities with the human AF. This is strengthened by the observation that, five of the top-ten high abundant proteins identified in the chicken AF at ED11 (Table 1 - ALB, TF, AFP, GC and APOA1) are in fact also listed in the 15 high abundant proteins recovered in human AF (9, 11). It is to note that the TF identified in the chicken AF is related to ovotransferrin, which shares 51.76% and 51.73% sequence identity with human serotransferrin (P02787) and human lactotransferrin (P02788), respectively. This moderate sequence identity between ovotransferrin and its human homologues, together with some specific structural features, such as glycosylation and number of disulfide bridges (37), suggest similar functions with regard to their iron binding capacity and storage, but also possibly diverging functions. As an example, both lactotransferrin and ovotransferrin, but not serotransferrin, are depicted as antibacterial proteins (38, 39). Interestingly, two of the top-ten abundant proteins have no assigned functions: OVAL and SPINK7. These two proteins are major proteins of egg white (40) and appear belatedly in the timeline of evolution, with OVAL and very likely SPINK7, being specific to birds (Fig. 8).

Because of these similitudes in protein composition, most functions allocated to the most abundant proteins composing the human AF resemble that of the chicken AF: 1) metabolism and transport of vitamins, lipids and hormones, 2) immune response, and 3) hemostasis and homeostasis. The analysis of the list of chicken AF proteins using automatic tools dedicated to gene ontology annotation, emphasized functions associated with many aspects of developmental biology such as morphogenesis and organogenesis, which include cell proliferation, adhesion and migration processes (Fig. 4). These functions were also exacerbated in the analysis of human AF proteins (9, 11). However, the biological significance of these functions in the chicken AF are likely to be overestimated since most proteins allocated to this function are very-low-abundant proteins and may reflect some embryonic or extraembryonic tissues desquamation (Supplementary Data S2 and S3, sheet#2).

Overall, it is noteworthy that on the ten most abundant proteins, four of them are major egg white proteins (OVAL, SPINK7, LYZ, TF) (40) whereas ALB, APOA1, GC, TTR, APOC3 are egg-yolk abundant proteins (41). The expression of OVAL, SPINK7, LYZ and TF, which together account for 85 to 90% of the egg white proteins, is under hormonal control in the oviduct and will not be expressed until the onset of sexual maturity of hens (42). OVAL, SPINK7 and TF are thus likely to flow from egg white into the amniotic sac, rather than being expressed by embryonic tissues. As for LYZ, the ongoing hypothesis is that it also originates from egg white although it is also expressed by a wide range of tissues (43). On the other hand, APOA1, ALB, GC, TTR and APOC3 represent highly-abundant proteins of egg yolk (41), which also suggests that they are somehow transferred to the chicken AF from the egg yolk, or from the yolk sac where they are highly expressed (4). The molecular mechanisms by which egg white and egg yolk proteins enter the AF during the first half of incubation are still not completely solved (14, 18). In contrast, the embryonic origin of AFP is unequivocal since it is a fetus-specific protein present in a range of (extra)embryonic tissues, highly expressed in the yolk sac and the embryo's liver (44). Although all these proteins are the most abundant proteins identified in the chicken AF at ED11, their protein concentration in the AF at this stage (0.01 g/L) is not comparable to those recovered in the egg yolk (> 10 g/L, 22% of dry matter (45)) and egg white (380

g/L (29)). This concentration is also lower as compared with that of human AF: it is about 4 g/L at 15 weeks of gestation (10), it reaches its maximum (6 g/L) at 22-27 weeks of gestation and starts to decrease to about 2 g/L at 37-40 weeks of gestation (46). The low protein concentration of chicken AF suggests that the presence of proteins in the chicken AF may reflect some passive transfer from these egg compartments towards AF, rather than an active mechanism. It also highlights that AF cannot meet embryo's requirements in energy up to ED11. Hence, during the first half of incubation the egg yolk is undoubtedly the major source of energy/lipoproteins for the embryo. Some proteolytic activities (20) as well as faint antibacterial activities (Fig. 6A), have been however detected in AF at ED11. But, because of the low abundance of the corresponding proteins, the biological significance of these activities in AF remains questionable as compared to egg yolk, which concentrates hydrolytic enzymes (41, 47), or egg white, which contains high amounts of antibacterial proteins including active lysozyme (29, 40).

Altogether, these results point out that during the first half of incubation, chicken AF roughly resembles human AF in protein composition and that its main function is assumed to prevent dehydration, adhesion of the embryo to other structures, and to maintain a stable environment in the embryo proximity. These considerations along with the detection of antibacterial activities, corroborates the role of chicken AF in protecting the embryo against a range of potential physical, physicochemical and antibacterial pressures. Anyway, it also emphasizes some particularities such as the presence in this fluid of bird-specific proteins (OVAL, OVALY, OVALX, OC-116, AvBD11 and likely SPINK7/ovomucoid and SPINK5/ovoinhibitor, recently renamed SPIK7 and SPIK5 in Pubmed database), which functions are still speculative, but also some

oviparous-specific proteins (VTG1 and 2, AVD, APOV1) (Fig. 8B). Additionally, it revealed the presence of 43 proteins that have been uniquely found in the chicken AF as compared with the human AF (Fig. 5). Nevertheless, the high number of proteins reported for human AF as compared with chicken AF, merits further studies. In particular, a comprehensive study of the proteome profiling of the allantoic fluid would probably answer some of these questions, as we might find allantoic fluid-specific proteins orthologues have been actually whose identified in human AF. Future studies of this specific fluid would confirm or not whether proteins from both chicken amniotic and allantoic fluids actually encompass most proteins identified in the human AF.

To conclude, the story of the chicken AF remains quite simple up to ED11, with a protein composition that is comparable to that of human AF or at least with similar general functions. However, the protein composition of AF is deeply revised after egg white transfer, which occurs between ED11 and ED12 (20). AF protein profile then completely merges with egg white protein profile (Fig. 2A) (18, 20, 48). Despite the presence of AF hydrolytic enzymes (20), no major proteolytic degradation of egg white proteins could be detected after its inflow into the amniotic cavity, up to ED19. These data suggest that egg-white abundant antiproteases, namely SPINK7, SPINK5, cystatin (CST3) and ovostatin (OVST) remain active during the whole duration of incubation. The AF intrinsic protein composition is thus completely concealed by the egg white components, which ten major proteins consist of OVAL, LYZ. TF, OVALY, SPINK7, VMO1. SPINK5, AVD, OVALX, and CST3 (40). It is rather interesting to note that the inflow of egg white actually reinforces some proteins that were already present as major proteins in ED11-AF (OVAL, LYZ, TF and SPINK7, Table 1). More than half of these major egg white proteins are related to innate defense (LYZ, TF, VMO1, SPINK5, AVD, OVALX) while three of them are proteases inhibitors (SPINK5, SPINK7, CST3). Therefore, we suspected that chicken AF enriched in egg white proteins from ED12 onwards, acquires an increased antibacterial potential. An in-gel antibacterial assay was then developed to better appreciate the relevance and effective activity of these so-called antibacterial proteins in the AF-egg white mixture. We showed that ED16-AF displays higher antibacterial potential against the two bacterial strains tested, namely Listeria monocytogenes (gram-positive strain) and Salmonella enterica Enteritidis (gram-negative strain) compared with ED11-AF. A total of 29 proteins were identified in the corresponding zones lacking bacterial growth (Table 2), including LYZ, AvBD11, VMO1, AVD, LOC101750704 (BMSP), OVALX, TF, OC-17, BPIFB2 and MDK that were all previously reported to exhibit antibacterial activities (26, 31, 39, 49-55). These results demonstrate that the antibacterial potential of egg white proteins is not impaired by the incubation temperature, nor by proteolytic degradation (thanks to egg white antiproteases), and that its antimicrobial potential remains effective after transfer into the AF. However, subtle differences are detected in AF at ED16 after completion of egg white transfer, but also in remnant egg white at ED8-14. Indeed. additional antibacterial zones were visualized on anti-Listeria monocytogenes assays performed with ED16-AF and ED8-14-EW (Fig. 6 and 7 respectively). Unexpectedly, they correspond to proteins or protein complexes/association of very high molecular masses (>250 kDa). These high molecular mass complexes were identified as a mixture of egg white proteins: clusterin (CLU, 62 kDa), SPINK5 (52 kDa), OVALX (44 kDa), AVD (tetramer of 17 kDa units), OVAL (43 kDa), TF (78 kDa), ovomucin (234 kDa), LYZ (14 kDa), BPIFB2 (47 kDa), etc. The progressive appearance of these complexes suggests some specific regulation occurring during incubation. Indeed, the re-distribution of the egg white water towards extraembryonic sacs during the first half of the development, concentrates egg thus promoting proteins white proteins. interactions between antibacterial proteins/peptides of low molecular masses (LYZ, LOC101750704 (BMSP), AvBD11, etc.) with proteins of higher molecular masses (ovomucin). These protein complexes do not seem to affect the antibacterial protein/peptide activities, which are still effective even before oral absorption by the embryo (Fig. 7), thus forming another barrier against bacteria around the embryo's body. As the embryo moves and develops in the amniotic fluid until hatching, it is not unreasonable to hypothesize that this mixture of antimicrobial molecules and mucins may also constitute a protective biofilm deposited on embryo feathers and skin to protect the embryo and the newborn chick. This latter remark is partly supported by several articles that reported the presence of lysozyme and defensin-like molecules in human vernix caseoa (56, 57), a protective lipid-rich substance that covers the skin of the human fetus during the last trimester of gestation and the newborn. Whether this enhanced antimicrobial potential of AF prior swallowing has some relevant biological significance with respect to the protection of the embryonic digestive tract should also retain major attention. Indeed, the fate of AFegg white proteins mixture that is ingested by the embryo is still poorly understood. These proteins remain very stable in egg white during incubation but also in AF (18, 20) and all along the digestive tract of the embryo, up to ED19 (48). Similarly, some egg white typical profiles can be visualized in the yolk sac content at ED20 just before emergence of the chick, with OVAL, LYZ and TF as major proteins (15, 48). These data together with the fact that OVAL was recovered as a native form in central nervous system and other embryonic organs (18), suggest that this protein and possibly related proteins OVALX and OVALY may have other functions than nutrition (30). From these data, we infer that intrinsic egg yolk proteases exhibit limited proteolytic activities on egg white content at this stage (48). This can be partly explained by the gradual increase of yolk pH, which impacts the activity of aspartic proteases (58), such as chicken cathepsin D, a key enzyme in yolk processing (47). It seems that everything converges to protect egg white-AF protein content from uncontrolled proteolytic and thermal degradation (presence of numerous proteases inhibitors together with the appearance of the thermostable S-ovalbumin during incubation (59, 60)) to be utilized by the embryo and/or the chick at a very precise moment of its development/growth.

Besides its major interests for comparative biology approaches and for deciphering the functions specificities and of avian extraembryonic compartments, these results (protein profile and composition) constitute a reference start point for analyses of pathological conditions due to infection or impaired development occurring during the embryonic chicken development. As in differences examples, humans, in concentration of AFP, defensins, vitaminbinding proteins, APOA1, and TTR in AF have been associated with many metabolic and developmental disorders such as trisomy, developmental preterm-labor, delays. inflammation or infections (61-63). These data combined to other high throughput methods such as metabolomics or epigenetics, and general egg quality traits, may constitute useful tools for poultry production. Indeed, approaches may help to further these investigate the impact of chicken lines, housing systems and nutrition of hens (64, 65) or of more subtle egg manipulations including conditions of egg storage prior incubation (66) or thermal manipulation of eggs (67), on many aspects of chicken embryo's development and

health. We believe that the identification of a set of molecular markers for abnormal embryonic development in chicken extraembryonic fluids, will contribute to the development of tools for improving poultry management, and increase the robustness of chicks and chickens to help them face contrasted and changing environments.

REFERENCES

1. Moran, E. T., Jr. (2007) Nutrition of the developing embryo and hatchling. *Poult. Sci.* 86, 1043-1049

2. Bellairs, R., and Osmond, M. (2014) *The Atlas of Chick Development*, Third edition Ed., Academic Press, Oxford, UK

3. Sheng, G., and Foley, A. C. (2012) Diversification and conservation of the extraembryonic tissues in mediating nutrient uptake during amniote development. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1271, 97-103

4. Yadgary, L., Wong, E. A., and Uni, Z. (2014) Temporal transcriptome analysis of the chicken embryo yolk sac. *BMC Genomics* 15, 690

5. Gabrielli, M. G., and Accili, D. (2010) The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 940741

6. Underwood, M. A., Gilbert, W. M., and Sherman, M. P. (2005) Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *J. Perinatol.* 25, 341-348

7. Bakalar, N. (2012) Sensory science: partners in flavour. *Nature* 486, S4-5

8. Orczyk-Pawilowicz, M., Jawien, E., Deja, S., Hirnle, L., Zabek, A., and Mlynarz, P. (2016) Metabolomics of Human Amniotic Fluid and Maternal Plasma during Normal Pregnancy. *PloS one* 11, e0152740 9. Michaels, J. E. A., Dasari, S., Pereira, L., Reddy, A. P., Lapidus, J. A., Lu, X. F., Jacob, T., Thomas, A., Rodland, M., Roberts, C. T., Gravett, M. G., and Nagalla, S. R. (2007) Comprehensive proteomic analysis of human amniotic fluid proteome: the Gestational age-dependent changes. J. Proteome Res. 6, 1277-1285

Romero, R., Kusanovic, J. P., Gotsch, 10. F., Erez, O., Vaisbuch, E., Mazaki-Tovi, S., Moser, A., Tam, S., Leszyk, J., Master, S. R., Juhasz, P., Pacora, P., Ogge, G., Gomez, R., Yoon, B. H., Yeo, L., Hassan, S. S., and Rogers, W. T. (2010) Isobaric labeling and tandem mass spectrometry: A novel approach profiling and quantifying for proteins differentially expressed in amniotic fluid in preterm labor with and without intra-amniotic infection/inflammation. J. Matern. Fetal Neonatal. Med. 23, 261-280

11. Cho, C. K. J., Shan, S. J., Winsor, E. J., and Diamandis, E. P. (2007) Proteomics analysis of human amniotic fluid. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1406-1415

12. Romanoff, A. L. (1960) *The Avian Embryo. Structural and functional development*, The Macmillan Compagny, New York

13. Romanoff, A. L., and Romanoff, A. J. (1967) *Biochemistry of the avian embryo: A Quantitative Analysis of Prenatal Development*, John Wiley & Sons, Inc., London, Sydney

14. Yoshizaki, N., Ito, Y., Hori, H., Saito, H., and Iwasawa, A. (2002) Absorption, transportation and digestion of egg white in quail embryos. *Dev. Growth Differ*. 44, 11-22

15. Geelhoed, S. E., and Conklin, J. L. (1966) An electrophoretic study of proteins in chick embryonic fluids. *J. Exp. Zool.* 162, 257-261

16. Baintner, K., and Fehér, G. (1974) Fate of egg white trypsin inhibitor and start of proteolysis in developing chick embryo and newly hatched chick. *Dev. Biol.* 36, 272-278

17. Cirkvenčič, N., Narat, M., Dovč, P., and Benčina, D. (2012) Distribution of chicken cathepsins B and L, cystatin and ovalbumin in extra-embryonic fluids during embryogenesis. *Br. Poult. Sci.* 53, 623-630

18. Sugimoto, Y., Sanuki, S., Ohsako, S., Higashimoto, Y., Kondo, M., Kurawaki, J., Ibrahim, H. R., Aoki, T., Kusakabe, T., and Koga, K. (1999) Ovalbumin in developing chicken eggs migrates from egg white to embryonic organs while changing its conformation and thermal stability. *J. Biol. Chem.* 274, 11030-11037

19. Muramatsu, T., Hiramoto, K., Koshi, N., Okumura, J., Miyoshi, S., and Mitsumoto, T. (1990) Importance of albumen content in whole-body protein synthesis of the chicken embryo during incubation. *Br. Poult. Sci.* 31, 101-106

20. Da Silva, M., Labas, V., Nys, Y., and Rehault-Godbert, S. (2017) Investigating proteins and proteases composing amniotic and allantoic fluids during chicken embryonic development. *Poult. Sci.* 96, 2931-2941

21. Tian, X., Gautron, J., Monget, P., and Pascal, G. (2010) What Makes an Egg Unique? Clues from Evolutionary Scenarios of Egg-Specific Genes. *Biol. Reprod.* 83, 893-900

22. Clinton, M., Haines, L., Belloir, B., and McBride, D. (2001) Sexing chick embryos: a rapid and simple protocol. *Br. Poult. Sci.* 42, 134-138

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., 23. and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal. Chem. 68, 850-858 24. Vilella, A. J., Severin, J., Ureta-Vidal, A., Heng, L., Durbin, R., and Birney, E. EnsemblCompara GeneTrees: (2009)duplication-aware Complete, phylogenetic trees in vertebrates. Genome Res. 19, 327-335 25. Dufourny, L., Levasseur, A., Migaud, M., Callebaut, I., Pontarotti, P., Malpaux, B., and Monget, P. (2008) GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c: evidence of rapid evolution in mammals. *BMC Evol. Biol.* 8, 105

26. Guyot, N., Labas, V., Harichaux, G., Chesse, M., Poirier, J. C., Nys, Y., and Rehault-Godbert, S. (2016) Proteomic analysis of egg white heparin-binding proteins: towards the identification of natural antibacterial molecules. *Sci. Rep.* 6, 27974

27. Bhunia, A. K., Johnson, M. C., and Ray, B. (1987) Direct Detection of an antimicrobial peptide of Pediococcus-Acidilactici in Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis *J. Ind. Microbiol.* 2, 319-322

28. Hamburger, V., and Hamilton, H. L. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88, 49-92

29. Rehault-Godbert, Guyot. N., S., Slugocki, C., Harichaux, G., Labas, V., Helloin, Е., and Nys, Y. (2016)Characterization of egg white antibacterial properties during the first half of incubation: A comparative study between embryonated and unfertilized eggs. Poult. Sci. 95, 2956-2970

30. Da Silva, M., Beauclercq, S., Harichaux, G., Labas, V., Guyot, N., Gautron, J., Nys, Y., and Rehault-Godbert, S. (2015) The Family Secrets of Avian Egg-Specific Ovalbumin and Its Related Proteins Y and X. *Biol. Reprod.* 93, 71

31. Wellman-Labadie, O., Lakshminarayanan, R., and Hincke, M. T. (2008) Antimicrobial properties of avian eggshell-specific C-type lectin-like proteins. *FEBS letters* 582, 699-704

32. Bourin, M., Gautron, J., Berges, M., Attucci, S., Le Blay, G., Labas, V., Nys, Y., and Rehault-Godbert, S. (2011) Antimicrobial Potential of Egg Yolk Ovoinhibitor, a Multidomain Kazal-like Inhibitor of Chicken Egg. J. Agric. Food Chem. 59, 12368-12374

33. Dombre, C., Guyot, N., Moreau, T., Monget, P., Da Silva, M., Gautron, J., and Rehault-Godbert, S. (2017) Egg serpins: The chicken and/or the egg dilemma. *Semin. Cell Dev. Biol.* 62, 120-132

34. Ahlroth, M. K., Grapputo, A., Laitinen, O. H., and Kulomaa, M. S. (2001) Sequence features and evolutionary mechanisms in the chicken avidin gene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 734-741

35. Brawand, D., Wahli, W., and Kaessmann, H. (2008) Loss of egg yolk genes in mammals and the origin of lactation and placentation. *PLoS Biol.* 6, e63

36. Brawand, D., Wahli, W., and Kaessmann, H. (2008) Loss of egg yolk genes in mammals and the origin of lactation and placentation. *PLoS biology* 6, e63

37. Metz-Boutigue, M. H., Jolles, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J., and Jolles, P. (1984) Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur. J. Biochem.* 145, 659-676

38. Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., and Tomita, M. (1992) Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 1121, 130-136

39. Baron, F., Jan, S., Gonnet, F., Pasco, M., Jardin, J., Giudici, B., Gautier, M., Guerin-Dubiard, C., and Nau, F. (2014) Ovotransferrin plays a major role in the strong bactericidal effect of egg white against the Bacillus cereus group. *J. Food Prot.* 77, 955-962

40. Mann, K. (2007) The chicken egg white proteome. *Proteomics* 7, 3558-3568

41. Mann, K., and Mann, M. (2008) The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. *Proteomics* 8, 178-191

42. Palmiter, R. D. (1972) Regulation of protein synthesis in chick oviduct. I. Independent regulation of ovalbumin, conalbumin, ovomucoid, and lysozyme induction. *J. Biol. Chem.* 247, 6450-6461

43. Nakano, T., and Graf, T. (1991) Goose-type lysozyme gene of the chicken: sequence, genomic organization and expression reveals major differences to chicken-type lysozyme gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1090, 273-276

44. Slade, B., and Milne, J. (1977) Localization and synthesis of alphafetoprotein in the chicken. *Cell Tissue Res.* 180, 411-419

45. Anton, M. (2013) Egg yolk: structures, functionalities and processes. *Journal of the science of food and agriculture* 93, 2871-2880 46. Malik, G. K., Sinha, S. M., Saksena, P. N., Kapoor, A. K., Mehra, P., Bagchi, M., Agarwal, D. K., and Tuteja, N. (1981) Amniotic fluid proteins in relation to fetal maturity. *Indian J. Pediatr.* 48, 149-152

47. Retzek, H., Steyrer, E., Sanders, E. J., Nimpf, J., and Schneider, W. J. (1992) Molecular cloning and functional characterization of chicken cathepsin D, a key enzyme for yolk formation *DNA Cell Biol*. 11, 661-672

48. Nelson, T. C., Groth, K. D., and Sotherland, P. R. (2010) Maternal investment and nutrient use affect phenotype of American alligator and domestic chicken hatchlings. *Comp. Biochem. Physiol. A-Molecular & Integrative Physiology* 157, 19-27

49. Maehashi, K., Ueda, M., Matano, M., Takeuchi, J., Uchino, M., Kashiwagi, Y., and Watanabe, T. (2014) Biochemical and functional characterization of transiently expressed in neural precursor (TENP) protein in emu egg white. *J. Agric. Food Chem.* 62, 5156-5162

50. Elo, H. A., and Korpela, J. (1984) The occurrence and production of avidin: a new conception of the high-affinity biotin-binding protein. Comp. Biochem. Physiol. B 78, 15-20 51. Matulova, M., Rajova, J., Vlasatikova, L., Volf, J., Stepanova, H., Havlickova, H., and Sisak. F., Rychlik, I. (2012)Characterization chicken spleen of transcriptome after infection with Salmonella

enterica serovar Enteritidis. PloS one 7,

e48101

52. Nakimbugwe, D., Massehalck, B., Atanassova, M., Zewdie-Bosuner, A., and Michiels, C. W. (2006) Comparison of bactericidal activity of six lysozymes at atmospheric pressure and under high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 355-363

53. Sellier, N., Vidal, M. L., Baron, F., Michel, J., Gautron, J., Protais, M., Beaumont, C., Gautier, M., and Nys, Y. (2007) Estimations of repeatability and heritability of egg albumen antimicrobial activity and of lysozyme and ovotransferrin concentrations. *Br. Poult. Sci.* 48, 559-566

Herve-Grepinet, V., Rehault-Godbert, 54. S., Labas, V., Magallon, T., Derache, C., Lavergne, M., Gautron, J., Lalmanach, A. C., and Nvs. Y. (2010) Purification and Characterization of Avian beta-Defensin 11, an Antimicrobial Peptide of the Hen Egg. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 4401-4408 Rehault-Godbert, S., 55. Labas, V., Helloin, E., Herve-Grepinet, V., Slugocki, C., Berges, M., Bourin, M.-C., Brionne, A., Poirier, J.-C., Gautron, J., Coste, F., and Nys, Y. (2013) Ovalbumin-related Protein X Is a Heparin-binding **Ov-Serpin** Exhibiting Antimicrobial Activities. J. Biol. Chem. 288, 17285-17295

56. Tollin, M., Bergsson, G., Kai-Larsen, Y., Lengqvist, J., Sjovall, J., Griffiths, W., Skuladottir, G. V., Haraldsson, A., Jornvall, H., Gudmundsson, G. H., and Agerberth, B. (2005) Vernix caseosa as a multi-component defence system based on polypeptides, lipids and their interactions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62, 2390-2399

57. Yoshio, H., Tollin, M., Gudmundsson, G. H., Lagercrantz, H., Jornvall, H., Marchini, G., and Agerberth, B. (2003) Antimicrobial polypeptides of human vernix caseosa and amniotic fluid: implications for newborn innate defense. *Pediatric research* 53, 211-216 58. Cunningham, M., and Tang, J. (1976) Purification and properties of cathepsin D

from porcine spleen. J. Biol. Chem. 251, 4528-4536

59. Castellano, A. C., Barteri, M., Bianconi, A., Bruni, F., Della Longa, S., and Paolinelli, C. (1996) Conformational changes involved in the switch from ovalbumin to Sovalbumin. *Z Naturforsch C*. 51, 379-385

60. Yamasaki, M., Takahashi, N., and Hirose, M. (2003) Crystal structure of S-ovalbumin as a non-loop-inserted thermostabilized serpin form. *J. Biol. Chem.* 278, 35524-35530

61. Spencer, K., Muller, F., and Aitken, D. A. (1997) Biochemical markers of trisomy 21 in amniotic fluid. *Prenat. Diagn.* 17, 31-37

62. Liu, Y., Liu, Y., Du, C., Zhang, R., Feng, Z., and Zhang, J. (2016) Diagnostic value of amniotic fluid inflammatory biomarkers for subclinical chorioamnionitis. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 134, 160-164

63. Hsu, T. Y., Lin, H., Hung, H. N., Yang, K. D., Ou, C. Y., Tsai, C. C., Cheng, H. H., Chung, S. H., Cheng, B. H., Wong, Y. H., Chou, A. K., and Hsiao, C. C. (2016) Two-Dimensional Differential Gel Electrophoresis to Identify Protein Biomarkers in Amniotic Fluid of Edwards Syndrome (Trisomy 18) Pregnancies. *PloS one* 11, e0145908

64. Wolanski, N. J., Renema, R. A., Robinson, F. E., Carney, V. L., and Fancher, B. I. (2007) Relationships among egg characteristics, chick measurements, and early growth traits in ten broiler breeder strains. *Poult. Sci.* 86, 1784-1792

65. Karcher, D. M., Jones, D. R., Abdo, Z., Zhao, Y., Shepherd, T. A., and Xin, H. (2015) Impact of commercial housing systems and nutrient and energy intake on laying hen performance and egg quality parameters. *Poult. Sci.* 94, 485-501

66. Bakst, M. R., Welch, G. R., Fetterer, R., and Miska, K. (2016) Impact of broiler egg storage on the relative expression of selected blastoderm genes associated with apoptosis, oxidative stress, and fatty acid metabolism. *Poult. Sci.* 95, 1411-1417

67. Loyau, T., Hennequet-Antier, C., Coustham, V., Berri, C., Leduc, M., Crochet, S., Sannier, M., Duclos, M. J., Mignon-Grasteau, S., Tesseraud, S., Brionne, A., Metayer-Coustard, S., Moroldo, M., Lecardonnel, J., Martin, P., Lagarrigue, S., Yahav, S., and Collin, A. (2016) Thermal manipulation of the chicken embryo triggers differential gene expression in response to a later heat challenge. *BMC Genomics* 17, 329

ACKNOWLEDGEMENTS:

The authors wish to thank Joël Delayeau and Christophe Rat (INRA, UE PEAT 609, F-37380 Nouzilly, France) for providing fertilized eggs; Angelina Trotereau and Nathalie Winter (UMR UR1282 Infectiologie Animale et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France) who gave us access to L2 laboratories, which was required to perform antimicrobial assays using bacterial pathogenic strains. This work was supported by MUSE project (Région Centre Val de Loire, 2014-00094512) and SAPHYR project (Région Centre Val de Loire, 2017). The high-resolution mass spectrometer (LTQ Velos Orbitrap) was financed (SMHART project) by the European Regional Development Fund (ERDF), the Conseil Régional du Centre, the French National Institute for Agricultural Research (INRA) and the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication. The authors are very grateful to Region Centre Val de Loire for financing Mylène Da Silva's PhD.

AUTHORS CONTRIBUTION

MDS and SRG designed experiments, collected samples, analyzed and integrated data and wrote the manuscript. CD conducted the phylogenic analysis, realized the related figures and was in charge of writing the corresponding experimental procedures, results and discussion of the manuscript. AB performed gene ontology annotation of AF proteins and contributed to the critical analysis of proteomic data. MC and MDP adapted and conducted the antimicrobial experiments and MDP also carried out heparin-sepharose chromatography of AF and SDS-PAGE analyses of protein fractions. PM used his expertise to analyze phylogenetic results and contributed to the overall discussion of the data. LCS and VL were involved in the initial design of the proteomic experiments and conducted proteome profilings. NG contributed to the overall discussion of the data, and brought his specific expertise on egg white antimicrobial proteins and peptides, as as on antimicrobial assays. well YN participated in the conception of the project, scientific analyses of the data and discussions. authors read the manuscript All and contributed to the critical revision of the paper.



Figure 1. Schematic representation of the extraembryonic structures during the chicken (A) and human embryonic development (B); embryos at mid-incubation (11 days) and mid-gestation (21 weeks), respectively.



Figure 2. SDS-PAGE analysis of the chicken amniotic fluid (AF) during incubation. A. 12.5% SDS-PAGE analysis of the AF from days 8-11 to days 12-16 of the incubation (ED8-11 to ED12- 16) (2 μ g and 10 μ g, respectively) followed by Coomassie blue staining. B. 4-20% SDS-PAGE profile of AF at ED11 for in-gel mass spectrometry analysis. Horizontal lanes and numbers indicate the position of gel slices (1-20) prepared for in-gel digestion by trypsin. Molecular masses are expressed in kDa.



Figure 3. Quantitative distribution of the 91 proteins identified in the chicken amniotic fluid at ED11, for in-solution and in-gel mass spectrometry analyses. Proteins are represented according to log10 of their Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) and log10 of the percentage of their protein sequence coverage. The most abundant proteins identified after compilation of data resulting from both approaches are illustrated in a red square. They were further analyzed for functional annotation as shown in Table 1.



Figure 4. Functions of the proteins identified in the chicken amniotic fluid at ED11. Using gene ontology terms, as described in Experimental procedures, 80 genes could be assigned to five major functions whereas the biological function of 10 proteins are still not documented in this database (this latter group includes ovalbumin (OVAL) and ovomucoid (SPINK7), two proteins of high abundance (Table 1, Supplementary data S3).



Figure 5. Venn diagrams representing the specific and overlapping proteins identified in the human (16-18 weeks of gestation) and chicken (11th day of incubation) amniotic fluid (AF). Human AF data were obtained from the work of Cho et al. (11), which combines results from nine publications (Supplementary data 3, sheet #3).

A-AF ED11



B-AF ED16



Figure 6. Antibacterial activity of the chicken amniotic fluid (AF) before and after the egg white transfer into the amniotic sac (ED11 and ED16, respectively). AF samples were analyzed by Coomassie blue staining (Cb) and their antibacterial activities were assessed against *Listeria monocytogenes (L.m.)* and *Salmonella enterica* Enteritidis (S.E.). Flow-through and eluted fractions were obtained after affinity chromatography on heparin-sepharose as described in Experimental procedures. Black arrows indicate inhibition zones corresponding to an impaired bacterial growth (due to bacteriostatic or bactericidal activities of AF proteins or peptides). Red letters A to F correspond to bands that were cut from the Cb gel, prior analysis by mass spectrometry for protein identification (Table 2).



Figure 7. Antibacterial activity of the heparin-bound proteins of egg white at ED0 (day of lay), at ED8 (8th day of incubation) and ED14 (14th day of incubation). Proteins were analyzed by Coomassie blue staining (Cb) and their antibacterial activities were assessed against *Listeria monocytogenes (L.m.)* and *Salmonella enterica* Enteritidis (*S.E.*), as described in Experimental procedures. Black arrows indicate inhibition zones corresponding to an impaired bacterial growth (due to bacteriostatic or bactericidal activities of egg white proteins or peptides).



Figure 8.

Figure 8. Evolutionary scenario of the chicken amniotic fluid (AF) proteins. (A) Evolutionary frieze of the 91 proteins identified in the AF on the 11th day of incubation (ED11), and of the 13 potential antibacterial candidates identified in the AF at ED16 (in grey). The 11 genes underlined in yellow are specific to birds and/or reptiles. (B) Life tree of the bird and/or reptile specific 11 genes (underlined in yellow) that display bird and/or reptile specificities. The presence of a gene is depicted by a solid symbol, while the loss of a gene is depicted by a hollow symbol and marked with " Ψ ." The divergent time of lineages refer to phylogenetic and Tian et al. (21)analysis using **ENSEMBL** (http://www.ensembl.org/index.html). For SPINK5 and SPINK7 genes, which are marked with a question mark, we cannot state on the distribution of these genes within amniotes, based on the data currently available in Ensembl databases and despite synteny analysis of these genes. This issue is discussed in the Results section.

Table 1 Top-ten abundant proteins found in the chicken amniotic fluid at ED11 using insolution and in-gel mass spectrometry analysis. Quantitative values are expressed as the percentage of the Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI). Words in italics refer to hypothetical/unknown functions. Proteins that are also listed in the top 15 high abundance proteins from the human amniotic fluid are indicated with an asterisk (9, 11).

Gene symbol	Gene Description	In-Gel % emPAI	In-Solution % emPAI	Biological function	Cellular component
APOA1*	Apolipoprotein A-I	27.8	39.1	Lipid metabolism	Secreted
OVAL	Ovalbumin	7.8	2.0	Nutrition	Secreted
TF*	Ovotransferrin	7.8	17.6	Defense response; Iron metabolism	Secreted
AFP*	Alpha-fetoprotein	7.5	7.7	Blood pressure homeostasis; Development (folliculogenesis)	Secreted
LYZ	Lysozyme C	3.4	1.7	Defense response	Secreted
ALB*	Serum albumin	3.3	1.6	Blood pressure homeostasis; Fatty acid, DNA, ion metabolism	Secreted
GC*	Vitamin D-binding protein	3.2	0.4	Vitamin metabolism	Secreted
TTR	Transthyretin isoform 1	2.8	3.5	Vitamin and hormone metabolisms	Secreted
SPINK7	Ovomucoid isoform 1	-	2.4	Regulation of proteolytic processes	Secreted
APOC3	Apolipoprotein C-III	-	7.1	Lipid metabolism	Extracellular region

Table 2. Potential antibacterial candidates identified in the heparin-binding fraction of the chicken amniotic fluid at ED11 and ED16. Proteins contained in the SDS-PAGE bands corresponding to bacterial inhibition zones (*Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis, Fig. 6) were analyzed using mass spectrometry. Bands where spectral counts were the highest are indicated in bold.

Identified Proteins (29)	Accession Number	Gene symbol	Molecular	Corresponding SDS-
			Mass (kDa)	PAGE bands (Fig. 6)
Mutant cysteine-rich FGF receptor [G. gallus]	AAB39211.1	GLG1	122	G
Avidin [G. gallus]	CAC34569.1	AVD	17	B, C, D, E, F, G, H
OvoglobulinG2 type BB [G. gallus]	BAM13273.1	BPIFB2	47	B, C, D, E, F
Ovomacroglobulin, ovostatin [G. gallus]	CAA55385.1	OVST	164	С
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1, precursor [G. gallus]	NP_990852.1	ATP1A1	112	Α
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor [G. gallus]	NP_990792.1	PPIB	19	E
Mucin-6, partial [G. gallus]	XP_015142236.1	MUC6	98	В, С
Metalloproteinase inhibitor 2 precursor [G. gallus]	NP_989629.1	TIMP2	22	E
Metalloproteinase inhibitor 3 precursor [G. gallus]	NP_990818.1	TIMP3	20	E
Gallinacin-11 precursor [G. gallus]	NP_001001779.1	AvBD11	12	С
Ovoinhibitor precursor [G. gallus]	NP_001025783.2	SPINK5	52	В, С
Ovalbumin-related protein Y [G. gallus]	NP_001026172.1	OVALY	44	B, C, D
Elongation factor 1-alpha 1 [G. gallus]	NP_001308445.1	EEF1A1	50	G
Vitelline membrane outer layer protein 1 precursor [G. gallus]	NP_001161233.1	VMO1	20	C, E, F , G
Astacin-like metalloendopeptidase precursor [G. gallus]	NP_001292019.1	ASTL	46	D
Lysozyme C [G. gallus]	P00698.1	LYZ	16	A, B, C, D, E, F, G, H
Ovalbumin [G. gallus]	P01012.2	OVAL	43	A, B, C, D, E, F, G, H
Ovotransferrin [G. gallus]	P02789.2	TF	78	В, С
Ovocleidin-17 [G. gallus]	Q9PRS8.2	OC-17	15	G
Ovomucin [G. gallus]	XP_003641415.1	MUC5B	234	В, С
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6B [G. gallus]	XP_004947191.1	TNFRSF6B	38	D
Beta-actin [G. gallus]	CAA25004.1	ACTB	46	A , G
Beta-microseminoprotein-like [N. notabilis]	XP_010010315.1	LOC104403769	15	C, E , F, G
Ovalbumin-related protein X [G. gallus]	XP_015137660.1	OVALX	45	B, C, D , E, F, G
Clusterin [G. gallus]	XP_015140573.1	CLU	62	С
Midkine [G. gallus]	XP_015142525.1	MDK	16	G
Alpha-2-macroglobulin-like protein 1 [G. gallus]	XP_015148230.1	A2ML1	160	В, С
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial [G. gallus]	NP_989617.1	ATP5A1Z	56	Α
Deleted in malignant brain tumors 1 protein-like [G. gallus]	XP 015156102.1	DMBT1L3	100	В, С

In italics: LOC104103769 from *N. Notabilis* has a *G. Gallus* homologue (LOC101750704), which has been erroneously removed from Pubmed database following the release of Gallus_gallus-5.0 assembly in 2017. This chicken homologue has been unambiguously identified in egg white (25) and shares 88.7% sequence identity with LOC104403769 from *N. notabilis*.

V - Discussion et perspectives

Chez l'oiseau, l'ensemble des mécanismes de défense physiques, chimiques, ou moléculaires mis en place lors de la formation de l'œuf dans l'oviducte, sont progressivement altérés au cours de l'incubation. Le système immunitaire adaptatif de l'embryon n'étant actif qu'après éclosion, l'absence de défense face aux pathogènes pourrait ainsi mettre en péril son développement. Toutefois, au cours de l'incubation, les structures dites extra-embryonnaires qui apparaissent au sein de l'œuf - les sacs vitellin, amniotique et chorioallantoïque, forment de nouvelles barrières freinant la progression des pathogènes. L'assimilation par ces sacs extra-embryonnaires des composés de la coquille, de la membrane vitelline, du blanc et du jaune d'œuf, entraine un réarrangement et une redistribution des défenses primaires de l'œuf, et notamment des protéines et peptides antibactériens, dans les fluides extra-embryonnaires.

Pour mieux comprendre ce phénomène et expliquer en quoi les fluides extra-embryonnaires sont impliqués dans la protection de l'embryon d'oiseau au cours de l'incubation, nous avons caractérisé la composition et les propriétés des fluides amniotique (AmF) et allantoïque (AlF) de l'œuf de poule.

- Les paramètres physicochimiques de l'AmF et de l'AlF évoluent selon les besoins énergétiques de l'embryon, et régulent les activités des protéines -

Une première étude visant à caractériser certains paramètres des deux fluides nous a permis d'appréhender leur évolution globale, et de discerner deux grandes phases au cours de l'incubation (Figure 25) : une première phase peu couteuse en énergie (~ED1 à ED12), qui correspond à l'embryogenèse et à l'apparition des structures et des fluides extraembryonnaires ; puis une deuxième phase (~ED12 à ED21), au cours de laquelle le métabolisme embryonnaire s'accélère pour permettre la croissance de l'embryon jusqu'à l'éclosion, ce qui nécessite un apport conséquent en nutriments et en énergie. Cette deuxième phase marque en outre la transition de l'embryon d'un système ectothermique à un système endothermique (Tzschentke, 2008), où l'énergie dégagée par le métabolisme embryonnaire croissant fournit la chaleur nécessaire à l'embryon pour maintenir sa température corporelle. Elle est également associée à des changements drastiques dans la composition et/ou les propriétés biochimiques et physicochimiques des fluides extra-embryonnaires, qui vont être drainés pour les besoins énergétiques de l'embryon (Baggott *et al.*, 2002).



Figure 25 : Frise chronologique illustrant l'évolution des fluides amniotique et allantoïque de l'œuf de poule au cours de l'incubation. Schématisation des transferts de protéines et d'eau entre les structures extra-embryonnaires : 1 à 2) transfert du blanc dans le sac amniotique, 2 à 3) absorption orale du blanc mélangé au fluide amniotique par l'embryon, et endocytose d'une partie par l'intestin, puis 3 à 4/4') sécrétion dans le jaune/sac chorioallantoïque, 4/4' à 5/5') réabsorption par le sac vitellin/chorioallantoïque et 5/5' à 6) transfert des composés digérés ou non vers l'embryon, *via* le réseau sanguin (Article 1). Il existe aussi un transfert direct de protéines du blanc vers le jaune *via* la membrane vitelline résiduelle (1').

Le premier changement intervient à ED12 avec le transfert des protéines du blanc dans le sac amniotique, ce qui augmente la concentration en protéines de l'AmF de 0,01 g/L à 200 g/L environ, d'ED11 à ED14-16 (Article 1). La composition protéique est également modifiée, et ce, dès le début du transfert, avec l'apparition sur le gel SDS-PAGE d'un profil protéique identique à celui du blanc d'œuf d'ED12 à ED16. Ce transfert entraine une augmentation progressive du volume de l'AmF, même si la réabsorption par l'embryon du mélange formé par le blanc et l'AmF à partir d'ED13, régule le volume de fluide au sein du sac amniotique (pas de pic à ED12-13) (Article 1). L'absence de modification du profil protéique du blanc après son transfert, et ce, malgré la présence de protéases actives dans l'AmF (Article 1), est probablement due aux nombreuses antiprotéases localisées dans le blanc d'œuf (cystatine (CST3), ovoinhibiteur (SPINK5), ovomucoïde (SPINK7), ovostatine (OVST)) qui protègent les protéines de la dégradation protéolytique, jusqu'à leur assimilation par l'embryon (Saxena et Tayyab, 1997). Cette hypothèse se confirme notamment par la détection de protéines non digérées dans les organes de l'embryon (tractus digestif, cerveau, muscles, etc.) et ce jusqu'à ED19 (Sugimoto et al., 1999; Shinohara et al., 2005). Ce transfert s'accompagne également de variations temporaires de certains paramètres physicochimiques mesurés dans l'AmF, tels que le pH et l'osmolalité. Cependant, la comparaison avec d'autres études montre que ces paramètres sont régulés et stabilisés du début à la fin de l'incubation, avec des valeurs moyennes d'environ 7,5 unités pH et 260-270 mOsm/kg, pour maintenir un environnement homéostatique autour de l'embryon (Boutilier et al., 1977; Bolin et Burggren, 2013; Bolin et al., 2017). Ce processus de régulation intervient plus particulièrement lors de la seconde moitié de l'incubation, quand l'accélération du métabolisme embryonnaire entraine une sécrétion importante de protons dans le sac amniotique (Everaert et al., 2011). Pour empêcher la diminution du pH de l'AmF, les protons sont alors redirigés vers le compartiment considéré comme le lieu de stockage des déchets métaboliques de l'embryon : le sac allantoïque. Cependant, ce phénomène encore mal décrit affecte le pH de l'AlF, qui diminue progressivement lors de la période étudiée (ED12-16), et même au-delà, pour atteindre une valeur extrême de 5,9 à ED19 (Boutilier et al., 1977). Cette chute de pH s'accompagne d'une baisse de l'osmolalité (227 mOsm/kg à ED8 jusqu'à 191 mOsm/kg à ED16) (Article 1), qui est vraisemblablement liée à l'absorption des ions chlorure et sodium par la membrane allantoïque (Gabrielli et Accili, 2010). Ce processus actif mène à la formation d'un gradient osmotique entre l'AlF et le plasma des vaisseaux sanguins de la membrane, ce qui forme un influx d'eau de l'AlF vers le sang ; cette eau est ensuite redirigée vers l'embryon (Figure 25).

Le volume de l'AlF diminue donc en conséquence à partir d'ED14 et se retrouve réduit de moitié à ED16 (5,5 mL à ED14 contre 3 mL environ à ED16). De nombreux travaux de recherche ont décrit ce mécanisme de transfert comme essentiel au bon développement de l'embryon, notamment pour compenser la perte en eau suite à son évaporation à travers la coquille (environ 20% de la masse totale de l'œuf) (Baggott, 2001; Baggott *et al.*, 2002; Latter et Baggott, 2002). L'eau issue du métabolisme embryonnaire est par conséquent stockée dans le sac allantoïque, puis réabsorbée et redistribuée par sa membrane. Cette baisse de volume entraine également la concentration de l'acide urique présent dans l'AlF, ce qui participe à la chute du pH et de l'osmolalité, car les ions alors contenus dans le fluide sont piégés par les cristaux d'urates qui se forment (Bolin et Burggren, 2013).

Ces variations de pH, d'osmolalité et de concentration en composés toxiques affecteraient probablement la survie et la croissance bactérienne, si des microorganismes parvenaient à contaminer l'œuf *via* la coquille, mais aussi les activités des protéines antibactériennes des fluides, tel que cela a été démontré pour le lysozyme (LYZ) et l'ovotransferrine (TF), les deux acteurs principaux de la défense de l'œuf. En effet, un pH alcalin semble favoriser l'activité chélatrice de TF et ainsi son potentiel antibactérien (Baron et al., 1999), alors que le LYZ atteint son niveau maximal d'activité muramidase à pH 6,5 (Banerjee *et al.*, 2011). L'identification des protéines majeures de l'AmF et de l'AlF par spectrométrie de masse a par ailleurs démontré la présence de ces protéines dans les deux fluides. Leurs activités pourraient donc être modulées au cours de l'incubation, selon le fluide considéré.

- Les flux de blanc et de jaune d'œuf au cours du développement embryonnaire modifient drastiquement la composition et probablement les fonctions de l'AmF -

L'assimilation et le transport des composés du jaune, du blanc et de la coquille est un processus complexe visant à apporter l'ensemble des nutriments et l'énergie nécessaires à l'embryon aux différents stades de son développement (**Figure 25**). Ce processus nécessite le transfert des composés des structures élémentaires de l'œuf fraichement pondu, vers les structures extra-embryonnaires, ce qui modifie la composition des fluides extra-embryonnaires, et probablement leurs fonctions.

Comme décrit précédemment, le transfert du blanc à ED12 dans le sac amniotique marque le début d'une phase intense de croissance et de consommation des nutriments par l'embryon.

Les protéines du blanc mélangées à l'AmF sont progressivement absorbées oralement par l'embryon, et ce, dès ED13. L'assimilation des constituants du blanc se fait alors selon deux processus : l'absorption directe par les cellules intestinales, ou l'absorption via le sac vitellin, après le transfert dans le jaune d'œuf (Figure 25). En effet, une partie des composés du blanc est endocytée de façon non spécifique par l'intestin de l'embryon, ou transportée spécifiquement par des transporteurs placés à la surface des entérocytes (Speier et al., 2012; Miska et al., 2014), puis redirigée via le système sanguin vers les organes de l'embryon. Des protéines telles que l'ovalbumine (OVAL) qui est une des protéines majeures du blanc, mais aussi de l'AmF avant le transfert du blanc, ont donc été retrouvée sous forme entière dans les muscles ou le cerveau de l'embryon (Sugimoto et al., 1999; Shinohara et al., 2005). L'hypothèse actuelle est que les acides aminés des protéines participent à la production de réserves énergétiques sous forme de glucose, via la néoglucogenèse, dans le foie de l'embryon (Dickson, 1983). Le glucose provenant des protéines et de leurs chaines glucidiques (SPINK7 et l'ovomucine (MUC5B et MUC6) sont très glycosylées) servira ensuite à la formation de glycogène dans les muscles de l'embryon, pour subvenir aux besoins énergétiques conséquents que nécessitent l'éclosion et la croissance du jeune poussin (Moran, 2007). Ces protéines du blanc constituent également les protéines majeures de l'AmF avant le transfert du blanc (environ 40% d'OVAL et de TF). Cependant, leur faible concentration (0,01 g/L à ED11) face à celle du blanc d'œuf après le transfert dans l'AmF à ED14-16 (200 g/L) (Article 1) suggère qu'elles seraient le résultat d'un transfert dit « passif », qui prendrait place lors de la formation du fluide dans les premiers stades de l'incubation, quand l'eau contenue dans le blanc d'œuf transite par le jaune puis remplit les structures extra-embryonnaires (Latter et Baggott, 2002) (Figure 25). La composition protéique de l'AmF restant identique d'ED8 à ED11 sur gel SDS-PAGE (Article 1), elle pourrait être similaire pour des stades plus précoces, suite à la formation de l'AmF, quand l'amnios ne recouvre pas encore la totalité de l'embryon à ED2-ED3. Le blanc étant composé principalement de grosses protéines aux fonctions encore méconnues (SPINK7, MUC5B, MUC6, OVAL, etc.), son transfert à ED12 et son absorption orale par l'embryon coïncide parfaitement avec ses besoins en nutriments et en énergie pour éclore (Moran, 2007). Par conséquent, les protéines du blanc absorbées par l'embryon sont en partie transférées dans le jaune, via le cordon formé par le sac vitellin, qui relie l'embryon au jaune (Carinci and Manzoli-Guidotti, 1968; Baintner and Fehér, 1974; Sugimoto et al., 1999; Yoshizaki et al., 2002) (Figure 25), pour y être absorbées et digérées au même titre que les lipides et lipoprotéines du jaune (Noble et Cocchi, 1990; Yadgary et al.,

2011, 2014; Yadgary et Uni, 2012; Speier et al., 2012). Ainsi, la néoglucogenèse qui se déroule dans le sac vitellin prend de l'ampleur vers la fin de l'incubation pour assurer la transformation des acides aminés des protéines du blanc en glucose, pour les besoins énergétiques de l'embryon au moment de l'éclosion et après (Yadgary et al., 2010; Yadgary et Uni, 2012). Par ailleurs, il est également possible qu'une partie des protéines du blanc transite directement du blanc au jaune d'œuf, au niveau de la membrane vitelline résiduelle (Kaspers et al., 1996) (Figure 25). Les composés résultant du métabolisme embryonnaire (lipides, acides aminés, peptides, protéines, minéraux) sont ensuite sécrétés dans le sac allantoïque par les mésonéphros (reins embryonnaires) (Bolin et Burggren, 2013; Bolin et al., 2017). Cependant, l'assimilation des protéines du blanc et leur sécrétion dans l'AIF ne semble pas affecter sa composition, contrairement à l'AmF. En effet, le profil protéique de l'AlF sur gel SDS-PAGE n'est que légèrement modifié d'ED8 à ED16, mais ces changements restent principalement quantitatifs et non qualitatifs (Article 1), suggérant que le métabolisme protéique de l'embryon reste constant sur cette période. Des changements plus marqués pourraient intervenir plus tard au cours de l'incubation, mais le volume de l'AlF diminuant rapidement après ED14 (Article 1), ces variations n'ont pas pu être étudiées, faute de matériel disponible. Les protéines majeures identifiées à ED16 dans l'AlF sont principalement issues du jaune d'œuf, et associées dans le transport de composés (lipides, ions, vitamines, hormones) : l'apolipoprotéine B (APOB), l'albumine sérique (ALB), la protéine liant à la vitamine D (GC), la transthyrétine (TTR), la protéine liant aux acides gras extracellulaires (ExFABP) et l'apolipoprotéine A1 (APOA1) (Article 1). Quelques protéines du blanc sont également présentes (OVAL et TF), alors que d'autres sont synthétisées par l'embryon ou les membranes extra-embryonnaires, telles que le sac vitellin (l'alpha-foetoprotéine (AFP)).

L'observation de telles protéines, sous forme entière pour certaines (poids moléculaires attendus et couverture quasi-totale de la séquence protéique en spectrométrie de masse), donne un autre sens à l'AIF considéré jusqu'à présent comme un réceptacle pour les déchets issus du métabolisme embryonnaire. En outre, certaines de ces protéines restent actives après leur sécrétion dans le sac allantoïque comme le facteur de coagulation 10 (F10) ou la thrombine (F2), toutes deux responsables de l'activation du virus de la grippe aviaire dans l'œuf (Article 1) (Gotoh *et al.*, 1990; Ogasawara *et al.*, 1992; Wanitchang *et al.*, 2010). La présence de protéases dans l'AIF reste encore inexpliquée. Leur sécrétion par l'embryon et la membrane chorioallantoïque, ou même le transfert depuis un autre compartiment, restent encore à définir, tout comme l'impact des variations des paramètres physicochimiques de

l'AlF sur leurs activités (Article 1). Cependant, il a déjà été établi que l'activité des protéases dans l'AlF était dépendante du pH ; certaines ont une activité accrue à pH neutre et quasiment nulle à pH acide (pH 5) (Kandeil *et al.*, 2014). Les valeurs extrêmes de pH atteintes dans l'AlF à la fin de l'incubation (Boutilier *et al.*, 1977), pourraient par conséquent constituer un frein à l'activité de telles protéases, et ainsi, dans le cas de F10 et F2, empêcher l'activation du virus de la grippe. Il semblerait donc que les paramètres physicochimiques de l'AlF puissent moduler partiellement les activités de ses composants, et, ce faisant, ils régulent le potentiel antibactérien du fluide, dont la sensibilité à l'infection pourrait être différente selon le stade du développement.

- La membrane allantoïque et l'AIF participent à l'assimilation des nutriments de l'œuf -

Pour mieux comprendre comment ces activités protéolytiques sont modulées au cours de l'incubation, et quelle pourrait être la finalité d'une telle régulation sur le potentiel antibactérien de l'AIF, nous avons analysé l'activité des protéases du fluide. Pour un même volume utilisé à chaque stade en zymographie, l'activité protéolytique de l'AlF augmente d'ED8 à ED16, une tendance qui a été confirmée par une analyse de l'activité en solution, en utilisant des substrats chromogéniques (Article 1). Les analyses ayant été réalisée à pH neutre pour tous les stades (pH physiologique), l'effet pH n'est pas mis en cause ici. D'autres hypothèses ont donc été formulées pour expliquer ce phénomène : 1) une augmentation globale de la concentration en protéines et donc en protéases de l'AlF, ce qui correspondrait aux changements quantitatifs observés sur le gel SDS-PAGE d'ED8 à ED16 (Article 1), 2) l'activation de protéases endogènes, présentes jusqu'alors sous forme de précurseurs inactifs, ou 3) l'apparition de nouvelles protéases, soit sécrétées par l'embryon et la membrane chorioallantoïque, soit en provenance d'autres compartiments de l'œuf tels que le sac vitellin et le jaune, qui restent les principales sources de protéases dans l'œuf (Retzek et al., 1992). L'analyse par spectrométrie de masse des bandes associées aux activités protéolytiques visualisées sur les zymogrammes à ED16, a mené à l'identification de 12 protéases dans l'AIF. Parmi celles-ci, on retrouve les deux facteurs de coagulation précédemment cités : F10 et F2, dont la fonction exacte dans le fluide est encore inconnue. Cependant, la proximité de la membrane chorioallantoïque et de son vaste réseau sanguin, laisse à supposer que ces deux protéases seraient impliquées dans le remodelage tissulaire des vaisseaux sanguins.

Les autres protéases identifiées participent à de nombreux processus, tels que la morphogénèse des plumes (la métalloprotéinase de matrice 2 (MMP2)) (Jiang et al., 2011), ou

la morphogenèse du tractus digestif et des reins (l'activateur du facteur de croissance des hépatocytes (HGFAC)) (Matsubara et al., 1998; van Adelsberg et al., 2001), ce qui pourrait expliquer leur présence dans l'AlF (Article 1). Une protéase en particulier a retenu notre attention : la métalloendopeptidase de type astacine (ASTL). Cette protéase appartient à une vaste famille d'enzymes impliquées dans les processus d'éclosion ou de dégradation des membranes extra-embryonnaires. De telles protéases ont déjà été identifiées dans l'œuf d'oiseau, dont une sur la membrane chorioallantoïque dans l'œuf de caille, qui participe à la dégradation de la matrice organique de la coquille pour favoriser l'accès au calcium en particulier à partir d'ED13-ED14 (Elaroussi et DeLuca, 1994). D'autres ont aussi été identifiées chez d'autres espèces notamment chez les poissons (Kawaguchi et al., 2013), et même chez certains mammifères (humains, souris) (Quesada et al., 2004). La présence d'une telle protéase dans l'AIF quelques jours avant l'éclosion (ED16) pourrait témoigner de la mise en place précoce d'un processus de sortie, peut-être via la dégradation de la membrane chorioallantoïque. Cependant, sa présence dès les premiers stades de l'embryogenèse dans l'épithélium embryonnaire (tube neural, reins, gonades, cœur, muscle, etc.) et sa régulation précise en fonction du tissu et du stade étudié, atteste aussi du rôle majeur que tient cette protéase dans la morphogénèse des organes chez la poule (Acloque et al., 2012).

De façon surprenante, quatre des 12 protéases identifiées sont des acteurs reconnus de la digestion chez le poulet adulte (Recoules et al., 2017) : l'aminopeptidase (ANPEP), la dipeptidyl peptidase 4 (DPP4), la sous-unité alpha de la méprine A (MEP1A) et MMP2 (Article 1). Identifiée dans le jaune d'œuf non fertilisé (Mann et Mann, 2008), ANPEP est également synthétisée par la paroi intestinale de l'embryon (Speier et al., 2012). Elle est localisée dans l'intestin du jeune poussin quelques jours après l'éclosion, tout comme DPP4 et MEP1A (Gilbert et al., 2010). L'origine de ces protéases dans l'AlF est donc multiple : 1) synthétisées par les cellules intestinales de l'embryon, puis sécrétées en même temps que les urines dans l'AIF, 2) produites directement par la membrane chorioallantoïque et sécrétées dans l'AIF, ou encore, 3) transférées depuis le jaune et le sac vitellin, via l'embryon, dans le sac allantoïque (Carinci et Manzoli-Guidotti, 1968; Baintner et Fehér, 1974; Yoshizaki et al., 2002). Chez certains mammifères, les protéases de la famille des méprines sont également synthétisées par les reins (Sterchi et al., 2009). Les substrats de ces protéases ne sont pas encore définis, mais des analyses métabolomiques préliminaires réalisées par résonnance magnétique nucléaire sur une fraction filtrée de l'AIF à ED10 (cut-off de 3000 kDa), a révélé la présence de nombreux acides aminés libres : l'alanine, la glutamine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la phénylalanine, la sérine, la tyrosine et la valine (Annexe 1). Ces derniers sont issus du métabolisme embryonnaire ou de la digestion des protéines par les protéases de l'AIF, et leurs quantités varient probablement dans les derniers stades de l'incubation, avec l'augmentation du métabolisme embryonnaire. En outre, le pH observé dans le compartiment, particulièrement dans le dernier tiers de l'incubation, donne un environnement approprié pour l'activité des protéases digestives (Recoules et al., 2017). D'autre part, les similitudes structurales et fonctionnelles entre la membrane chorioallantoïque qui absorbe et transfère les ions et l'eau de l'AlF vers l'embryon, avec le sac vitellin qui absorbe, digère et transfère les lipoprotéines du jaune vers l'embryon, suggèrent que le sac allantoïque pourrait également être un acteur de l'assimilation des protéines de l'œuf ou de leur activation, et/ou permettrait le recyclage de certains métabolites excrétés. En effet, l'œuf étant une enceinte close, les systèmes capables d'assimiler les nutriments sont optimisés afin d'utiliser tous les constituants à disposition, pour le développement de l'embryon. L'eau sécrétée dans le sac allantoïque étant réabsorbée par la membrane chorioallantoïque, il pourrait en être de même pour les protéines, les peptides et les acides aminés contenus dans l'AIF, d'autant plus que, chez la caille, la membrane chorioallantoïque qui entoure le blanc au niveau du pôle apical de l'œuf, est capable d'endocyter de grandes quantités de blanc pour le transférer vers d'autres compartiments de l'œuf (Yoshizaki et al., 2002). Toutefois, aucune étude n'a encore démontré la présence de récepteurs ou de transporteurs spécialisés dans ce processus sur la membrane qui fait face à l'AlF.

Une autre enzyme identifiée dans ce fluide mérite également d'être discutée : la chitinase mammalienne acide, une enzyme capable de digérer la chitine, un des principaux constituants des insectes et des nématodes. Cette dernière a récemment été identifiée dans le tractus gastro-intestinal chez la poule adulte, et possèderait une double compétence dans la digestion des aliments, et dans la protection contre les parasites (Tabata *et al.*, 2017). Cependant, l'utilisation d'une telle protéine à des fins digestives dans le cas du développement embryonnaire reste restreinte, ce qui sous-entend que cette enzyme est incluse dans d'autres processus au cours de l'incubation.

Malgré l'identification de molécules antibactériennes telles que LYZ ou TF dans l'AlF, son implication dans la défense contre les pathogènes reste à conforter par des tests antibactériens. En complément de cette étude protéomique, il serait pertinent de faire une analyse peptidomique de ce fluide, en regard de la présence de nombreuses protéases actives dans ce fluide. En effet, de nombreux peptides hydrolytiques générés par protéolyse ménagée des protéines endogènes (OVAL, TF, LYZ), acquièrent des fonctions non décrites pour la molécule entière, en particulier des activités antibactériennes (Ibrahim *et al.*, 2000; Mine *et al.*, 2004; Pellegrini *et al.*, 2004; Giansanti *et al.*, 2005). Par ailleurs, sachant que la membrane chorioallantoïque peut être à l'origine d'une réponse cellulaire et moléculaire locale aigüe suite à une infection *via* la coquille (Isaacs et Lindenmann, 1988; Valdes *et al.*, 2002), on peut imaginer que dans un contexte de contamination, elle secrète également un certain nombre d'effecteurs de la réponse innée dans le fluide pour renforcer son potentiel. Seules des approches différentielles entre des œufs contrôles et des modèles expérimentaux d'infection sur œufs embryonnés nous permettront de répondre à cette question.

- L'AmF concentre les protéines et les peptides antibactériens du blanc autour de l'embryon pour le protéger au cours de la seconde moitié de l'incubation -

A l'inverse de l'AIF, l'analyse des activités protéolytiques et l'identification des protéases dans l'AmF a été peu concluante. Toutefois, un phénomène observé après le transfert du blanc dans le sac amniotique reste troublant : l'augmentation importante de l'activité protéolytique de l'AmF (Article 1), et ce, malgré les nombreuses antiprotéases du blanc d'œuf (Saxena et Tayyab, 1997). Pris indépendamment de l'AmF, le blanc d'œuf ne démontre aucune activité protéolytique au cours de l'incubation sauf à ED16. Il semblerait donc qu'au moment du mélange des deux fluides, des protéases soient spécifiquement activées ou synthétisées sans affecter la composition en protéines majeures du blanc d'œuf (Article 1). Ce phénomène reste difficile à expliquer sans connaissance de la composition exacte des deux fluides au moment de leur mélange et une fois mélangés. De plus, l'implication potentielle des membranes environnantes dans ce processus n'est pas à écarter, puisqu'elles pourraient synthétiser et sécréter un certain nombre de protéases au moment du transfert du blanc dans le sac amniotique. L'analyse des cinq protéases identifiées dans l'AmF avant le transfert du blanc (la protéase à sérine transmembranaire 9 (TMPRSS9), le suppresseur de tumeur 14 (ST14), le plasminogène (PLG), la carboxypeptidase M (CPM) et ASTL) ne nous ont pas permis de conclure sur ce point, mais elles ont soulevé d'autres questions concernant les fonctions supplémentaires du fluide au cours de l'incubation (Article 1). Par exemple, ASTL identifiée au préalable dans l'AIF à ED16 (voir partie précédent), est également retrouvée dans l'AmF à ED11 (Article 1) et ED16 (Article 2, Table 2). Même si on ignore son rôle exact dans ce fluide, sa présence peut s'expliquer par la proximité de

l'épithélium de l'embryon qui synthétise cette protéine au cours de l'organogenèse (Acloque *et al.*, 2012).

Pour avoir une vue d'ensemble des fonctions associées à l'AmF, nous avons analysé son protéome à ED11 par spectrométrie de masse, en gel et en solution, ce qui a mené à l'identification de 91 protéines non-redondantes dans ce fluide (Article 2), auxquelles viennent s'ajouter huit protéines identifiées uniquement dans la première analyse qui en dénombrait 47 (Article 1). Si l'on se base uniquement sur le nombre de protéines identifiées, cinq fonctions principales ressortent : la morphogenèse, la migration et l'adhésion cellulaire, le métabolisme, la réponse immunitaire et l'homéostasie (Article 2). Cependant, si on prend en compte l'abondance protéique, les fonctions majoritaires sont portées par des protéines surreprésentées qui constituent environ 66 à 81% du contenu total en protéine (analyses en gel et en solution respectivement), et qui sont impliquées dans le métabolisme des lipides, des vitamines, ou des hormones (APOA1, AFP, ALB, GC, TTR, et l'apolipoprotéine C3 ou APOC3) et la réponse immunitaire (TF et LYZ). Ces deux fonctions restent aussi majoritairement représentées dans l'AmF chez l'humain (Underwood et al., 2005). Ainsi chez l'humain, jusqu'à 25% des protéines de l'AmF sont associées à la réponse immunitaire, avec des protéines apportées principalement par la mère ou synthétisées par les membranes extraembryonnaires (Michaels et al., 2007; Cho et al., 2007). Chez la poule, ce potentiel antibactérien est porté par de multiple effecteurs directs ou indirects dans l'AmF à ED11 : BPIFB2 (protéine TENP), EXFABP, LYZ, MDK (midkine), MUC5B, MUC6, OVALX (ovalbumin-related protein X), SPINK5, SPINK7 et TF, qui ont déjà démontré leur potentiel bactériolytique et/ou bactériostatique chez l'oiseau et /ou l'humain (Ardelt et Laskowski, 1985; Baron et al., 1999, 2014; Nakimbugwe et al., 2006 Svensson; et al., 2010; Bourin et al., 2011; Correnti et al., 2011; Réhault-Godbert et al., 2013; Bar-Shira et al., 2006, 2014; Maehashi et al., 2014; Guyot et al., 2016a). En effet, certaines des protéines identifiées bloquent la multiplication des bactéries en liant des éléments essentiels à leur croissance et à leur survie, comme le fer (EXFABP et TF), en inhibant l'action de protéases bactériennes invasives (SPINK5 et SPINK7), ou en freinant la progression des bactéries au sein de l'œuf (MUC5B et MUC6). D'autres ont une action directe sur les bactéries en perméabilisant leurs parois ce qui entraine leur lyse (BPIFB2, LYZ, MDK et OVALX).

Nous avons démontré que l'activité de l'AmF contre les bactéries *Listeria* monocytogenes (gram positive) et Salmonella enterica Enteritidis (gram négative), augmente

avec le transfert du blanc d'ED11 à ED16 (Article 2). En effet, la concentration très faible en protéine de l'AmF à ED11 (0,01 g/L) lui confère un potentiel antibactérien relativement faible par rapport à celui du blanc d'œuf beaucoup plus concentré en protéines (200 g/L). Ces résultats sont particulièrement parlants pour les fractions de l'AmF enrichies en protéines liant l'héparine (HBP), qui sont reconnues pour leur implication dans la défense de l'œuf (Guyot et al., 2016a). Ainsi, l'analyse par spectrométrie de masse des HBP de l'AmF responsables des activités sur gel à ED11 et à ED16, a mené à l'identification de 30 candidats antibactériens, dont environ la moitié a déjà démontré son potentiel antibactérien chez les oiseaux ou d'autres espèces (Article 2, Table 2). Parmi ces protéines, certaines sont déjà connues pour leur potentiel anti-Listeria monocytogenes et anti-Salmonella Enteritidis dans le blanc d'œuf : LYZ, la bêta-défensine aviaire 11 (AvBD11), la protéine de la membrane externe de la membrane vitelline n°1 (VMO1), la bêta-microséminoprotéine (BMSP), et potentiellement MDK, qui partage 48% d'identité et 67% de similarité de séquence avec la pléiotrophine (PTN) (Guyot et al., 2016a). Ces activités sont donc préservées depuis le blanc d'œuf, jusqu'au moment du transfert dans le sac amniotique, puis une fois mélangé avec l'AmF (Article 2), même si une étude quantitative serait nécessaire pour confirmer le maintien de l'activité au niveau basal dans toutes les fractions.

D'autre part, la concentration des protéines du blanc dans le pôle apical de l'œuf, avant leur transfert, semble avoir un impact sur les interactions protéiques, qui se traduit par l'apparition de complexes/associations dans l'AmF entre des protéines de hautes masses moléculaires (MUC6 et MUC5B) et des protéines ou peptides antibactériens de faibles masses moléculaires (VMO1, LYZ, AvBD11, BMSP, l'ovocléidine-17 (OC-17), etc.). Ce mécanisme ne semble pas altérer les fonctions antibactériennes des protéines, qui conservent une activité sur gel (Article 2), et il pourrait même les protéger de la lyse par les protéases de l'AmF (Article 1), voire des protéases intestinales de l'embryon après ingestion du blanc. Par conséquent, en plus de préparer l'intestin à la digestion, l'absorption du blanc pourrait favoriser le dépôt d'un biofilm protecteur sur les parois intestinales, composé de MUC5B et MUC6, notamment, mais surtout d'immunoglobulines maternelles A et M (IgA et M), déposées dans le blanc d'œuf au moment de sa formation, et qui sont les Igs responsables de la défense antibactérienne dans le tractus digestif chez le poussin et la poule adulte (Bar-Shira et Friedman, 2006; Bar-Shira *et al.*, 2014).

Le maintien d'une telle activité autour de l'embryon forme une nouvelle barrière contre les microorganismes au cours de la seconde moitié de l'incubation, à l'instar des molécules antibactériennes retrouvées dans l'AmF humain. Des orthologues des protéines antibactériennes de l'AmF de poule sont d'ailleurs retrouvées dans l'AmF humain, comme LYZ et TF (Michaels et al., 2007; Cho et al., 2007), qui partagent 57% et 51,73% d'identité de séquence avec le lysozyme et la lactotransferrine humaine respectivement, décrits comme antibactériens (Bellamy et al., 1992; Chen et al., 2005a). On retrouve également dans l'AmF humain la bêta-défensine humaine 2 (HBD-2) (Soto et al., 2007) ou encore la bêta-défensine 1 chez le bovin (DEFB1) (Riding et al., 2008), qui appartiennent à la famille des défensines, comme AvBD11. Toutefois, à l'inverse de HBD-2 et de DEFB1, AvBD11 est retrouvée uniquement chez les oiseaux (Article 2). Elle possède deux motifs de type bêta-défensine qui pourraient lui conférer des activités spécifiques voire synergiques (Hervé-Grépinet et al., 2010). Les IgY déposées par la poule dans le jaune d'œuf au moment de sa formation, migrent en partie dans l'AmF, et peuvent aussi être comparées aux IgG humaines transférées depuis le sang de la mère vers l'embryon (Müller et al., 2015). Cependant, d'autres protéines et peptides tels que les peptides 1 à 3 du neutrophile humain, l'inhibiteur de protéase sécrété par les leucocytes (secretory leucocyte protease inhibitor), ou la cathélicidine LL-37 (LL37) ont été spécifiquement identifiés dans l'AmF d'humain, ainsi que dans l'AmF de bovin (Dürr et al., 2006; Cho et al., 2007). Par conséquent, même si la fonction associée à la réponse immunitaire est conservée entre les espèces ovipares (modèle de la poule) et les espèces vivipares (modèles humain et bovin), certains acteurs de la défense présents dans l'AmF sont spécifiques du modèle de reproduction.

Comme l'embryon baigne dans l'AmF jusqu'à son éclosion, on peut aussi imaginer que les protéines et autres composants de ce fluide pourraient contribuer à la protection de l'embryon et du poussin nouvellement éclos en constituant un biofilm protecteur sur la peau et les plumes, au même titre que le vernix qui recouvre la peau du fœtus humain dans le dernier trimestre de la grossesse et à la naissance. Le *vernix caseoa* est une substance essentiellement composée de lipides, qui constitue une barrière physique sur la peau du fœtus et du nouveau-né (Singh and Archana, 2008). Cependant, il contient également des peptides antimicrobiens (alpha-défensines 1 à 3, LL37, psoriasine), du lysozyme, la cystatine A (Yoshio *et al.*, 2003; Tollin *et al.*, 2005) qui font singulièrement écho à ceux retrouvés dans l'AmF chez la poule, soit AvBD11, LYZ, la cystatine C (CST3), etc.
- L'évolution des espèces ovipares a entrainé l'apparition de protéines spécifiques dans l'AmF et l'AlF –

En excluant les immunoglobulines, une comparaison plus approfondie entre le protéome de l'AmF de l'œuf de poule (97 protéines : 89 protéines identifiées dans l'article 2, auxquelles s'ajoutent 8 protéines identifiées uniquement dans l'article 1) et celui de l'AmF d'humain (916 protéines (Cho *et al.*, 2007)), a mis en évidence 50 protéines communes entre les deux espèces (**Figure 26**). La conservation de ces protéines, et en particulier des plus abondantes chez les deux espèces (AFP, TF, ALB, APOA1 et GC (Article 2)), atteste du maintien des fonctions principales associées à l'AmF au cours de l'évolution, et ce, quel que soit le mode de reproduction (oviparité et viviparité).



Figure 26 : Diagramme de Venn des protéines communes et spécifiques aux fluides amniotiques (AmF) d'œuf de poule (97 protéines ; Article 1, Supplementary Data S1, Article 2, Supplementary Data S3) et d'humain (916 protéines (Cho *et al.*, 2007)), avec le fluide allantoïque (AlF) d'œuf de poule (Article 1, Supplementary Data S1), sans prendre en compte les immunoglobulines.

Si certaines des protéines du fluide restent spécifiques de la poule ou de l'humain (Figure 26), les processus biologiques fondamentaux essentiels au développement et à la survie de l'embryon sont conservés : l'apport en nutriments et en énergie (métabolisme, transport de composés, source d'acides aminés), ainsi que la protection face aux agressions microbiennes (protéines et peptides antibactériens). Cependant, pour permettre le développement de l'embryon indépendamment de la mère, certaines fonctions semblent plus représentées chez les oiseaux, spécialement dans la nutrition de l'embryon (Article 2). En effet, les œufs à partir desquels se développent les oiseaux sont qualifiés de télolécithes ; ils sont caractérisés par un volume important en vitellus, assurant l'alimentation de l'embryon tout le long du développement. A l'inverse, les œufs dits « alécithes » des mammifères placentaires, comme l'humain, ne contiennent pas de vitellus. Cette particularité met en lumière l'évolution des ressources nutritive allouées à l'embryon. Ainsi, les protéines appelées vitellogénines (VTGs) (Article 2), qui constituent une réserve d'acides aminés pour l'embryon ovipare, ont disparu au cours de l'évolution des mammifères placentaires au profit de nouvelles ressources impliquant la placentation et la lactation (Brawand *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2010). Pour se nourrir l'embryon de mammifère peut donc compter sur un apport permanent en acides aminés par la mère, *via* le placenta, puis un apport en protéines, comme la caséine, *via* l'allaitement, après la naissance. En comparaison, l'embryon d'espèce ovipare se développe uniquement avec les réserves nutritives stockées dans l'œuf, et notamment le vitellus (jaune) contenant des protéines telles que les VTGs et la protéine de liaison à la riboflavine (RBP), qui sont des ressources énergétiques essentielles pour l'embryon d'oiseau (Article 2) (Moran, 2007).

Toutefois, le passage d'un milieu aquatique (poissons et amphibiens) vers un milieu terrestre pour la reproduction, a mené à l'apparition de structures extra-embryonnaires supplémentaires dans les œufs de reptiles, d'oiseaux et de monotrèmes, pour qu'ils ne soient plus tributaires de l'eau comme leurs ancêtres aquatiques : 1) le sac amniotique qui forme une poche d'eau autour de l'embryon, 2) le sac allantoïque qui régule l'utilisation de l'eau par l'embryon, et enfin 3) la coquille qui empêche l'évaporation de l'eau et protège toutes les autres structures (Sheng et Foley, 2012). Cette évolution a également entrainé l'apparition du blanc d'œuf chez les reptiles et les oiseaux, une structure cependant absente chez les monotrèmes, dont le représentant le plus connu est l'ornithorynque. En effet, ces derniers restent un maillon intéressant de l'évolution de l'oviparité vers la viviparité, car même si l'embryon de l'ornithorynque se développe dans une coquille avec un vitellus, les 28 premiers jours d'incubation se déroulent dans l'utérus (Leon Hughes et Hall, 1998). L'œuf est ensuite pondu dix jours avant l'éclosion, après laquelle la mère va allaiter son petit. Le lait va donc remplacer la fonction attenante ici au blanc d'œuf chez les reptiles et les oiseaux (Muramatsu et al., 1990; Willems et al., 2014), à savoir fournir les nutriments nécessaires à la progéniture après l'éclosion pour sa croissance (protéines, minéraux, anticorps, etc.). L'apparition du blanc chez les oiseaux est concomitante avec l'apparition de protéines spécifiques qui sont également retrouvées dans l'AmF et l'AlF d'œuf de poule : OVAL et ses paralogues, OVALX et OVALY (ovalbumin-related protein Y), qui ne sont pas retrouvées chez les reptiles, et les autres espèces ovipares (Articles 1 et 2). Même si le rôle exact d'OVALY est encore inconnu, OVAL est décrit comme une source d'acides aminés pour l'embryon, et les propriétés antibactériennes d'OVALX protègent l'œuf et l'embryon contre les agressions microbiennes (Réhault-Godbert et al., 2013; Da Silva et al., 2015). OVALX n'est pas la seule protéine spécifique de l'œuf d'oiseau à être impliquée dans sa défense. En effet, AvBD11, un peptide antibactérien appartenant à la famille des bêta-défensines aviaires, est identifié uniquement chez les oiseaux (Article 2), à l'instar des ovodéfensines (OvoDA1, 2, 3) (Sugiarto et Yu, 2004; Whenham et al., 2015). AvBD11 a déjà démontré son potentiel antibactérien contre Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Salmonella enterica Typhimurium, Escherichia Coli et Salmonella enterica Enteritidis (Hervé-Grépinet et al., 2010; Guyot et al., 2016a). L'apparition de telles protéines et peptides antibactériens chez les oiseaux, avec un large spectre d'action contre des bactéries gram positives et négatives, ainsi qu'une structure tridimensionnelle unique, nous amène à penser qu'elles sont apparues au cours de l'évolution, en réponse aux pathogènes de l'environnement des oiseaux. En outre, la surproduction de certaines de ces protéines a été observée dans les œufs d'oiseaux vivants dans des milieux jugés plus difficiles, comme chez la cane, où l'œuf se développe dans un milieu humide plus propice aux infections bactériennes (Chung et al., 2010). Chez cette espèce, le deuxième domaine de l'AvBD11 est cationique (au contraire de celui de la poule), ce qui suggère des activités antimicrobiennes renforcées (Projet Région Centre Val de Loire SAPhyR-11, 2017-2019, Nicolas Guyot, équipe DOVE). La présence de protéines spécifiques aux ovipares et aux oiseaux (VTG, RBP, APOV1, OVAL, OVALX, OVALY, AvBD11) dans l'AmF (Articles 1 et 2) mais aussi l'AlF (Article 1, Supplementary Data S1) confirme la spéciation des systèmes de nutrition et de protection de l'embryon chez les oiseaux par rapport aux mammifères placentaires, aux reptiles et aux monotrèmes.

Quarante et une protéines de l'AmF humain, non identifiées dans l'AmF d'œuf de poule ont été identifiées dans l'AlF, lors de l'analyse de ses protéines majeures (Article 1, Supplementary Data S1) (**Figure 26**), suggérant que l'analyse du protéome total de l'AlF pourrait révéler d'autres protéines communes. Chez l'oiseau la sécrétion d'urine se fait dans l'AlF, à l'inverse de l'humain où elle s'effectue dans l'AmF (Underwood et al., 2005). Il reste donc intéressant de comparer leurs compositions protéiques, pour mettre en lumière les spécificités de chacune des espèces, ovipares ou vivipares, et ainsi avoir plus d'informations sur leur évolution et leur rôle respectif.

- Identification de biomarqueurs dans l'AmF et l'AlF en production avicole, pour le diagnostic de pathologies ou de conditions anormales de développement -

L'AmF protège l'embryon particulièrement lors de la seconde moitié de l'incubation, en formant un biofilm protecteur qui recouvre la peau et les plumes de l'embryon, mais également l'intérieur de l'intestin, préparant alors le futur poussin à l'éclosion. En revanche, le potentiel antibactérien intrinsèque de l'AlF reste encore à définir, surtout au regard des nombreux paramètres à prendre en compte : les activités protéolytiques, les peptides ou protéines activés ou éventuellement synthétisés et sécrétés par la membrane chorioallantoïque dans l'AlF, et tout cela en fonction des variations de pH et d'autres facteurs mesurés ou non dans cette étude (composition en ions, en minéraux, en lipides, etc.).

Toutefois, au vu de sa position stratégique autour de l'AIF et des autres structures de l'œuf, ainsi que sa proximité avec la coquille, la membrane chorioallantoïque reste une structure particulièrement intéressante pour étudier la mise en place de mécanismes de défense au cours du développement embryonnaire (Isaacs et Lindenmann, 1988; Valdes et al., 2002) (Figure 25). En effet, son contact direct avec les membranes coquillières la positionne en première ligne en cas d'infection bactérienne à travers la coquille, notamment dans les derniers stades du développement, lorsque la coquille est fragilisée par la solubilisation du calcium pour les besoins de l'embryon (Chien et al., 2009). Dans le cadre d'un projet Studium Professorship du Pr. Maxwell Hincke, obtenu récemment auprès de la Région Centre Val de Loire, l'accent sera donc mis sur l'étude du rôle de la membrane chorioallantoïque dans la défense de l'œuf. L'hypothèse de départ est que la fragilisation de la coquille entraine une activation des mécanismes de défense spécifiques localement au niveau de la membrane chorioallantoïque, avec une synthèse accrue de précurseurs antibactériens par les cellules de la membrane, et/ou la mobilisation d'acteurs de la défense inhérents à l'embryon (cellules du système immunitaire inné). Dans ce projet, il est prévu d'utiliser des modèles d'infection contrastés pour évaluer la plasticité de réponse de la membrane chorioallantoïque à des challenges infectieux et leurs répercussions sur la composition protéique, lipidique et métabolique de l'AIF et de l'AmF. Ainsi, par des approches moléculaires différentielles, nous espérons identifier des marqueurs pertinents d'infection et d'inflammation.

La composition de l'AlF étant le reflet du métabolisme embryonnaire, il pourrait par conséquent être utilisé comme une source de biomarqueurs du bon développement embryonnaire, au même titre que l'AmF d'humain utilisé pour évaluer l'état de santé du fœtus

et également prédire d'éventuels futurs problèmes de santé pour l'enfant ou la mère (Spencer et al., 1997; Espinoza et al., 2003; Perni et al., 2005; Romero et al., 2010; Chevalier, 2016; Hsu et al., 2016; Palmas et al., 2016). La recherche de biomarqueurs liés au stress de l'embryon (stress thermique, carences, etc.) ou liés à des pathologies spécifiques (infections) par des approches d'analyses globales, telles que la protéomique ou la métabolomique, constituent une voie intéressante à explorer pour une meilleure compréhension et une meilleure gestion des problèmes rencontrés en élevage. Par exemple, une mauvaise composition de l'œuf ou une mauvaise gestion des ressources par l'embryon peuvent induire des variations de la composition biochimique dans les sécrétions allantoïques. En effet, si certains composés viennent à manquer dans le jaune ou le blanc d'œuf (carence alimentaire ou stress de la poule impactant la composition de l'œuf, manque d'eau, etc.) (Kim et Choi, 2014), ou si l'embryon utilise mal les ressources à sa disposition (problèmes dans la répartition de l'eau, ou dans l'assimilation par les structures extra-embryonnaires, relargage important de composés toxiques) (Deeming, 1989), cela peut engager le pronostic vital de l'embryon au cours de son développement dans l'œuf, et/ou affecter la robustesse du poussin à l'éclosion. L'analyse de l'AlF donnera donc une image à un stade précis de l'état du métabolisme embryonnaire, et de l'utilisation des ressources de l'œuf par l'embryon. L'établissement de valeurs normalisées, en fonction de la souche étudiée (chair versus ponte par exemple), des paramètres mécaniques des œufs, du sexe de l'embryon, etc., est donc nécessaire pour mettre en lumière les cas défectueux. En outre, de telles analyses seraient en mesure d'apporter des explications concernant des phénomènes observés sur des individus adultes, comme les différences de métabolisme énergétique entre certaines lignées de poule détectées dès l'éclosion (lignées pH ultime + et -) (Beauclercq et al., 2017). Cette problématique fait actuellement l'objet d'un projet financé par le département « Physiologie Animale et Système d'Elevage », à l'INRA : le projet INOVE, pour la recherche d'INdicateurs in OVo du statut Energétique de l'animal pour des applications en sélection et en élevage. De plus, l'analyse de la répartition des molécules impliquées dans la défense de l'embryon au cours de l'incubation, dans l'AlF ou même l'AmF, donnerait des renseignements sur l'état de santé de l'embryon et donc du futur poussin, pour identifier et gérer les problèmes de contamination, et ainsi diminuer la mortalité embryonnaire en évitant les contaminations interindividuelle ou transgénérationnelle. En combinant l'ensemble de ces données, nous serions alors capables de mettre en évidence des biomarqueurs spécifiques à chaque situation, pour réduire la mortalité in ovo, et améliorer la qualité des poussins à la naissance, et les performances de l'animal à l'âge adulte.

Une dernière piste à explorer est l'analyse de la composition des fluides en fonction du sexe de l'embryon. En effet, si pour l'AmF à ED11, aucune différence de profil protéique n'a été mise en évidence dans cette étude, il s'agira de vérifier s'il en est de même pour la composition en lipides, en métabolites, etc., dans l'AmF mais aussi dans l'AlF issus d'œufs d'embryons mâles et femelles. En effet, malgré la présence dans la littérature de données parfois contradictoires (en fonction de la souche génétique, du poids des œufs, etc.), il est possible que l'utilisation des ressources énergétiques de l'œuf et la cinétique de leur utilisation par les embryons mâles et les embryons femelles, diffèrent et aient une répercussion à la fois qualitative et quantitative sur les composés et les paramètres biochimiques de l'AlF notamment.

Pour conclure, l'analyse des fluides extra-embryonnaires s'inscrit parfaitement dans l'actualité, avec des applications dans différents domaines tels que les injections in ovo de nutriments et de pré/probiotiques pour améliorer les performances du futur poussin (Uni et Ferket, 2003; Uni et al., 2005; Foye et al., 2006; Kornasio et al., 2011; Cheled-Shoval et al., 2011; Yair et al., 2013; Roto et al., 2016; Godlewska et al., 2016; Majidi-Mosleh et al., 2017), ou les injections in ovo de vaccins, pour diminuer la mortalité des poussins face à des pathologies telles que la maladie de Marek (Wakenell et al., 2002; Breedlove et al., 2011; Williams et Hopkins, 2011). Une meilleure compréhension d'une part, de la composition des fluides extra-embryonnaires et de leur évolution au cours de l'incubation, et d'autre part, de l'impact des changements observés sur les composés injectés, permettraient d'améliorer les techniques d'injection in ovo (Wakenell et al., 2002; Jochemsen and Jeurissen, 2002; Williams et Hopkins, 2011). Si ces injections de composés constitue une avancée technologique importante dans le domaine de l'aviculture, les prélèvements in ovo peu invasifs de fluides (AmF, AlF) ou de cellules (membrane chorioallantoïque) pour la recherche de biomarqueurs (voir paragraphe précédent), voire le sexage des embryons par dosage hormonal ou PCR, représenteraient également une innovation intéressante dans ce domaine (Clinton *et al.*, 2001; Weissmann *et al.*, 2013).

VI - Conclusion

Au cours de l'incubation, nous avons pu observer deux grands phénomènes concernant l'évolution des défenses naturelles de l'œuf de poule : tout d'abord une redistribution des défenses moléculaires portées initialement par la coquille, la membrane vitelline, le jaune et le blanc d'œuf, puis l'apparition de nouveaux systèmes de défense spécifiques des structures extra-embryonnaires (**Figure 27**).

Les protéines et les peptides antibactériens principalement concentrés dans le blanc d'œuf au cours de la première moitié de l'incubation, sont transférés avec les autres composés du blanc dans le sac amniotique à partir d'ED12 (TF, LYZ, VMO1, AvBD11, OC-17, BMSP, etc.). Cette relocalisation des défenses moléculaires intervient dans un moment clé du développement de l'embryon, puisqu'elle est associée à l'accélération du métabolisme embryonnaire qui entraine une importante dégradation des structures élémentaires de l'œuf, pour fournir les nutriments nécessaires à l'embryon (accélération de la solubilisation de la coquille et de la digestion des protéines du jaune et du blanc par le sac vitellin) (Figure 25). Le potentiel antibactérien accru de l'AmF assure alors à l'embryon une protection dans les derniers jours avant l'éclosion. En outre, notre hypothèse est que la concentration des protéines du blanc avant leur transfert pourrait entrainer la formation d'un biofilm encerclant l'embryon, composé principalement de protéines fortement glycosylées et sialylées (MUC5B/6, OVAL, SPINK7, etc.), d'antiprotéases (SPINK5/7, CST3, OVST) empêchant la lyse des protéines actives et la lyse des tissus embryonnaires par les protéases d'éclosion (ASTL), et des protéines et des peptides antibactériens (Igs, LYZ, VMO1, etc.) (Figure 27). Certaines de ces protéines sont spécifiques des oiseaux (AvBD11, BMSP, etc.) et attestent de leur évolution et de leur adaptation à un environnement terrestre, par rapport à leur ancêtre aquatiques (poissons et amphibiens). En outre, en comparaison avec les amniotes placentaires, dont le mode de reproduction a évolué vers la viviparité, la placentation et la lactation, le futur poussin lui s'appuie uniquement sur les réserves nutritives et bioactives présentes dans l'œuf pour croître et se défendre face à la flore microbienne extérieure les premiers jours après l'éclosion. En ce sens, l'absorption orale par l'embryon des protéines du blanc mélangées au fluide amniotique prépare l'intestin à la digestion, mais peut également protéger les parois intestinales lors de la mise en place de la flore commensale, via le dépôt de protéines impliquées dans la protection antibactérienne du tractus digestif chez la poule, telles que les protéines fortement glycosylées et sialylées ainsi que les IgA et M d'origine maternelle présentes dans le blanc d'œuf puis dans l'AmF. De la même façon, les IgY maternelles contenues dans le jaune d'œuf sont transférées dans l'embryon au moment de la résorption du

sac vitellin dans l'intestin encore immature du poussin, peu avant l'éclosion (Figure 27). Elles assurent ainsi la protection de l'embryon jusqu'à ce que son système immunitaire devienne fonctionnel.

L'implication de l'AlF dans l'ensemble de ces processus reste encore à définir. Les variations importantes de ses propriétés physicochimiques (pH, osmolalité, composés toxiques, acide urique, urée, ammonium, azote) particulièrement lors de la seconde moitié de l'incubation, pourraient moduler les activités des molécules actives dans le fluide, dont les protéines antibactériennes, mais aussi affecter la croissance et la survie des bactéries (Figure 27). Pour mieux comprendre le rôle de ce fluide dans la défense de l'œuf, il reste nécessaire d'identifier l'ensemble des composés qui le constituent (lipides, métabolites, peptides, acides aminés), pour étudier leurs interactions. Toutefois, la découverte de protéases digestives actives dans l'AlF (ANPEP, DPP4, MEP1A, MMP2) suggère son engagement dans des processus plus variés comme l'assimilation des nutriments du jaune et du blanc par la production d'acides aminés libres ou de peptides bioactifs dans le fluide. En outre, la membrane chorioallantoïque qui renferme l'AlF est déjà connue pour ses capacités d'absorption (eau, ions, protéines du blanc d'œuf) favorables à un transport de composés depuis l'AlF vers l'embryon. La composition biochimique de ce fluide qui recoit les déchets métaboliques de l'embryon donne une image instantanée à différents stades du développement embryonnaire, de la capacité de l'embryon à métaboliser les protéines, les lipides et les glucides fournis par le jaune et le blanc d'œuf en particulier. Ce profil biochimique reflète donc la santé et le bon développement de l'embryon et pourrait dans des situations contrastées (souches génétiques, challenges infectieux. anomalies développementales) contribuer à l'identification de biomarqueurs pertinents de la santé de l'embryon. Par ailleurs, il a été démontré qu'en cas d'attaques microbiennes via une coquille défectueuse ou fragilisée au cours de l'incubation, la membrane chorioallantoïque exprime des cytokines et permet via son réseau vasculaire, le recrutement de cellules immunitaires sur le site de l'infection (Figure 27). Cette stimulation/activation de la membrane pourrait avoir des répercussions sur la composition biochimique en cytokines, molécules antioxydantes et anti-infectieuses de l'AIF, dont le potentiel antibactérien serait alors renforcé. Il s'agira donc à terme de développer des modèles d'infection expérimentaux afin de mieux caractériser le rôle de ce fluide dans la défense de l'embryon d'oiseau.



Figure 27 : Evolution des défenses innées des structures extra-embryonnaires de l'œuf de poule au cours de l'incubation. C : défenses chimiques et moléculaires ; P : défenses physiques. En italique : les hypothèses formulées mais non vérifiées dans cette étude.

Bibliographie

- Acloque, H., F. Lavial, and B. Pain. 2012. Astacin-like metallo-endopeptidase is dynamically expressed in embryonic stem cells and embryonic epithelium during morphogenesis. Dev. Dyn. 241:574–82.
- van Adelsberg, J., S. Sehgal, A. Kukes, C. Brady, J. Barasch, J. Yang, and Y. Huan. 2001. Activation of Hepatocyte Growth Factor (HGF) by Endogenous HGF Activator Is Required for Metanephric Kidney Morphogenesis in Vitro. J. Biol. Chem. 276:15099– 15106.
- Alabdeh, M., V. Lechevalier, F. Nau, M. Gautier, M.-F. Cochet, F. Gonnet, S. Jan, and F. Baron. 2011. Role of Incubation Conditions and Protein Fraction on the Antimicrobial Activity of Egg White against Salmonella Enteritidis and Escherichia coli. J. Food Prot. 74:24–31.
- Ardelt, W., and M. Laskowski. 1985. Turkey ovomucoid third domain inhibits eight different serine proteinases of varied specificity on the same ...Leu18-Glu19... reactive site. Biochemistry 24:5313–5320.
- Back, J. F., J. M. Bain, D. V. Vadehra, and R. W. Burley. 1982. Proteins of the outer layer of the vitelline membrane of hen's eggs. Biochim. Biophys. Acta 705:12–19.
- Baggott, G. K. 2001. Development of extra-embryonic membranes and fluid compartments. Avian Biol. Res. 2:21–26.
- Baggott, G. K., D. C. Deeming, and G. V. Latter. 2002. Electrolyte and Water Balance of the Early Avian Embryo: Effects of Egg Turning. Avian Poult. Biol. Rev.
- Baintner, K., and G. Fehér. 1974. Fate of egg white trypsin inhibitor and start of proteolysis in developing chick embryo and newly hatched chick. Dev. Biol. 36:272–278.
- Banerjee, P., K. M. Keener, and V. D. Lukito. 2011. Influence of carbon dioxide on the activity of chicken egg white lysozyme. Poult. Sci. 90:889–95.
- Bar-Shira, E., I. Cohen, O. Elad, and A. Friedman. 2014. Role of goblet cells and mucin layer in protecting maternal IgA in precocious birds. Dev. Comp. Immunol. 44:186–194.

- Bar-Shira, E., and A. Friedman. 2006. Development and adaptations of innate immunity in the gastrointestinal tract of the newly hatched chick. Dev. Comp. Immunol. 30:930–941.
- Baron, F., M. Gautier, and G. Brulé. 1999. Rapid growth of Salmonella enteritidis in egg white reconstituted from industrial egg white powder. J. Food Prot. 62:585–91.
- Baron, F., S. Jan, F. Gonnet, M. Pasco, J. Jardin, B. Giudici, M. Gautier, C. Guérin-Dubiard, and F. Nau. 2014. Ovotransferrin Plays a Major Role in the Strong Bactericidal Effect of Egg White against the Bacillus cereus Group. J. Food Prot. 77:955–962.
- Baron, F., F. Nau, C. Guérin-Dubiard, S. Bonnassie, M. Gautier, S. C. Andrews, and S. Jan. 2016. Egg white versus Salmonella Enteritidis! A harsh medium meets a resilient pathogen. Food Microbiol. 53:82–93.
- Bauer, R., J. A. Plieschnig, T. Finkes, B. Riegler, M. Hermann, and W. J. Schneider. 2013. The developing chicken yolk sac acquires nutrient transport competence by an orchestrated differentiation process of its endodermal epithelial cells. J. Biol. Chem. 288:1088–1098.
- Beal, R. K., C. Powers, T. F. Davison, and A. L. Smith. 2006. Avian gut function in health and disease.in Avian gut function in health and disease. Perry, G.C., ed. CABI.
- Beauclercq, S., C. Hennequet-Antier, C. Praud, E. Godet, A. Collin, S. Tesseraud, S. Metayer-Coustard, M. Bourin, M. Moroldo, F. Martins, S. Lagarrigue, E. Le Bihan-Duval, and C. Berri. 2017. Muscle transcriptome analysis reveals molecular pathways and biomarkers involved in extreme ultimate pH and meat defect occurrence in chicken. Sci. Rep. 7:6447.
- Bellamy, W., M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase, and M. Tomita. 1992. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. Biochim. Biophys. Acta 1121:130–136.
- Benčina, D., M. Narat, A. Bidovec, and O. Zorman-Rojs. 2005. Transfer of maternal immunoglobulins and antibodies to Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae to the allantoic and amniotic fluid of chicken embryos. Avian Pathol. 34:463– 472.

- Björck, L. 1990. Proteinase inhibition, immunoglobulin-binding proteins and a novel antimicrobial principle. Mol. Microbiol. 4:1439–1442.
- Bolin, G., and W. W. Burggren. 2013. Metanephric kidney development in the chicken embryo: Glomerular numbers, characteristics and perfusion. Comp. Biochem. Physiol. -A Mol. Integr. Physiol. 166:343–350.
- Bolin, G., B. Dubansky, and W. W. Burggren. 2017. Incubation relative humidity induces renal morphological and physiological remodeling in the embryo of the chicken (Gallus gallus domesticus). Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol. 204:185–196.
- Bourin, M., J. Gautron, M. Berges, S. Attucci, G. Le Blay, V. Labas, Y. Nys, and S. Rehault-Godbert. 2011. Antimicrobial potential of egg yolk ovoinhibitor, a multidomain kazallike inhibitor of chicken egg. J. Agric. Food Chem. 59:12368–12374.
- Boutilier, R. G., M. A. Gibson, D. P. Toews, and W. Anderson. 1977. Gas exchange and acidbase regulation in the blood and extraembryonic fluids of the developing chicken embryo. Respir. Physiol. 31:81–89.
- Brawand, D., W. Wahli, and H. Kaessmann. 2008. Loss of egg yolk genes in mammals and the origin of lactation and placentation. PLoS Biol. 6:0507–0517.
- Breedlove, C., J. K. Minc, D. C. Tang, V. L. van Santen, F. W. van Ginkel, and H. Toro. 2011. Avian influenza adenovirus-vectored in ovo vaccination: target embryo tissues and combination with Marek's disease vaccine. Avian Dis 55:667–673.
- Busch, M. Ten, L. Milakofsky, T. Hare, B. Nibbio, and A. Epple. 1997. Regulation of substances in allantoic and amniotic fluid of the chicken embryo. Comp. Biochem. Physiol. - A Physiol. 116:131–136.
- Carinci, P., and L. Manzoli-Guidotti. 1968. Albumen absorption during chick embryogenesis. J. Embryol. Exp. Morphol. 20:107–18.
- Cheled-Shoval, S. L., E. Amit-Romach, M. Barbakov, and Z. Uni. 2011. The effect of in ovo administration of mannan oligosaccharide on small intestine development during the preand posthatch periods in chickens. Poult. Sci. 90:2301–10.
- Chen, X., F. Niyonsaba, H. Ushio, D. Okuda, I. Nagaoka, S. Ikeda, K. Okumura, and H. 159

Ogawa. 2005a. Synergistic effect of antibacterial agents human β -defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. J. Dermatol. Sci. 40:123–132.

- Chen, J., H. Shallo Thesmar, and W. L. Kerr. 2005b. Outgrowth of Salmonellae and the Physical Property of Albumen and Vitelline Membrane as Influenced by Egg Storage Conditions. J. Food Prot. 68:2553–2558.
- Chevalier, R. L. 2016. Prognostic factors and biomarkers of congenital obstructive nephropathy. Pediatr. Nephrol. 31:1411–1420.
- Chien, Y.-C., M. T. Hincke, and M. D. McKee. 2009. Ultrastructure of avian eggshell during resorption following egg fertilization. J. Struct. Biol. 168:527–538.
- Cho, C.-K. J., S. J. Shan, E. J. Winsor, and E. P. Diamandis. 2007. Proteomics analysis of human amniotic fluid. Mol. Cell. Proteomics 6:1406–15.
- Chung, W.-H., K.-M. Lai, and K. Hsu. 2010. Comparative Study on Histological Structures of the Vitelline Membrane of Hen and Duck Egg Observed by Cryo-Scanning Electron Microscopy. J. Agric. Food Chem. 58:1794–1799.
- Clinton, M., L. Haines, B. Belloir, and D. McBride. 2001. Sexing chick embryos: A rapid and simple protocol. Br. Poult. Sci. 42:134–138.
- Cordeiro, C. M. M., and M. T. Hincke. 2016. Quantitative proteomics analysis of eggshell membrane proteins during chick embryonic development. J. Proteomics 130:11–25.
- Correnti, C., M. C. Clifton, R. J. Abergel, B. Allred, T. M. Hoette, M. Ruiz, R. Cancedda, K. N. Raymond, F. Descalzi, and R. K. Strong. 2011. Galline Ex-FABP is an antibacterial siderocalin and a lysophosphatidic acid sensor functioning through dual ligand specificities. Structure 19:1796–1806.
- D'Ambrosio, C., S. Arena, A. Scaloni, L. Guerrier, E. Boschetti, M. E. Mendieta, A. Citterio, and P. G. Righetti. 2008. Exploring the chicken egg white proteome with combinatorial peptide ligand libraries. J. Proteome Res. 7:3461–74.
- Deeming, D. C. 1989. Importance of sub-embryonic fluid and albumen in the embryo's response to turning of the egg during incubation. Br. Poult. Sci. 30:591–606.

- Dickson, A. J. 1983. Gluconeogenesis in chick embryo isolated hepatocytes. Int. J. Biochem. 15:861–865.
- Du, J., M. T. Hincke, M. Rose-Martel, C. Hennequet-Antier, A. Brionne, L. A. Cogburn, Y. Nys, and J. Gautron. 2015. Identifying specific proteins involved in eggshell membrane formation using gene expression analysis and bioinformatics. BMC Genomics 16:792.
- Dürr, U. H. N., U. S. Sudheendra, and A. Ramamoorthy. 2006. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 1758:1408–1425.
- Edwards, N. A., V. Luttrell, and I. Nir. 1976. The secretion and synthesis of albumen by the magnum of the domestic fowl (Gallus domesticus). Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem. 53:183–186.
- Elaroussi, M. A., and H. F. DeLuca. 1994. A new member to the astacin family of metalloendopeptidases: a novel 1,25-dihydroxyvitamin D-3-stimulated mRNA from chorioallantoic membrane of quail. Biochim. Biophys. Acta 1217:1–8.
- Engberg, R. M., B. Kaspers, I. Schranner, J. Kosters, and U. Losch. 1992. Quantification of the immunoglobulin classes IgG and IgA in the young and adult pigeon (Columba livia). Avian Pathol. 21:409–20.
- Espinoza, J., T. Chaiworapongsa, R. Romero, S. Edwin, C. Rathnasabapathy, R. Gomez, E. Bujold, N. Camacho, Y. M. Kim, S. Hassan, S. Blackwell, J. Whitty, S. Berman, M. Redman, B. H. Yoon, and Y. Sorokin. 2003. Antimicrobial peptides in amniotic fluid: defensins, calprotectin and bacterial/permeability-increasing protein in patients with microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation, preterm labor and premature rupture of membranes. J. Matern. Fetal. Neonatal Med. 13:2–21.
- Everaert, N., H. Willemsen, E. Willems, L. Franssens, and E. Decuypere. 2011. Acid-base regulation during embryonic development in amniotes, with particular reference to birds. Respir. Physiol. Neurobiol. 178:118–28.
- Farinazzo, A., U. Restuccia, A. Bachi, L. Guerrier, F. Fortis, E. Boschetti, E. Fasoli, A. Citterio, and P. G. Righetti. 2009. Chicken egg yolk cytoplasmic proteome, mined via combinatorial peptide ligand libraries. J. Chromatogr. A 1216:1241–1252.

- Fellah, J. S., T. Jaffredo, and D. Dunon. 2008. Development of the Avian Immune System.Pages 51–67 in Avian Immunology. Davison, F., Kaspers, B., Schat, K.A., eds. Elsevier, Great Britain.
- Foye, O. T., Z. Uni, J. P. McMurtry, and P. R. Fercket. 2006. The Effects of Amniotic Nutrient Administration, "In ovo Feeding" of Arginine And/or β-Hydroxy- Betβ-Methyl Butyrate (HMB) on Insulin-like Growth Factors, Energy Metabolism and Growth in Turkey Poults. Int. J. Poult. Sci. 5:309–317.
- Freeman, B. M., and M. A. Vince. 1974. Development of the Avian Embryo. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Gabrielli, M. G., and D. Accili. 2010. The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transpithelial ion transport and barrier function during embryonic development. J. Biomed. Biotechnol. 2010:940741.
- Gantois, I., R. Ducatelle, F. Pasmans, F. Haesebrouck, R. Gast, T. J. Humphrey, and F. Van Immerseel. 2009. Mechanisms of egg contamination by Salmonella Enteritidis. FEMS Microbiol. Rev. 33:718–38.
- Geelhoed, S. E., and J. L. Conklin. 1966. An electrophoretic study of proteins in chick embryonic fluids. J. Exp. Zool. 162:257–261.
- Giansanti, F., M. T. Massucci, M. F. Giardi, F. Nozza, E. Pulsinelli, C. Nicolini, D. Botti, and G. Antonini. 2005. Antiviral activity of ovotransferrin derived peptides. Biochem. Biophys. Res. Commun. 331:69–73.
- Gilbert, E. R., P. M. Williams, W. K. Ray, H. Li, D. A. Emmerson, E. A. Wong, and K. E. Webb. 2010. Proteomic Evaluation of Chicken Brush-Border Membrane during the Early Posthatch Period. J. Proteome Res. 9:4628–4639.
- Godlewska, R., M. Kuczkowski, A. Wyszyńska, J. Klim, K. Derlatka, A. Woźniak-Biel, and E. K. Jagusztyn-Krynicka. 2016. Evaluation of a protective effect of in ovo delivered Campylobacter jejuni OMVs. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100:8855–64.
- Gotoh, B., T. Ogasawara, T. Toyoda, N. M. Inocencio, M. Hamaguchi, and Y. Nagai. 1990. An endoprotease homologous to the blood clotting factor X as a determinant of viral

tropism in chick embryo. EMBO J. 9:4189–95.

- Guyot, N., V. Labas, G. Harichaux, M. Chessé, J.-C. Poirier, Y. Nys, and S. Réhault-Godbert. 2016a. Proteomic analysis of egg white heparin-binding proteins: towards the identification of natural antibacterial molecules. Sci. Rep. 6:27974.
- Guyot, N., S. Réhault-Godbert, Y. Nys, and F. Baron. 2017. Understanding the natural antibacterial defences of egg white and their regulation.Pages 161–193 in Achieving sustainable production of eggs Volume 1. Roberts, J., ed. Burleigh Dodds Science Publishing.
- Guyot, N., S. Réhault-Godbert, C. Slugocki, G. Harichaux, V. Labas, E. Helloin, and Y. Nys.2016b. Characterization of egg white antibacterial properties during the first half of incubation: A comparative study between embryonated and unfertilized eggs. Poult. Sci.
- Haas, H. J., and N. T. Spratt. 1976. Contributions to an analysis of the avian vitelline membrane's potential to promote outgrowth of the yolk sac-serosal membrane. Anat. Rec. 184:227–231.
- Hamal, K. R., S. C. Burgess, I. Y. Pevzner, and G. F. Erf. 2006. Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. Poult. Sci. 85:1364–72.
- Hervé-Grépinet, V., S. Réhault-Godbert, V. Labas, T. Magallon, C. Derache, M. Lavergne, J. Gautron, A.-C. Lalmanach, and Y. Nys. 2010. Purification and characterization of avian beta-defensin 11, an antimicrobial peptide of the hen egg. Antimicrob. Agents Chemother. 54:4401–4409.
- Hincke, M. T., Y. Nys, J. Gautron, K. Mann, A. Rodriguez-Navarro, and M. D. McKee. 2012. The eggshell: structure, composition and mineralization. Front. Biosci. 17:1266–80.
- Howard, Z. R., C. A. O'Bryan, P. G. Crandall, and S. C. Ricke. 2012. Salmonella Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control. Food Res. Int. 45:755–764.
- Hsu, T. Y., H. Lin, H. N. Hung, K. D. Yang, C. Y. Ou, C. C. Tsai, H. H. Cheng, S. H. Chung,B. H. Cheng, Y. H. Wong, A. K. Chou, and C. C. Hsiao. 2016. Two-dimensional differential gel electrophoresis to identify protein biomarkers in amniotic fluid of

Edwards syndrome (trisomy 18) pregnancies. PLoS One 11.

- Ibrahim, H. R., Y. Sugimoto, and T. Aoki. 2000. Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism. Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 1523:196–205.
- Isaacs, A., and J. Lindenmann. 1988. Virus Interference: I. The Interferon. CA. Cancer J. Clin. 38:280–290.
- Jensen, C. 1969. Ultrastructural changes in the avian vitelline membrane during embryonic development. Development 21:467–484.
- Jiang, T.-X., T. L. Tuan, P. Wu, R. B. Widelitz, and C.-M. Chuong. 2011. From buds to follicles: matrix metalloproteinases in developmental tissue remodeling during feather morphogenesis. Differentiation. 81:307–14.
- Jochemsen, P., and S. H. M. Jeurissen. 2002. The localization and uptake of in ovo injected soluble and particulate substances in the chicken. Poult. Sci. 81:1811–7.
- Jonchère, V., S. Réhault-Godbert, C. Hennequet-Antier, C. Cabau, V. Sibut, L. A. Cogburn, Y. Nys, and J. Gautron. 2010. Gene expression profiling to identify eggshell proteins involved in physical defense of the chicken egg. BMC Genomics 11:57.
- Kandeil, A., O. Bagato, H. Zaraket, J. Debeauchamp, S. Krauss, R. El-Shesheny, R. J. Webby, M. A. Ali, and G. Kayali. 2014. Proteolytic enzymes in embryonated chicken eggs sustain the replication of egg-grown low-pathogenicity avian influenza viruses in cells in the absence of exogenous proteases. J. Virol. Methods 202:28–33.
- Kaspers, B., H. Bondl, and T. W. Göbel. 1996. Transfer of IgA from albumen into the yolk sac during embryonic development in the chicken. Zentralbl. Veterinarmed. A 43:225– 31.
- Kawaguchi, M., K. Inoue, I. Iuchi, M. Nishida, and S. Yasumasu. 2013. Molecular coevolution of a protease and its substrate elucidated by analysis of the activity of predicted ancestral hatching enzyme. BMC Evol. Biol. 13:231.
- Kido, S., and Y. Doi. 1988. Separation and Properties of the Inner and Outer Layers of the Vitelline Membrane of Hen's Eggs. Poult. Sci. 67:476–486.

- Kim, J., and Y.-H. Choi. 2014. Differential abundance of egg white proteins in laying hens treated with corticosterone. J. Agric. Food Chem. 62:12346–12359.
- Kornasio, R., O. Halevy, O. Kedar, and Z. Uni. 2011. Effect of in ovo feeding and its interaction with timing of first feed on glycogen reserves, muscle growth, and body weight. Poult. Sci. 90:1467–77.
- Korpela, J., E.-M. Salonen, P. Kuusela, M. Sarvas, and A. Vaheri. 1984. Binding of avidin to bacteria and to the outer membrane porin of Escherichia coli. FEMS Microbiol. Lett. 22:3–10.
- Kowalczyk, K., J. Daiss, J. Halpern, and T. F. Roth. 1985. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. Immunology 54:755–62.
- Kramer, T. T., and H. C. Cho. 1970. Transfer of immunoglobulins and antibodies in the hen's egg. Immunology 19:157–67 Available at http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1455607&tool=pmcentrez&r endertype=abstract (verified 22 October 2015).
- Latter, G. V, and G. K. Baggott. 2002. Role of carbon dioxide and ion transport in the formation of sub-embryonic fluid by the blastoderm of the Japanese quail. Br. Poult. Sci. 43:104–16.
- Leon Hughes, R., and L. S. Hall. 1998. Early development and embryology of the platypus. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 353:1101–1114.
- Li-Chan, E. C. Y., and H.-O. Kim. 2008. Structure and Chemical Compositions of Eggs.Pages 1–95 in Egg bioscience and Biotechnology. Mine, Y., ed. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Liu, Y., N. Qiu, and M. Ma. 2013. Comparative proteomic analysis of hen egg white proteins during early phase of embryonic development by combinatorial peptide ligand library and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight. Poult. Sci. 92:1897–904.
- Maehashi, K., M. Ueda, M. Matano, J. Takeuchi, M. Uchino, Y. Kashiwagi, and T. Watanabe. 2014. Biochemical and functional characterization of transiently expressed in neural precursor (TENP) protein in emu egg white. J. Agric. Food Chem. 62:5156–5162.

- Majidi-Mosleh, A., A. A. Sadeghi, S. N. Mousavi, M. Chamani, and A. Zarei. 2017. Ileal MUC2 gene expression and microbial population, but not growth performance and immune response, are influenced by in ovo injection of probiotics in broiler chickens. Br. Poult. Sci. 58:40–45.
- Mann, K. 2007. The chicken egg white proteome. Proteomics 7:3558–3568.
- Mann, K. 2008. Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. Proteomics 8:2322–2332.
- Mann, K., B. Macek, and J. V Olsen. 2006. Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer. Proteomics 6:3801–10.
- Mann, K., and M. Mann. 2008. The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. Proteomics 8:178–191.
- Mann, K., and M. Mann. 2011. In-depth analysis of the chicken egg white proteome using an LTQ Orbitrap Velos. Proteome Sci. 9:7.
- Marga Janse, E., and S. H. M. Jeurissen. 1991. Ontogeny and Function of Two Non-Lymphoid Cell Populations in the Chicken Embryo. Immunobiology 182:472–481.
- Marie, P., V. Labas, A. Brionne, G. Harichaux, C. Hennequet-Antier, A. B. Rodriguez-Navarro, Y. Nys, and J. Gautron. 2015. Quantitative proteomics provides new insights into chicken eggshell matrix protein functions during the primary events of mineralisation and the active calcification phase. J. Proteomics 126:140–154.
- Matsubara, Y., M. Ichinose, N. Yahagi, S. Tsukada, M. Oka, K. Miki, S. Kimura, M. Omata, K. Shiokawa, N. Kitamura, Y. Kaneko, and H. Fukamachi. 1998. Hepatocyte Growth Factor Activator: A Possible Regulator of Morphogenesis during Fetal Development of the Rat Gastrointestinal Tract. Biochem. Biophys. Res. Commun. 253:477–484.
- McIndoe, W. 1960. Changes in the protein content of yolk during chick embryogenesis. J. Embryol. Exp. Morphol. 8:47–53.
- Michaels, J.-E. A., S. Dasari, L. Pereira, A. P. Reddy, J. A. Lapidus, X. Lu, T. Jacob, A. Thomas, M. Rodland, C. T. Roberts, M. G. Gravett, and S. R. Nagalla. 2007. Comprehensive proteomic analysis of the human amniotic fluid proteome: gestational 166

age-dependent changes. J. Proteome Res. 6:1277-85.

- Mine, Y., F. Ma, and S. Lauriau. 2004. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. J. Agric. Food Chem. 52:1088–1094.
- Miska, K. B., R. H. Fetterer, and E. A. Wong. 2014. The mRNA expression of amino acid transporters, aminopeptidase N, and the di- and tri-peptide transporter PepT1 in the embryo of the domesticated chicken (Gallus gallus) shows developmental regulation. Poult. Sci. 93:2262–70.
- Molla, A., Y. Matsumura, T. Yamamoto, R. Okamura, and H. Maeda. 1987. Pathogenic capacity of proteases from Serratia marcescens and Pseudomonas aeruginosa and their suppression by chicken egg white ovomacroglobulin. Infect. Immun. 55:2509–2517.
- Moran, E. T. 2007. Nutrition of the developing embryo and hatchling. Poult. Sci. 86:1043–1049.
- Müller, S., A. Schubert, J. Zajac, T. Dyck, and C. Oelkrug. 2015. IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. Nutr. J. 14:109.
- Muramatsu, T., K. Hiramoto, N. Koshi, J. Okumura, S. Miyoshi, and T. Mitsumoto. 1990. Importance of albumen content in whole-body protein synthesis of the chicken embryo during incubation. Br. Poult. Sci. 31:101–106.
- Musgrove, M. T. 2011. Microbiology and safety of table eggs.Pages 3–33 in Improving the safety and quality of eggs and egg products - Volume 2. Nys, Y., Bain, M., Van Immerseel, F., eds. Woodhead Publishing, Cambridge.
- Nakimbugwe, D., B. Masschalck, D. Deckers, L. Callewaert, A. Aertsen, and C. W. Michiels. 2006. Cell wall substrate specificity of six different lysozymes and lysozyme inhibitory activity of bacterial extracts. FEMS Microbiol. Lett. 259:41–6.
- Nascimento, V. P., and S. E. Solomon. 1991. The transfer of bacteria (Salmonella enteritidis) accross the eggshell wall of eggs classified as "poor" quality. Anim. Technol. 42:157–166.
- Noble, R. C., and M. Cocchi. 1990. Lipid metabolism and the neonatal chicken. Prog. Lipid Res. 29:107–140.

- Nys, Y., J. Gautron, J. M. Garcia-Ruiz, and M. T. Hincke. 2004. Avian eggshell mineralization: Biochemical and functional characterization of matrix proteins. Comptes Rendus - Palevol 3:549–562.
- Nys, Y., and N. Guyot. 2011. Egg formation and chemistry.Pages 83–132 in Improving the safety and quality of eggs and egg products Volume 1. Nys, Y., Bain, M., Van Immerseel, F., eds. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge.
- Nys, Y., M. T. Hincke, Hernandez-Hernandez A., A. B. Rodriguez-Navarro, J. Gomez-Morales, V. Jonchere, J. M. Garcia-Ruiz, and J. Gautron. 2010. Structure, propriétés et minéralisation de la coquille de l'œuf : rôle de la matrice organique dans le contrôle de sa fabrication. INRA Prod. Anim. 23:143–154.
- Ogasawara, T., B. Gotoh, H. Suzuki, J. Asaka, K. Shimokata, R. Rott, and Y. Nagai. 1992. Expression of factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo. EMBO J. 11:467–72.
- Okumura, H., Y. Kohno, Y. Iwata, H. Mori, N. Aoki, C. Sato, K. Kitajima, D. Nadano, and T. Matsuda. 2004. A newly identified zona pellucida glycoprotein, ZPD, and dimeric ZP1 of chicken egg envelope are involved in sperm activation on sperm-egg interaction. Biochem. J. 384:191–199.
- Omana, D. A., Y. Liang, N. N. V Kav, and J. Wu. 2011. Proteomic analysis of egg white proteins during storage. Proteomics 11:144–53.
- Palazón, L. S., and A. Rodríguez-Burgos. 1993. Protein synthesis by chick (Gallus domesticus) extraembryonic membranes. Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem. 104:689–693.
- Palmas, F., C. Fattuoni, A. Noto, L. Barberini, A. Dessì, and V. Fanos. 2016. The choice of amniotic fluid in metabolomics for the monitoring of fetus health. Expert Rev. Mol. Diagn. 7159:1–14.
- Palmiter, R. D. 1972. Regulation of protein synthesis in chick oviduct. I. Independent regulation of ovalbumin, conalbumin, ovomucoid, and lysozyme induction. J. Biol. Chem. 247:6450–61.

- Panheleux, M., O. Kalin, J. Gautron, and Y. Nys. 1999. Features of eggshell formation in guinea fowl: Kinetics of shell deposition, uterine protein secretion and uterine histology. Br. Poult. Sci. 40:632–643.
- Pattern, B. M. 1920. The Early Embriology of the Chick (BM Pattern, Ed.). P. Blakiston's Son and Co., Philadelphia.
- Pellegrini, A., A. J. Hülsmeier, P. Hunziker, and U. Thomas. 2004. Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity. Biochim. Biophys. Acta 1672:76–85.
- Perni, S. C., R. B. Kalish, J. M. Hutson, E. Karasahin, A. M. Bongiovanni, V. Ratushny, S. T. Chasen, and S. S. Witkin. 2005. Differential expression of immune system-related components in midtrimester amniotic fluid from singleton and twin pregnancies.Pages 942–946 in American Journal of Obstetrics and Gynecology.
- Qiu, N., W. Liu, M. Ma, L. Zhao, and Y. Li. 2013. Differences between fertilized and unfertilized chicken egg white proteins revealed by 2-dimensional gel electrophoresisbased proteomic analysis. Poult Sci 92:782–786.
- Quesada, V., L. M. Sánchez, J. Álvarez, and C. López-Otín. 2004. Identification and characterization of human and mouse ovastacin: A novel metalloproteinase similar to hatching enzymes from arthropods, birds, amphibians, and fish. J. Biol. Chem. 279:26627–26634.
- Qureshi, M. A., C. L. Heggen, and I. Hussain. 2000. Avian macrophage: effector functions in health and disease. Dev. Comp. Immunol. 24:103–19.
- Recoules, E., H. Sabboh-Jourdan, A. Narcy, M. Lessire, G. Harichaux, V. Labas, M. Duclos, and S. Réhault-Godbert. 2017. Exploring the in vivo digestion of plant proteins in broiler chickens. Poult. Sci.
- Réhault-Godbert, S., V. Hervé-Grépinet, J. Gautron, C. Cabau, Y. Nys, and M. T. Hincke.
 2011. Molecules involved in chemical defence of the chicken egg.Pages 181–208 in Improving the safety and quality of eggs and egg products - Volume 1. Nys, Y., Bain, M., Van Immerseel, F., eds. Woodhead Publishing, Cambridge.

Réhault-Godbert, S., V. Labas, E. Helloin, V. Hervé-Grépinet, C. Slugocki, M. Berges, M. C.

Bourin, A. Brionne, J. C. Poirier, J. Gautron, F. Coste, and Y. Nys. 2013. Ovalbuminrelated protein X is a heparin-binding ov-serpin exhibiting antimicrobial activities. J. Biol. Chem. 288:17285–17295.

- Réhault-Godbert, S., K. Mann, M. Bourin, A. Brionne, and Y. Nys. 2014. Effect of embryonic development on the chicken egg yolk plasma proteome after 12 days of incubation. J. Agric. Food Chem. 62:2531–40.
- Réhault, S., M. Anton, F. Nau, J. Gautron, and Y. Nys. 2007. Les activités biologiques de l'œuf. INRA Prod. Anim. 20:337–348.
- Retzek, H., E. Steyrer, E. J. Sanders, J. Nimpf, and W. J. Schneider. 1992. Molecular cloning and functional characterization of chicken cathepsin D, a key enzyme for yolk formation. DNA Cell Biol. 11:661–72.
- De Reu, K., K. Grijspeerdt, W. Messens, M. Heyndrickx, M. Uyttendaele, J. Debevere, and L. Herman. 2006. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including Salmonella enteritidis. Int. J. Food Microbiol. 112:253–260.
- Riding, G. A., A. Jones, M. K. Holland, J. R. Hill, and S. A. Lehnert. 2008. Proteomic analysis of bovine conceptus fluids during early pregnancy. Proteomics 8:160–77.
- Romanoff, A. L. 1960. The Avian Embryo. Structural and functional development. The Macmillan Compagny, New York.
- Romanoff, A. L., and A. J. Romanoff. 1967. Biochemistry of the avian embryo: A Quantitative Analysis of Prenatal Development. John Wiley & Sons, Inc., London, Sydney.
- Romero, R., J. P. Kusanovic, F. Gotsch, O. Erez, E. Vaisbuch, S. Mazaki-Tovi, A. Moser, S. Tam, J. Leszyk, S. R. Master, P. Juhasz, P. Pacora, G. Ogge, R. Gomez, B. H. Yoon, L. Yeo, S. S. Hassan, and W. T. Rogers. 2010. Isobaric labeling and tandem mass spectrometry: A novel approach for profiling and quantifying proteins differentially expressed in amniotic fluid in preterm labor with and without intra-amniotic infection/inflammation. J. Matern. Neonatal Med. 23:261–280.

- Rose-Martel, M., J. Du, and M. T. Hincke. 2012. Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle. J. Proteomics 75:2697–2706.
- Rose, M. E., E. Orlans, and N. Buttress. 1974. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. Eur. J. Immunol. 4:521–3.
- Roto, S. M., Y. M. Kwon, and S. C. Ricke. 2016. Applications of In Ovo Technique for the Optimal Development of the Gastrointestinal Tract and the Potential Influence on the Establishment of Its Microbiome in Poultry. Front. Vet. Sci. 3:63.
- Sauveur, B. 1988. Reproduction femelle Formation de l'oeuf.Pages 13–49 in Reproduction des volailles et production d'oeufs. Inra, ed. Paris.
- Saxena, I., and S. Tayyab. 1997. Protein proteinase inhibitors from avian egg whites. Cell. Mol. Life Sci. 53:13–23.
- Schäfer, A., W. Drewes, and F. Schwägele. 1998. Analysis of vitelline membrane proteins of fresh and stored eggs via HPLC. Zeitschrift für Leb. und -forsch. A 206:329–332.
- Schneider, W. R., and R. N. Doetsch. 1974. Effect of viscosity on bacterial motility. J. Bacteriol. 117:696–701.
- Sheng, G., and A. C. Foley. 2012. Diversification and conservation of the extraembryonic tissues in mediating nutrient uptake during amniote development. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1271:97–103.
- Shinohara, H., T. Iwasaki, Y. Miyazaki, K. Matsuo, T. Aoki, M. Matsumoto, T. Oka, J. Kurisaki, K. Mizumachi, T. Kusakabe, K. Koga, and Y. Sugimoto. 2005. Thermostabilized ovalbumin that occurs naturally during development accumulates in embryonic tissues. Biochim. Biophys. Acta 1723:106–13.
- Da Silva, M., S. Beauclercq, G. Harichaux, V. Labas, N. Guyot, J. Gautron, Y. Nys, and S. Rehault-Godbert. 2015. The Family Secrets of Avian Egg-Specific Ovalbumin and Its Related Proteins Y and X. Biol. Reprod. 93:71–77.
- Silversides, F. G., and T. A. Scott. 2001. Effect of Storage and Layer Age on Quality of Eggs From Two Lines of Hens. Poult. Sci. 80:1240–1245.

- Singh, G., and G. Archana. 2008. Unraveling the mystery of vernix caseosa. Indian J. Dermatol. 53:54–60.
- Smith, N. C., M. Wallach, C. M. Miller, R. Braun, and J. Eckert. 1994. Maternal transmission of immunity to Eimeria maxima: western blot analysis of protective antibodies induced by infection. Infect. Immun. 62:4811–7.
- Soto, E., J. Espinoza, J. K. Nien, J. P. Kusanovic, O. Erez, K. Richani, J. Santolaya-Forgas, and R. Romero. 2007. Human beta-defensin-2: a natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity. J. Matern. Fetal. Neonatal Med. 20:15–22.
- Speier, J. S., L. Yadgary, Z. Uni, and E. A. Wong. 2012. Gene expression of nutrient transporters and digestive enzymes in the yolk sac membrane and small intestine of the developing embryonic chick. Poult. Sci. 91:1941–9.
- Spencer, K., F. Muller, and D. A. Aitken. 1997. Biochemical markers of trisomy 21 in amniotic fluid. Prenat. Diagn. 17:31–7.
- Sterchi, E. E., W. Stöcker, and J. S. Bond. 2009. Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. Mol. Aspects Med. 29:309–328.
- Sugiarto, H., and P.-L. Yu. 2004. Avian antimicrobial peptides: the defense role of βdefensins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 323:721–727.
- Sugimoto, Y., A. Saito, T. Kusakabe, K. Hori, and K. Koga. 1989. Flow of egg white ovalbumin into the yolk sac during embryogenesis. Biochim. Biophys. Acta 992:400–403.
- Sugimoto, Y., S. Sanuki, S. Ohsako, Y. Higashimoto, M. Kondo, J. Kurawaki, H. R. Ibrahim, T. Aoki, T. Kusakabe, and K. Koga. 1999. Ovalbumin in Developing Chicken Eggs Migrates from Egg White to Embryonic Organs while Changing Its Conformation and Thermal Stability. J. Biol. Chem. 274:11030–11037.
- Svensson, S. L., M. Pasupuleti, B. Walse, M. Malmsten, M. Mörgelin, C. Sjögren, A. I. Olin,M. Collin, A. Schmidtchen, R. Palmer, and A. Egesten. 2010. Midkine and pleiotrophinhave bactericidal properties: Preserved antibacterial activity in a family of heparin-

binding growth factors during evolution. J. Biol. Chem. 285:16105–16115.

- Tabata, E., A. Kashimura, S. Wakita, M. Ohno, M. Sakaguchi, Y. Sugahara, Y. Kino, V. Matoska, P. O. Bauer, and F. Oyama. 2017. Gastric and intestinal proteases resistance of chicken acidic chitinase nominates chitin-containing organisms for alternative whole edible diets for poultry. Sci. Rep. 7.
- Takeuchi, Y., K. Nishimura, N. Aoki, T. Adachi, C. Sato, K. Kitajima, and T. Matsuda. 1999. A 42-kDa glycoprotein from chicken egg-envelope, an avian homolog of the ZPC family glycoproteins in mammalian zona pellucida. Its first identification, cDNA cloning and granulosa cell-specific expression. Eur. J. Biochem. 260:736–742.
- Tian, X., J. Gautron, P. Monget, and G. Pascal. 2010. What makes an egg unique? Clues from evolutionary scenarios of egg-specific genes. Biol. Reprod. 83:893–900.
- Tollin, M., G. Bergsson, Y. Kai-Larsen, J. Lengqvist, J. Sjövall, W. Griffiths, G. V. Skúladóttir, Á. Haraldsson, H. Jörnvall, G. H. Gudmundsson, and B. Agerberth. 2005. Vernix caseosa as a multi-component defence system based on polypeptides, lipids and their interactions. Cell. Mol. Life Sci. 62:2390–2399.
- Tona, K., F. Bamelis, B. De Ketelaere, V. Bruggeman, V. Moraes, J. Buyse, O. Onagbesan, and E. Decuypere. 2003. Effects of egg storage time on spread of hatch, chick quality, and chick juvenile growth. Poult. Sci. 82:736–741.
- Tranter, H. S., and R. G. Board. 1984. The influence of incubation temperature and pH on the antimicrobial properties of hen egg albumen. J. Appl. Bacteriol. 56:53–61.
- Tuan, R. S., M. J. Carson, J. A. Jozefiak, K. A. Knowles, and B. A. Shotwell. 1986. Calciumtransport function of the chick embryonic chorioallantoic membrane. I. In vivo and in vitro characterization. J. Cell Sci. 82:73–84.
- Tzschentke, B. 2008. Monitoring the development of thermoregulation in poultry embryos and its influence by incubation temperature. Comput. Electron. Agric. 64:61–71.
- Underwood, M. A., W. M. Gilbert, and M. P. Sherman. 2005. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. J. Perinatol. 25:341–8.
- Uni, Z., and P. R. Ferket. 2003. Enhancement of development of oviparous species by in ovo 173

feeding of enteric modulators.

- Uni, Z., P. R. Ferket, E. Tako, and O. Kedar. 2005. In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. Poult. Sci. 84:764–70.
- Valdes, T. I., D. Kreutzer, and F. Moussy. 2002. The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. J. Biomed. Mater. Res. 62:273–82.
- Waclawek, M., R. Foisner, J. Nimpf, and W. J. Schneider. 1998. The chicken homologue of zona pellucida protein-3 is synthesized by granulosa cells. Biol. Reprod. 59:1230–9.
- Wakenell, P. S., A. T. Bryan, J. Schaeffer, A. Avakian, C. Williams, and C. Whitfill. 2002. Effect of In Ovo Vaccine Delivery Route on Herpesvirus of Turkeys/SB-1 Efficacy and Viremia. Avian Dis. 46:274–280.
- Wanitchang, A., S. Wongwisarnsri, S. Yongkiettrakul, and A. Jongkaewwattana. 2010. Extraction of catalytically active neuraminidase of H5N1 influenza virus using thrombin proteolytic cleavage. J. Virol. Methods 163:137–143.
- Weissmann, A., S. Reitemeier, A. Hahn, J. Gottschalk, and A. Einspanier. 2013. Sexing domestic chicken before hatch: A new method for in ovo gender identification. Theriogenology 80:199–205.
- Wellman-Labadie, O., J. Picman, and M. T. Hincke. 2008. Antimicrobial activity of cuticle and outer eggshell protein extracts from three species of domestic birds. Br. Poult. Sci. 49:133–143.
- West, A. P., A. B. Herr, and P. J. Bjorkman. 2004. The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC-related Fc receptor, is a phospholipase A2 receptor homolog. Immunity 20:601–10.
- Whenham, N., T. C. Lu, M. B. M. Maidin, P. W. Wilson, M. M. Bain, M. L. Stevenson, M. P. Stevens, M. R. Bedford, and I. C. Dunn. 2015. Ovodefensins, an Oviduct-Specific Antimicrobial Gene Family, Have Evolved in Birds and Reptiles to Protect the Egg by Both Sequence and Intra-Six-Cysteine Sequence Motif Spacing. Biol. Reprod. 92:157.
- White, H. B., and A. H. Merrill. 1988. Riboflavin-Binding Proteins. Annu. Rev. Nutr. 8:279–299.

- Willems, E., E. Decuypere, J. Buyse, and N. Everaert. 2014. Importance of albumen during embryonic development in avian species, with emphasis on domestic chicken. Worlds. Poult. Sci. J. 70:503–518.
- Williams, C. J., and B. a Hopkins. 2011. Field evaluation of the accuracy of vaccine deposition by two different commercially available in ovo injection systems. Poult. Sci. 90:223–6.
- Yadgary, L., A. Cahaner, O. Kedar, and Z. Uni. 2010. Yolk sac nutrient composition and fat uptake in late-term embryos in eggs from young and old broiler breeder hens. Poult. Sci. 89:2441–52.
- Yadgary, L., O. Kedar, O. Adepeju, and Z. Uni. 2013. Changes in yolk sac membrane absorptive area and fat digestion during chick embryonic development. Poult. Sci. 92:1634–40.
- Yadgary, L., and Z. Uni. 2012. Yolk sac carbohydrate levels and gene expression of key gluconeogenic and glycogenic enzymes during chick embryonic development. Poult. Sci. 91:444–53.
- Yadgary, L., E. A. Wong, and Z. Uni. 2014. Temporal transcriptome analysis of the chicken embryo yolk sac. BMC Genomics 15:690.
- Yadgary, L., R. Yair, and Z. Uni. 2011. The chick embryo yolk sac membrane expresses nutrient transporter and digestive enzyme genes. Poult. Sci. 90:410–6.
- Yair, R., R. Shahar, and Z. Uni. 2013. Prenatal nutritional manipulation by in ovo enrichment influences bone structure, composition, and mechanical properties. J. Anim. Sci. 91:2784–93.
- Yoshio, H., M. Tollin, G. H. Gudmundsson, H. Lagercrantz, H. Jörnvall, G. Marchini, and B. Agerberth. 2003. Antimicrobial polypeptides of human vernix caseosa and amniotic fluid: Implications for newborn innate defense. Pediatr. Res. 53:211–216.
- Yoshizaki, N., Y. Ito, H. Hori, H. Saito, and A. Iwasawa. 2002. Absorption, transportation and digestion of egg white in quail embryos. Dev. Growth Differ. 44:11–22.
- Yoshizaki, N., W. Yamaguchi, S. Ito, and C. Katagiri. 2000. On the Hatching Mechanism of 175

Quail Embryos: Participation of Ectodermal Secretions in the Escape of Embryos from the Vitelline Membrane. Zoolog. Sci. 17:751–758.

Zheng, W. M., Y. Yoshimura, and T. Tamura. 1997. Effects of sexual maturation and gonadal steroids on the localization of IgG-, IgM- and IgA-positive cells in the chicken oviduct. J Reprod Fertil 111:277–284.

Annexe 1 : Etude préliminaire du profil métabolique du fluide allantoïque d'œuf de poule au 10^{ème} jour d'incubation par 1H-NMR spectroscopie

Préparation de l'échantillon : 600μ L d'échantillon + 200 μ L de tampon phosphate deutéré (pH 7,4) + 8, μ L de TSP (concentration finale dans le tube RMN de 5.7uM). Le tube est centrifugé et 200 μ L sont transférés dans un tube RMN de 3 mm. Les spectres obtenus sont phasés et alignés (TSP à $\delta = 0$ ppm) avant d'être superposés.

Les identifications spectrales ont été faites sur le spectre du fluide allantoïque filtré (cut-off de 3000 kDa) et lyophilisé avec la base de données ChenomX NMR suite 7.7. Les concentrations ne sont données qu'à titre indicatif :

	Concentration en métabolites (mM)	
Métabolites	Avec glycérol	Sans glycérol
2-hydroxy-3-methyvalerate	0,011	0,011
3-hydroxybutyrate	0,1616	0,1616
3-methyl-2-oxovalerate	0,0054	0,0054
acétate	0,0183	0,0183
alanine	0,0105	0,0105
choline	0,0074	0,0074
citrate	0,2131	0,2131
créatine	0,0243	0,0243
dss-d6	0,0055	0,0055
formate	0,0326	0,0326
fumarate	0,0017	0,0017
glucose	0,3092	0,3092
glutamine	0,0361	0,0361
glycérol	0,6826	-
isobutyrate	0,0086	0,0086
isoleucine	0,0046	0,0046
lactate	0,281	0,281
leucine	0,0053	0,0053
lysine	0,041	0,041
phénylalanine	0,0054	0,0054
pyruvate	0,0152	0,0152
sn-glycero-3-phosphocholine	0,0068	0,0068
tyrosine	0,0106	0,0106
uracile	0,0059	0,0059
valine	0,0056	0,0056

Les schémas suivants illustrent l'abondance de chaque métabolite identifié au sein du fluide allantoïque en prenant le glycérol en compte (A) ou non (B) :



Annexe 2 : Communications scientifiques

XXI European Symposium on the Quality of Poultry Meat and XVI European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products (Communication orale, 2015) :

Da Silva M., Beauclercq S., Harichaux G., Mouton G., Labas V., Guyot N., Gautron J., Nys Y., <u>Réhault-Godbert S.</u> *Egg ovalbumins revisited: investigating the specificities of ovalbumin, ovalbumin-related protein X and ovalbumin-related protein Y.*

GDR 3604 "Modèle aviaire" (Communication orale, 2015) :

<u>Réhault-Godbert S.</u> and Da Silva M. Chicken Egg: formation, composition and function of egg proteins

Combined Meeting of the Incubation and Fertility Research Group (IFRG/WPSA Working Group 6) and 7th Combined Workshop on "Fundamental Physiology and Perinatal Development in Poultry (WPSA Working Group 12) (Poster, 2015) :

<u>Da Silva M.</u>, Nys Y., Réhault-Godbert S. *Investigating the role of the amniotic and chorioallantoic fluids in the protection of the embryo.*

29^{ème} Colloque du Biotechnocentre (Poster, 2016) :

<u>Da Silva M.</u>, Brionne A., Labas V., Combes-Soia L., Mills M., Chessé M., Nys Y., Réhault-Godbert S. *Exploring the role of the chicken amniotic fluid during embryonic development*

Incubation and Fertility Research Group (IFRG/WPSA Working Group 6) (Communication orale, 2016) :

<u>Da Silva M.</u>, Brionne A., Labas V., Combes-Soia L., Mills M., Chessé M., Nys Y., Réhault-Godbert S. *Exploring the role of the chicken amniotic fluid during embryonic development*

Concours « Ma thèse en 180 secondes », finale départementale (Communication orale, 2017) :

<u>Da Silva M.</u> Caractérisation des défenses naturelles de l'œuf de poule au cours du développement embryonnaire
12^{ème} édition des Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras (Communication orale, 2017) :

<u>Da Silva M.</u>, Labas V., Nys Y., Réhault-Godbert S. *Caractériser pour mieux comprendre le rôle des fluides amniotique et allantoïque au cours du développement de l'embryon de poulet*

GDR 3604 "Modèle aviaire" (Communication orale, 2017) :

<u>Da Silva M.</u>, Labas V., Nys Y., Réhault-Godbert S. *Investigating the role of the amniotic and allantoic fluids during the development of the chicken embryo*

30^{ème} Colloque du Biotechnocentre (Communication orale, 2017) :

Da Silva M., Dombre C., Brionne A., Monget P., Chessé M., De Pauw M., Mills M., Combes-Soia L., Labas V., Guyot N., Nys Y., Réhault-Godbert S. *L'implication du liquide amniotique dans la défense de l'embryon d'oiseau face aux pathogènes*

Annexe 3 : Première revue

BIOLOGY OF REPRODUCTION (2015) **93**(3):71, 1–7 Published online before print 8 July 2015. DOI 10.1095/biolreprod.115.130856

Minireview

The Family Secrets of Avian Egg-Specific Ovalbumin and Its Related Proteins Y and X

Mylene Da Silva,² Stéphane Beauclercq,³ Grégoire Harichaux,⁴ Valérie Labas,⁴ Nicolas Guyot,² Joel Gautron,² Yves Nys,² and Sophie Rehault-Godbert^{1,2}

 ²INRA, UR83 Recherches Avicoles, Fonction et Régulation des Protéines de l'Œuf, Nouzilly, France
 ³INRA, UR83 Recherches Avicoles, Métabolisme des Oiseaux, Croissance et Adaptation, Nouzilly, France
 ⁴INRA, Plateforme d'Analyse Intégrative des Biomolécules, Laboratoire de Spectrométrie de Masse, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, CNRS, UMR7247, Université François Rabelais de Tours, IFCE, Nouzilly, France

ABSTRACT

The ovalbumin gene family in Gallus gallus is composed of three homologous genes located within a 46 kb locus on chromosome 2: ovalbumin, ovalbumin-related protein Y (OVAY), and ovalbumin-related protein X (OVAX) genes. The expression of these genes in hen oviduct is under estrogen control, but their relative hormonal responsiveness and subsequent protein concentration in egg, is distinctive. Interestingly, all three proteins lack the classical signal peptide for secretion. Ovalbumin, OVAX, and OVAY belong to the serine protease inhibitor (serpin) family whose members share a common tertiary structure. Ovalbumin and OVAX are one of the few members of this family that do not express any protease inhibition activity whereas OVAY has been predicted to be inhibitory, by comparison with the consensus sequence for inhibitory serpins. In contrast to ovalbumin and OVAY, OVAX interacts with heparin, a negatively charged glycosaminoglycan, via a positively charged domain exposed at the surface of the molecule. Ovalbumin is the major egg white protein and might be a source of amino acids for the developing embryo. The physiological function of OVAY is not known, but recent data have revealed a possible role of this protein in early embryonic development. Considering the antibacterial activities of OVAX, this protein might play a role in egg defense. This review sheds light on the expression, biochemistry, and structural specificities of these three highly similar paralogs. It gives new clues in favor of diverging functions, which are likely to have arisen by duplication events from a common ancestral gene.

chicken, egg, evolution, expression, function, ovalbumin, structure

INTRODUCTION

The chicken egg contains all the nutrients, vitamins, minerals, and biological activities to ensure the development of an embryo within 21 days. The last decade was marked by the advent of proteomics and transcriptomics, which helped to identify hundreds of egg proteins distributed in all the egg

compartments. However, there is much work to be done to characterize their physiological function with regard to reproduction and embryonic development. Ovalbumin is the major egg white protein synthesized in the hen's oviduct, within the magnum tissue, and is responsible for egg white formation. It accounts for about 54% of the total proteins of egg albumen. First isolated and purified by crystallization by Hofmeister in 1890 [1], the protein was named ovalbumin by Osborne and Campbell in 1900 [2]. Hunt and Dayhoff [3] were the first to underline a phylogenetic relationship between the chicken ovalbumin and the two human-plasma protease inhibitors α 1-antitrypsin and antithrombin III. They proposed a provisional name of ovalbumin-antithrombin superfamily, which later became the SERPIN family (for serine protease inhibitor). Ovalbumin (SERPINB14) is the founding member of the subgroup clade B serpins, also known as ov-serpins [4]. However, ovalbumin does not possess any protease inhibitory activities and little is known regarding its physiological functions.

The ovalbumin gene possesses two paralogs called the OVAX and OVAY genes localized within a 46 kb region on chromosome 2 in *Gallus gallus* [5]. Ovalbumin-related protein X (OVAX, SERPINB14C) and ovalbumin-related protein Y (OVAY, SERPINB14B) genes have likely arisen by duplication events from a common ancestral gene because the two gene-coding sequences share highly significant similarity with that of the ovalbumin [6, 7]. The two related proteins OVAY and OVAX have been identified in egg white in 2006 [8], and although their physicochemical properties have been characterized recently, their physiological functions remains undefined. There is, however, increasing data in literature regarding their potential involvement [9–11] or egg defense [12].

Many new gene functions have evolved through gene duplication, and the question is whether OVAX and OVAY have acquired a new adaptive function as compared with that of ovalbumin. In this review, we propose an overview of ovalbumin and its related proteins with regards to new information concerning their expression, biochemistry, and structural properties, as well as emerging biological activities.

GENE ORGANIZATION AND EVOLUTIONARY HISTORY

The first mention of ovalbumin gene duplication dates back to 1977 [13]. Royals et al. [5] confirmed the hypothesis of ovalbumin gene duplication in 1979 with the discovery of the two genes OVAX and OVAY, similar to the ovalbumin gene.

Article 71

¹Correspondence: E-mail: srehault@tours.inra.fr

Received: 15 April 2015. First decision: 18 May 2015. Accepted: 6 July 2015. © 2015 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.

eISSN: 1529-7268 http://www.biolreprod.org ISSN: 0006-3363

These duplication events can be approximately dated to 50-80 million years ago based on nucleotide drift at silent sites in amino acid-coding sequences of ovalbumin, OVAX, and OVAY proteins [6, 7]. The gene duplication may have happened only in birds because no orthologs have been found in humans or other vertebrate species [14, 15]. Indeed, using Ensembl options [16] and the updated databanks, three orthologues were found in turkey, duck, and fly-catcher. However, it is noteworthy that several coorthologues could be identified in lizard (Anolis carolinensis), turtle (Pelodiscus sinensi), horse, and fishes, including Amazon molly (Poecilia formosa), cave fish (Astvanax mexicanus), cod (Gadus morhua), fugu (Takifugu rubripes), medaka (Oryzias latipes), platyfish (Xiphophorus maculatus), spotted gar (Lepisosteus oculatus), stickleback (Gasterosteus aculeatus), tetraodon (Tetraodon nigroviridis), tilapia (Oreochromis niloticus), and Zebrafish (Danio rerio).

Localized on chromosome 2 in the order 5'-X-Y-ovalbumin-3', the three genes are similarly oriented and share closely related sequences composed of 7564 nucleotides for ovalbumin and 6652 and 7071 nucleotides for the OVAY and OVAX genes, respectively. The lengths and number of coding exons are identical between the three genes except for the last exon. exon 7, where two insertion-deletion events have probably occurred in the OVAX gene during evolution [6, 7]. The start and stop codons found in the amino acid-coding sequence are basically at the same location for the three genes. Alignment of mRNA sequences of all three genes using National Center for Biotechnology Information databank for updated accession numbers and data (ovalbumin mRNA, NM_205152.1; OVAY mRNA, NM_001031001.1; OVAX mRNA corresponding to protein accession number AGN32861.1 [12]) indicates a sequence identity of 72.6% between ovalbumin and OVAX, of 71.5% between ovalbumin and OVAY, and 81.9% between OVAX and OVAY (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) [17]. Some repetitive sequences have been identified in the OVAX introns, 3' end and upstream from the OVAY leader, but these sequences do not cross-hybridize with the repetitive sequences found in the OVAY gene. In 1980, these sequences have been referred to as potential regulatory elements for steroid-induced genes [7].

Although highly similar in nucleic sequences, ovalbumin, OVAY, and OVAX genes have been retained by selective pressure during evolution, which strongly suggests that the genes and the corresponding proteins might have acquired some specific properties of interest for the egg and the developing avian embryo.

EXPRESSION OF OVALBUMIN GENES: LOCATION AND INDUCTION

Tissue Specificity

Ovalbumin and its related proteins OVAY and OVAX are mainly produced by the oviduct [18, 19] and more specifically by tubular gland cells of the chicken's magnum (egg white formation), although a significant expression of ovalbumin gene has been observed in the infundibulum (vitelline membranes) and white isthmus (eggshell membranes) by quantitative RT-PCR [12]. Repression of ovalbumin gene in nonoviduct tissue and in estrogen-deprived oviduct depends on a strong repressor site located from -130 to -100 and designated CAR (for COUP-TF adjacent repressor) [20].

Protein synthesis of ovalbumin and its homologs relies upon hormonal stimulation and is intimately related to egg formation in sexually mature hens. In 15- to 16-wk-old pullets, estrogens will initiate the cytodifferentiation of tubular gland cells in the magnum part of the oviduct epithelium, which synthesizes ovalbumin. Tubular gland cells start to synthesize ovalbumin before gland formation. Progesterone itself cannot stimulate ovalbumin synthesis but the combination of estrogens and progesterone seems to have an initial synergistic effect on ovalbumin synthesis as assessed by immunoprecipitation of ovalbumin from oviduct explants labeled with radioactive amino acids [21]. Similar to ovalbumin, the steroid hormone estradiol stimulates the levels of OVAX and OVAY transcripts but to varying degrees [5]. Indeed, the transcriptional rate of the three genes differs on the order of ovalbumin:OVAY:OVAX = 100:10:1 as reported by using ³H-labeled ovalbumin, OVAY, and OVAX probes [22]. Others have shown that after administration of estradiol to chicks withdrawn for 2 days, OVAX and OVAY mRNAs accounts for 0.3% and 0.8% of ovalbumin mRNA, respectively, using ³²P-specific probes whereas the level of OVAX mRNA and OVAY mRNA is 0.2% of that of ovalbumin's in laying hens [23]. Interestingly enough, these authors have also noticed that various hormonal treatments with estradiol, progesterone, testosterone, and dexamethasone alone or in combination do not have the same effects on ovalbumin, OVAX, or OVAY transcription, suggesting some specific features in the promoter regions of these three related genes [23]. However, the comparison between 5'-flanking regions of all three genes revealed a high sequence homology (about 70%), and the analysis of the primary structure of all the genes did not show any significant traits that could explain their potential diverging responsiveness [24]. To date, there is still no evidence of specific domains or responsive elements that could shed light on the differences in mRNA abundance of these three genes. One have suggested that the lower abundance of OVAX and OVAY mRNAs might reflect some specific RNA processing or instability rather than a true difference in hormonal responsiveness [23].

PROTEIN DISTRIBUTION AND ABUNDANCE IN EGGS

Ovalbumin, OVAX, and OVAY have been detected in all egg compartments, including egg yolk [25, 26], egg white [8, 27, 28], vitelline membrane [29], and eggshell [30]. All of them are mainly concentrated in the egg white. Ovalbumin is the major egg white protein with a concentration of 50–60 mg/ ml of egg white. According to emPAI values from proteomic approaches, ovalbumin, OVAY, and OVAX are in the top-12 most prominent proteins of egg white and vitelline membrane [28, 29]. OVAY concentration in egg white is hypothesized to be about 7 mg/ml (13% of the whole egg white ovalbumin) [31]. Regarding OVAX, based on yield of purification from egg white, its concentration was estimated to be 0.3 mg/ml in egg white, which is consistent with the estimated values from expression [22, 23].

Some recent publications have underlined that the abundance of some of these proteins could vary depending on stressful environments [32] because treating the hens with corticosterone to mimic stressful environment affects the expression of ovalbumin and its two related proteins; in addition, the type of egg production, conventional versus the organic production, affects the abundance of ovalbumin degradation products [33]. The genetic origin [33] seems also to contribute to differences in ovalbumin(s) because higher abundances of OVAX and OVAY but also higher propensities of cleaved forms of ovalbumin (suggesting some degradation processes) have been reported for white eggs (Single comb white Leghorn hens) as compared with brown eggs (Rhode Island Red hens) [33]. Some have also observed that the expression of the ovalbumin gene in hen oviduct decreases

Article 71

CHICKEN EGG OVALBUMINS

OVA [G.	gallus]	1	MGSI <mark>GAA</mark> SMEFCFDVF <mark>KELKVHHANENIFYCPIA</mark> IMSALAMVYLGAKDSTR
OVAY[G.	gallus]	1	MDSIS <mark>VT</mark> NAKFCFDVFNEMKVHHVNENILYCPLSILTALAMVYLGARGNTE
OVAX[G.	gallus]	1	MFFYNTDFRMGSISAANAEFCFDVFNELKV <mark>C</mark> HTNENILYSPLSIIVALAMVYMGARGNTE
OVA [G.	gallus]	52	TQINKVVRFDKLPGFGDSIBAQCGTSVNVHSSLRDILNQITKPNDVYSFSIASRL
OVAY[G.	gallus]	52	SQMKKVLHFDSITGAGSTTDSQCGSSEYVHNLFKELLSEITRPNATYSLETADKL
OVAX[G.	gallus]	61	YQMEKALHFDSIAGLGGSTQTKVQKPKCGKSVNIHLLFKELLSDITASKANYSLRIANRL
OVA [G.	gallus]	107	YAEERYPILPEYLOCVKELYRGGLEDINFOTAADQARELINSWVESQTNG <mark>I</mark> IRNYLODSS
OVAY[G.	gallus]	107	YVOKTESVLPEYLSCARKEYLGGVEEVNFKTAAEEARQLINSWVEKETNGQIKDLLVSSS
OVAX[G.	gallus]	121	YAEKSRPILPIYLKCVKKLYRAGLE <mark>HVNFKTAS</mark> DQARQLINSWVEKQTEGQIKDLLVSSS
OVA [G.	gallus]	167	VDSOTAMVLVNAIVFKGIWEKAFKDEDT <u>QA</u> MPFRVTEQESKPVQMM <mark>YQIGLFR</mark> VASMASE
OVAY[G.	gallus]	167	IDFGTTMVFINTIYFKGIWK <mark>I</mark> AFN <mark>T</mark> EDTREMPFSMTKEESKPVQMMCMNNSFNVATLPAE
OVAX[G.	gallus]	181	TD <mark>LDTTIVLVNAIYFKGMWKT</mark> AFN <mark>A</mark> EDTREMPFHVTKEESKPVQMMCMNNSFNVATLPAE
OVA [G.	gallus]	227	KMKILELPFASG <mark>IM</mark> SMLVLLPDEVSGLE <mark>OLE</mark> SIINFEKLTEWTSSNVMEERKIKVYLPRM
OVAY[G.	gallus]	227	KMKILELPVASGDLSMLVLLPDEVSGLERIEKTINFDKLREWTSTNAMAKKSMKVYLPRM
OVAX[G.	gallus]	241	KMKILELPFASGDLSMLVLLPDEVSGLERIEKTINFEKLTEWT <mark>NP</mark> NIMEKRRVKVYLP <mark>O</mark> M
OVA [G.	gallus]	287	KMEEKYNLTSVLMAMGITDVFSS <mark>SANLS</mark> GISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSA
OVAY[G.	gallus]	287	KIEEKYNLTSILMALGMTDLFS <mark>R</mark> SANLTGISSS <mark>VDNLM</mark> ISDAVHGVFMEVNEEGTBATGST
OVAX[G.	gallus]	301	KIEEKYNLTSVLMALGMTDLF <mark>IP</mark> SANLTGISSAESLKISQAVHGAFMELS <mark>EDGI</mark> EMAGST
OVA [G.	gallus]	347	EAGVDAASVSEEFRADHPFLFCIKH <mark>IA</mark> TNAVLFFGRCVSP
OVAY[G.	gallus]	347	GAIGNIKHS <mark>LELEEFRADHPFLFFIRV</mark> NPTNAILFFGRYWSP
OVAX[G.	gallus]	361	G <mark>VIEDIKHSPELEOFRADHPFLFI</mark> IKHNPTN <mark>UIVYFGRYWSP</mark>

FIG. 1. Sequence alignments of ovalbumin (OVA, NP_990483), ovalbumin-related protein Y (OVAY, NP_001026172.1), and ovalbumin-related protein X (OVAX, AGN32861.1). The alignment was performed using ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) [71] and BoxShade (http://www.ch. embnet.org/software/BOX_form.html) [72]. Identical and similar residues are indicated in black boxes and gray boxes, respectively.

3

during aging [34]. There is to date no evidence of such a regulation of OVAX and OVAY expression.

PRIMARY SEQUENCES: COMMON FEATURES AND DIFFERENCES

Identities and Motifs

The alignment of ovalbumin (386 residues), OVAX (402 residues), and OVAY (388 residues) protein sequences deduced from mRNA reveals that ovalbumin shares 57.5 % and 61.9 % protein sequence identify with OVAY and OVAX protein sequences, respectively, whereas OVAX and OVAY sequences have 73.45 % identify (Fig. 1). Ovalbumin, OVAX, and OVAY belong to the serpin superfamily based on the presence of a stretch of 11 residues, which fits with the consensus sequence for serpin members. These are FRADHPFLFCI, FRADHPFLFFI, and FRADHPFLFLI for ovalbumin, OVAY, and OVAX, respectively.

Nonconventional Signal Peptide

All three proteins are secreted in the egg upon production by the oviduct although they all lack the classical signal peptide associated with most secretory proteins [35, 36]. Ovalbumin was shown to contain an internal rather than an N-terminal signal sequence [37] and is secreted without cleavage of a hydrophobic signal peptide. The initiating methionine is cleaved from the primary translation product of ovalbumin mRNA when the nascent polypeptide is about 20 residues long, and the newly exposed N-terminal glycine is then further acetylated [36]. The location of the signal peptide in ovalbumin remains unclear as some have identified a region around residue 240 [37] whereas others have described a peptide of 27 residues near the N-terminal extremity of the ovalbumin sequence [38]. Considering the latter peptide, this region is 74% identical to that of OVAY and 63% identical to that of OVAX, suggesting that these two proteins might undergo similar mechanisms of secretion. But the reason why the internal peptide of members of the ovalbumin's family is not cleaved upon secretion has not been solved yet. This specificity is quite unusual. Only two of the 30 serpins analyzed undergo a similar mechanism of secretion: plasminogen activator inhibitor 2/SERPINB2 and leucocyte elastase inhibitor/SERPINB1. Similarly, the analysis of the major proteins identified in the various chicken egg compartments-lysozyme (P00698), ovomucoid (P01005), ovoinhibitor (P10184), ovostatin

Article 71

Downloaded from www.biolreprod.org

DA SILVA ET AL.

TABLE T. Biochemical Characterization of ovalbumini, OVAT, and OVAX.						
Protein name (accession number)	pl ^a	Theorical molecular weight (Da)	Disulfide bonds	N-Glycosylations		
Ovalbumin (AAB59956.1) Ovalbumin-related protein Y (P01014.1) Ovalbumin-related protein X (AGN32861.1)	5.19 5.20 6.29	42 881 43 772 45 430	Cys74-Cys121 ? ?	Asn293 Asn95, Asn215, Asn293, Asn312 (predicted) Asn111, Asn229, Asn326		

TABLE 1. Biochemical characterization of ovalbumin, OVAY, and OVAX.

^a pl, isoelectric point.

(P20740), ovotransferrin (P0278), riboflavin-binding protein (P02752), Tenp (O42273), avidin (P02701), ovomucin/mucin 5B (Q98UI9), cystatin (P01038), ovomucin (F1NBL0), AvBD-11 (Q6IV20), transthyretin (P27731), apolipoprotein B (F1NV02), apolipoprotein A-I (P08250), albumin (P19121), zona pellucida sperm-binding protein 3 (P79762), zona 2011 perfuctive spenie-ontolling protein 5 (P79702), 2011 pellucida protein 1 (Q9DER4), apolipoprotein D (Q5G8Y9), VMO-I (P41366), vitellogenin 3 (Q91025), vitellogenin-2 (P02845), apovitellenin (P02659), osteopontin (P23498), clusterin (Q9YGP0), OCX-32 (Q90YII), OC-17 (V5NUE7), OC 111 (T2197), application (P02011), OC-17 (V5NUE7), OC-116 (F1NSM7), and pleiotrophin (R4GMK4)-revealed that only Tenp (O42273), a protein found in egg white and the vitelline membranes, also lacks the classical signal peptide for secretion. The biological significance of the peculiar ability of Tenp, members of the egg ovalbumin family, and at least two vertebrate serpins, as well as probably other proteins, to be secreted via endoplasmic reticulum/Golgi-independent mechanisms remains, however, poorly understood. With respect to OVAY, an acetylation of the N-terminal residue has been hypothesized [31]. Mass spectrometry analysis of the OVAX sequence allowed the identification of the peptide MFFYNTDFR corresponding to the sequenced mRNA [12], which confirmed that the N-terminal extremity of OVAX is somehow different from that of ovalbumin and OVAY. Furthermore, OVAX is not predicted to be N-acetylated using NetAcet 1.0 Server [39].

Biochemical Features

Biochemical properties of ovalbumin, OVAY, and OVAX are summarized in Table 1. Ovalbumin and OVAY display similar isoelectric points (pI \sim 5.2) and comparable molecular weight (42 881 Da and 43 772 Da, respectively). OVAX exhibits a higher pI (6.29) and molecular weight (45 430 Da). A disulfide bond has been described for ovalbumin (Cys74-Cys121, [40]). This bond might also be present in OVAY, considering that Cys74 and Cys121 are conserved. For OVAX, because its amino acid sequence is longer, especially in the vicinity of the first cysteine residue (five additional residues), it has been hypothesized that the two corresponding cysteines are spatially too distant to form a disulfide bond [12].

OVAX and OVAY are highly glycosylated whereas only one site of glycosylation has been identified for ovalbumin. The Asn293 of the ovalbumin carries a carbohydrate chain composed of mannose and N-acetylglucosamine with β (1-4) links ([41]). A study on N-glycosylation site-deletion ovalbumin mutants described this carbohydrate chain as necessary in ovalbumin folding and secretion [42]. This glycosylated site is present in OVAY, and deglycosylation experiments done on OVAY confirmed that this protein is glycosylated [31]. The glycosylation sites of OVAY need to be further identified but in addition to Asn293, three potential N-glycosylated sites were predicted on Asn95, Asn215, and Asn312. OVAY seems to have a carbohydrate moiety similar to that of egg white ovomucoid [43]. Regarding OVAX, two N-glycosylated sites were confirmed by tandem mass spectrum analysis: Asn111-Tyr-Ser and Asn229-Asn-Ser [12] whereas a third glycosylation site has been recently identified on Asn326-Leu-Thr (G. Harichaux, unpublished results). The first sites were also identified as nonglycosylated, suggesting a macroheterogeneity in OVAX glycosylation pattern.

Two phosphorylation sites were identified in ovalbumin on Ser68 and Ser344 [44] whereas OVAY has been shown to be nonphosphorylated [31]. Numerous phosphorylation sites are predicted for OVAX and need to be confirmed.

Ovalbumin and OVAY are closely related in terms of sequence, pI, and molecular weight except that OVAY seems to bears carbohydrate chains, allowing its purification using antibodies against ovonucoid carbohydrates [43]. Concerning OVAX, many different properties can be exploited to selectively purify this protein from egg (e.g., pI and molecular weight). One of them is its affinity to heparin, a negatively charged glycosaminoglycan secreted by mastocytes and present in the extracellular matrix, which greatly facilitates the process of purification by affinity chromatography [12].

THREE DIMENSIONAL STRUCTURES

Serpins and Ov-serpins

As previously mentioned, all three proteins belong to the serpin family, which share the same overall three-dimensional structure consisting of eight to nine alpha-helices and three beta-sheets. These secondary structures make up the main core of the protein. The inhibitory activity of serpins against serine proteases is triggered by a highly flexible region forming the reactive center loop. Ovalbumin is a member of the subgroup SERPINB, also known as ovalbumin-related serpins (ov-serpins) defined by common structures: shorter N- and C-termini than the other serpins, a nonconventional signal peptide, and a similar gene organization [14]. Most ov-serpins do not exhibit any inhibitory activity [45], which can be



FIG. 2. Sequence alignments of the hinge region of ovalbumin (OVA, NP_990483), ovalbumin-related protein Y (OVAY, NP_001026172.1), and ovalbumin-related protein X (OVAX, AGN32861.1). Black boxes are residues that fit with the consensus sequence for inhibitory serpins. The potential reactive sites with serine proteases are illustrated in bold and an arrow.

4

Article 71



FIG. 3. Three-dimensional structures of OVA (ovalbumin; **A**), OVAY (model; **B**), and OVAX (model; **C**). Automatic homology modeling of OVAX and OVAY was performed using I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement), which is a hierarchical method for protein structure and function prediction. Modeling parameters were set as default and the three-dimensional models were built using the three-dimensional structure of chicken uncleaved ovalbumin as the template (Protein Data Bank Code :10VA). Right panel: schematic representation of the three-dimensional structure of ovalbumin (A), of OVAY model (**B**), and OVAX model (**C**). Left panel: electrostatic distribution of positive charges (folue) and negative charges (red). The predicted heparin-binding domain of OVAX is indicated with a blue circle.

explained by multiple deviations in the hinge region of the reactive center loop compared with the consensus sequence for inhibitory serpins. This consensus sequence consists of Glu at P17, Glu/Lys/Arg at P16, Gly at P15, Thr/Ser at P14, small aliphatic residues (Ala/Gly/Ser) at P12–P9, and Thr/Ser at P8, according to the nomenclature of Schechter and Berger [46]. The analysis of the OVAX and OVAY hinge region sequences reveals that of these two related proteins, OVAY would be a more likely candidate to inhibit serine proteases (Fig. 2). In this respect, OVAX was shown to lack inhibitory activity against proteases [12]. The specificity Lys-His (K-H, Fig. 2) of the reactive site for OVAY suggests that OVAY could inhibit trypsin-like proteases.

The crystal structure of ovalbumin has been solved in 1990 [40, 47]. As expected, it adopts the classical serpin conformation. The analysis of the distribution of electrostatic charges in the ovalbumin structure, OVAX model [12], and OVAY model (S. Beauclercq, unpublished results) reveals the presence of a positively charged domain at the surface of OVAX molecule, in contrast to ovalbumin and OVAY (Fig. 3). This specific region is supposed to be responsible for the heparin-binding properties of OVAX [12].

S-Ovalbumin

Interestingly enough, during storage of eggs [48], during incubation [49], or in vitro, under alkaline conditions [50], the native ovalbumin form is converted into a thermostabilized conformer called S-ovalbumin. The latter undergoes chemical inversion of some serine residues as well as some slight conformational changes, which decrease the accessibility of part of the hydrophobic core of the molecule, giving some thermodynamical advantage and higher stability to the molecule [51, 52]. To date, we do not know whether OVAY and OVAX are similarly modified during storage or incubation.

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION

Although ovalbumin has been identified more than a century ago and despite the numerous studies that have been conducted to characterize the physicochemical and structural properties of this molecule, we still speculate about its physiological function in egg white. Proteomic studies performed on the egg white at different stages of embryonic growth did not reveal any significant alteration of ovalbumin during incubation although some degradation products as well as protein-protein complexes have been identified [11]. The current hypothesis is that ovalbumin serves as a source of amino acids for the developing embryo. Indeed, from the 11th day of incubation onward, the egg white migrates to the amniotic fluid to be orally absorbed by the embryo. Before absorption by the embryo, egg white proteins are likely to be protected from proteolysis thanks to the highly concentrated active protease inhibitors present in the egg white (ovomucoid, ovoinhibitor, ovostatin, and cystatin [53]). We still do not know whether egg white proteins are altered or activated within the gastrointestinal tract of the embryo once they are swallowed. In vitro proteolysis of ovalbumin has revealed new biological activities for the digestion products, including antibacterial, antihypertensive, and antioxidant properties [43, 54-57]. Therefore, ovalbumin might play a role during late embryogenesis within the embryo or in the other egg compartments (yolk sac) [49, 58, 59].

The role of OVAY has not been explored yet but some have shown that its abundance was affected during incubation [9, 11] and that it was associated with fertilized eggs. Indeed, various protein spots corresponding to partly proteolyzed (or possibly activated) OVAY showed more than a 10-fold increase (P < 0.01) in abundance in freshly laid fertilized chicken egg whites compared with unfertilized egg whites [10]. Because OVAY has been predicted to inhibit serine proteases with trypsin-like specificities, the identification of its physiological protease(s) if any, for example, acrosomal proteases from spermatozoa or vitelline membrane proteases such as ovochymase [29, 60], might be helpful to better appreciate the biological significance of these findings. Indeed, protein C inhibitor/SERPINA5, a serpin-inhibiting trypsin-like protease has been suggested to protect human spermatozoa against premature acrosome reaction and degradation, thereby modulating the acrosin activity so that it can coincide with binding to the oocyte [61]. Similarly, plasminogen activator inhibitor 1/ SERPINB2 has been shown to bind mammalian spermatozoa [62] and has been proposed to preserve the oocyte/embryo

Article 71

from degradation and/or extracellular matrix remodeling of both oviduct and early cleavage-stage embryo [63]

Considering OVAX, it was shown to exhibit antimicrobial activities against at least two pathogens, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* enteritidis via its heparinbinding domain (positively charged domain) [12] (Fig. 3). These activities suggest a role for OVAX at least in egg defense. A similar function has been proposed for heparinbinding serpins such as protein C inhibitor/SERPINA5 [64] and heparin cofactor II/SERPIND1 [65] along with their major role in coagulation and/or fertilization processes. Potential cellular activities of OVAX should also be mentioned because OVAX makes up a fraction of egg white proteins exhibiting proliferative activities [66] and because many growth factors are heparin-binding proteins (e.g., fibroblast growth factor, epidermal growth factor).

CONCLUSION

Ovalbumin, OVAY, and OVAX, although highly similar in their primary sequence, exhibit distinct and subtle physicochemical and structural differences that might be associated with specific function. However, there is to date a lack of information regarding the biological activities of all three proteins. Serpins play multiple physiological roles in many species, and some have evolved in order to acquire new functions distinct from protease inhibition, such as cell adhesion and migration [67], angiogenesis [68] neuronal development [69], and blood pressure regulation [70]. The fact that egg white is orally absorbed by the embryo from the 11th day of incubation onward, together with the relative stability in abundance of these proteins in egg white during early embryogenesis, suggests that they might have a role later within the embryo or in extraembryonic fluids as native molecules or as activated peptides. This remark is particularly relevant considering the increasing data about the activity of ovalbumin proteolytic products (e.g., antihypertensive, antioxidant). To conclude, the physiological activity of egg white ovalbumin, OVAY, and OVAX remains an open question.

REFERENCES

- Hofmeister F. Ueber die darstellung von krystallisirtem eieralbumin und die krystallisirbarkeit colloider stoffe [in German]. Z Physiol Chem 1890; 14:165–172.
- Osborne TB, Campbell GF. The protein constituents of egg white. J Am Chem Soc 1900; 22:422–450.
- Hunt LT, Dayhoff MO. A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha 1-proteinase inhibitor. Biochem Biophys Res Commun 1980; 95:864–871.
- Remold-O'Donnell E. The ovalbumin family of serpin proteins. FEBS Lett 1993; 315:105-108.
- Royal A, Garapin A, Cami B, Perrin F, Mandel JL, LeMeur M, Bregegegre F, Gannon F, LePennec JP, Chambon P, Kourilsky P. The ovalbumin gene region: common features in the organisation of three genes expressed in chicken oviduct under hormonal control. Nature 1979; 279:125-132.
- Heilig R, Muraskowsky R, Kloepfer C, Mandel JL. The ovalbumin gene family: complete sequence and structure of the Y gene. Nucleic Acids Res 1982; 10:4363–4382.
- Heilig R, Perrin F, Gannon F, Mandel JL, Chambon P. The ovalburnin gene family: structure of the X gene and evolution of duplicated split genes. Cell 1980; 20:625–637.
- Guerin-Dubiard C, Pasco M, Molle D, Desert C, Croguennec T, Nau F. Proteomic analysis of hen egg white. J Agric Food Chem 2006; 54: 3901–3910.
- Liu Y, Qiu N, Ma M. Comparative proteomic analysis of hen egg white proteins during early phase of embryonic development by combinatorial peptide ligand library and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight. Poult Sci 2013; 92:1897–1904.
- 10. Qiu N, Liu W, Ma M, Zhao L, Li Y. Differences between fertilized and

6

unfertilized chicken egg white proteins revealed by 2-dimensional gel electrophoresis-based proteomic analysis. Poult Sci 2013; 92:782-786.

- Qiu N, Ma M, Cai Z, Jin Y, Huang X, Huang Q, Sun S. Proteomic analysis of egg white proteins during the early phase of embryonic development. J Proteomics 2012; 75:1895–1905.
- Rehault-Godbert S, Labas V, Helloin E, Herve-Grepinet V, Slugocki C, Berges M, Bourin MC, Brionne A, Poirier JC, Gautron J, Coste F, Nys Y. Ovalbumin-related protein X is a heparin-binding ov-serpin exhibiting antimicrobial activities. J Biol Chem 2013; 288:17285–17295.
- Doel MT, Houghton M, Cook EA, Carey NH. The presence of ovalbumin mRNA coding sequences in multiple restriction fragments of chicken DNA. Nucleic Acids Res 1977; 4:3701–3713.
- Benarafa C, Remold-O'Donnell E. The ovalbumin serpins revisited: perspective from the chicken genome of clade B serpin evolution in vertebrates. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102:11367–11372.
- Tian X, Gautron J, Monget P, Pascal G. What makes an egg unique? Clues from evolutionary scenarios of egg-specific genes. Biol Reprod 2010; 83: 893–900.
- Cunningham F, Ridwan Amode M, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, Carvalho-Silva D, Clapham P, Coates G, Fitzgerald S, Gil L, Girón CG, et al. Ensembl 2015. Nucl Acids Res 2015; 43:D662–D669.
 Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R,
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Mol Syst Biol 2011; 7:539.
 Sugimoto Y, Sanuki S, Ibrahim HR, Aoki T, Kusakabe T, Koga K.
- Sugimoto Y, Sanuki S, Ibrahim HR, Aoki T, Kusakabe T, Koga K. Occurrence of ovalbumin in ovarian yolk of chicken during oogenesis. Biochim Biophys Acta 2001; 1526:1–4.
- Swaneck GE, Nordstrom JL, Kreuzaler F, Tsai MJ, O'Malley BW. Effect of estrogen on gene expression in chicken oviduct: evidence for transcriptional control of ovalbumin gene. Proc Natl Acad Sci U S A 1979; 76:1049–1053.
- Dougherty DC, Park HM, Sanders MM. Interferon regulatory factors (IRFs) repress transcription of the chicken ovalbumin gene. Gene 2009; 439:63–70.
- Palmiter RD, Wrenn JT. Interaction of estrogen and progesterone in chick oviduct development. 3. Tubular gland cell cytodifferentiation. J Cell Biol 1971; 50:598–615.
- Colbert DA, Knoll BJ, Woo SL, Mace ML, Tsai MJ, O'Malley BW. Differential hormonal responsiveness of the ovalburnin gene and its pseudogenes in the chick oviduct. Biochemistry 1980; 19:5586–5592.
- LeMeur M, Glanville N, Mandel JL, Gerlinger P, Palmiter R, Chambon P. The ovalbumin gene family: hormonal control of X and Y gene transcription and mRNA accumulation. Cell 1981; 23:561-571.
- Knoll BJ, Woo SL, Beattie W, O'Malley BW. Identification and sequence analysis of the 5' domain of the X and Y pseudo-ovalbumin genes. J Biol Chem 1981; 256:7949–7953.
- Farinazzo A, Restuccia U, Bachi A, Guerrier L, Fortis F, Boschetti E, Fasoli E, Citterio A, Righetti PG. Chicken egg yolk cytoplasmic proteome, mined via combinatorial peptide ligand libraries. J Chromatogr A 2009; 1216:1241–1252.
- Mann K, Mann M. The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. Proteomics 2008; 8:178–191.
- D'Ambrosio C, Arena S, Scaloni A, Guerrier L, Boschetti E, Mendieta ME, Citterio A, Righetti PG. Exploring the chicken egg white proteome with combinatorial peptide ligand libraries. J Proteome Res 2008; 7: 3461–3474.
- Mann K. The chicken egg white proteome. Proteomics 2007; 7: 3558–3568.
- Mann K. Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. Proteomics 2008; 8:2322–2332.
- Mann K, Macek B, Olsen JV. Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer. Proteomics 2006; 6: 3801–3810.
- Nau F, Pasco M, Desert C, Molle D, Croguennec T, Guerin-Dubiard C. Identification and characterization of ovalbumin gene Y in hen egg white. J Agric Food Chem 2005; 53:2158–2163.
- Kim J, Choi YH. Differential abundance of egg white proteins in laying hens treated with corticosterone. J Agric Food Chem 2014; 62: 12346-12359.
- Wang J, Liang Y, Omana DA, Kav NN, Wu J. Proteomics analysis of egg white proteins from different egg varieties. J Agric Food Chem 2012; 60: 272–282.
- Schroder HC, Messer R, Breter HJ, Muller WE. Evidence for agedependent impairment of ovalbumin heterogeneous nuclear RNA (HnRNA) processing in hen oviduct. Mech Ageing Dev 1985; 30: 319-324.

Article 71

CHICKEN EGG OVALBUMINS

- Gagnon J, Palmiter RD, Walsh KA. Comparison of NH2-terminal sequence of ovalbumin as synthesized in vitro and in vivo. J Biol Chem 1978; 253:7464–7468.
- Palmiter RD, Gagnon J, Walsh KA. Ovalbumin: a secreted protein without a transient hydrophobic leader sequence. Proc Natl Acad Sci U S A 1978; 75:94–98.
- Lingappa VR, Lingappa JR, Blobel G. Chicken ovalbumin contains an internal signal sequence. Nature 1979; 281:117–121.
- Robinson A, Meredith C, Austen BM. Isolation and properties of the signal region from ovalbumin. FEBS Lett 1986; 203:243-246.
 Kiemer L, Bendtsen JD, Blom N. NetAcet: prediction of N-terminal
- Kiemer L, Bendtsen JD, Blom N. NetAcet: prediction of N-terminal acetylation sites. Bioinformatics 2005; 21:1269–1270.
- Stein PE, Leslie AG, Finch JT, Carrell RW. Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 A resolution. J Mol Biol 1991; 221:941–959.
- Tai T, Yamashita K, Ogata-Arakawa M, Koide N, Muramatsu T, Iwashita S, Inoue Y, Kobata A. Structural studies of two ovalbumin glycopeptides in relation to the endo-beta-N-acetylglucosaminidase specificity. J Biol Chem 1975; 250:8569–8575.
- Ito K, Ishimaru T, Kimura F, Matsudomi N. Importance of Nglycosylation positioning for secretion and folding of ovalbumin. Biochem Biophys Res Commun 2007; 361:725–731.
- Hirose J, Doi Y, Kitabatake N, Narita H. Ovalbumin-related gene Y protein bears carbohydrate chains of the ovomucoid type. Biosci Biotechnol Biochem 2006; 70:144–151.
 Henderson JY, Moir AJ, Fothergill LA, Fothergill JE. Sequences of
- Henderson JY, Moir AJ, Fothergill LA, Fothergill JE. Sequences of sixteen phosphoserine peptides from ovalbumins of eight species. Eur J Biochem 1981; 114:439–450.
- 45. Silverman GA, Whisstock JC, Askew DJ, Pak SC, Luke CJ, Cataltepe S, Irving JA, Bird PI. Human clade B serpins (ov-serpins) belong to a cohort of evolutionarily dispersed intracellular proteinase inhibitor clades that protect cells from promiscuous proteolysis. Cell Mol Life Sci 2004; 61: 301–325.
- Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. Biochem Biophys Res Commun 1967; 27:157–162.
- Stein PE, Leslie AG, Finch JT, Turnell WG, McLaughlin PJ, Carrell RW. Crystal structure of ovalburnin as a model for the reactive centre of serpins. Nature 1990; 347:99–102.
- Huang Q, Qiu N, Ma MH, Jin YG, Yang H, Geng F, Sun SG. Estimation of egg freshness using S-ovalbumin as an indicator. Poult Sci 2012; 91: 739–743.
- Sugimoto Y, Sanuki S, Ohsako S, Higashimoto Y, Kondo M, Kurawaki J, Ibrahim HR, Aoki T, Kusakabe T, Koga K. Ovalbumin in developing chicken eggs migrates from egg white to embryonic organs while changing its conformation and thermal stability. J Biol Chem 1999; 274: 11030–11037.
- Yamamoto H, Takahashi N, Yamasaki M, Arii Y, Hirose M. Thermostabilization of ovalbumin by an alkaline treatment: examination for the possible implications of an altered serpin loop structure. Biosci Biotechnol Biochem 2003; 67:830–837.
- Yamasaki M, Takahashi N, Hirose M. Crystal structure of S-ovalbumin as a non-loop-inserted thermostabilized serpin form. J Biol Chem 2003; 278: 35524–35530.
- Takahashi N, Onda M, Hayashi K, Yamasaki M, Mita T, Hirose M. Thermostability of refolded ovalbumin and S-ovalbumin. Biosci Biotechnol Biochem 2005; 69:922–931.
- Saxena I, Tayyab S. Protein proteinase inhibitors from avian egg whites. Cell Mol Life Sci 1997; 53:13–23.
- Miguel M, Aleixandre A. Antihypertensive peptides derived from egg proteins. J Nutrition 2006; 136:1457–1460.

- 55. Fujita H, Sasaki R, Yoshikawa M. Potentiation of the antihypertensive activity of orally administered ovokinin, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification in egg phosphatidylcholine. Biosci Biotechnol Biochem 1995; 59:2344–2345.
- Pellegrini A, Hulsmeier AJ, Hunziker P, Thomas U. Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity. Biochim Biophys Acta 2004; 1672:76–85.
- Davalos A, Miguel M, Bartolome B, Lopez-Fandino R. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. J Food Prot 2004; 67:1939–1944.
- Sugimoto Y, Saito A, Kusakabe T, Hori K, Koga K. Flow of egg white ovalbumin into the yolk sac during embryogenesis. Biochim Biophys Acta 1989; 992:400-403.
- Yoshizaki N, Ito Y, Hori H, Saito H, Iwasawa A. Absorption, transportation and digestion of egg white in quail embryos. Dev Growth Differ 2002; 44:11-22.
- 60. Lindsay LL, Wieduwilt MJ, Hedrick JL. Oviductin, the Xenopus laevis oviductal protease that processes egg envelope glycoprotein gp43, increases sperm binding to envelopes, and is translated as part of an unusual mosaic protein composed of two protease and several CUB domains. Biol Reprod 1999; 60:989–995.
- Elisen MG, van Kooij RJ, Nolte MA, Marquart JA, Lock TM, Bouma BN, Meijers JC. Protein C inhibitor may modulate human sperm-oocyte interactions. Biol Reprod 1998; 58:670–677.
 Manske M, Welte B, Hitschke K, Wack A, Bade EG. Plasminogen
- Manske M, Welte B, Hitschke K, Wack A, Bade EG. Plasminogen activator inhibitor type 1 in rat spermatozoa: localisation in the tail, in the acrosome and on the surface of the head. Zygote 1994; 2:243–252.
 Kouba AJ, Burkhardt BR, Alvarez IM, Goodenow MM, Buhi WC.
- 63. Kouba AJ, Burkhardt BR, Alvarez IM, Goodenow MM, Buhi WC. Oviductal plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): mRNA, protein, and hormonal regulation during the estrous cycle and early pregnancy in the pig. Mol Reprod Dev 2000; 56:378–386.
- Malmstrom E, Morgelin M, Malmsten M, Johansson L, Norrby-Teglund A, Shannon O, Schmidtchen A, Meijers JC, Herwald H. Protein C inhibitor-a novel antimicrobial agent. PLoS Pathog 2009; 5:e1000698.
- Kalle M, Papareddy P, Kasetty G, Tollefsen DM, Malmsten M, Morgelin M, Schmidtchen A. Proteolytic activation transforms heparin cofactor II into a host defense molecule. J Immunol 2013; 190:6303–6310.
- 66. Lee A, Molloy MP, Baker MS, Kapur A. Tandem ion exchange fractionation of chicken egg white reveals the presence of proliferative bioactivity. J Agric Food Chem 2013; 61:4079–4088.
- Endsley MP, Hu Y, Deng Y, He X, Warejcka DJ, Twining SS, Gonias SL, Zhang M. Maspin, the molecular bridge between the plasminogen activator system and beta1 integrin that facilitates cell adhesion. J Biol Chem 2011; 286:24599–24607.
- Chuderland D, Ben-Ami I, Bar-Joseph H, Shalgi R. Role of pigment epithelium-derived factor in the reproductive system. Reproduction 2014; 148:R53–R61.
- Lee TW, Montgomery JM, Birch NP. The serine protease inhibitor neuroserpin regulates the growth and maturation of hippocampal neurons through a non-inhibitory mechanism. J Neurochem 2012; 121:561–574.
- Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotsou M, Coffman TM. Classical renin-angiotensin system in kidney physiology. Compr Physiol 2014; 4: 1201–1228.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 2007; 23:2947–2948.
- Boxshade. Hofmann K, Baron M, Schirmer H; 1997. http://www.ch. embnet.org/software/BOX_form.html. Accessed 10 April 2015.

Article 71

Annexe 4 : Deuxième revue

Seminars in Cell & Developmental Biology 62 (2017) 120-132



Contents lists available at ScienceDirect

Seminars in Cell & Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/semcdb

Review

Egg serpins: The chicken and/or the egg dilemma



Clara Dombre^{a,b,c,d}, Nicolas Guyot^e, Thierry Moreau^f, Philippe Monget^{a,b,c,d}, Mylène Da Silva^e, Joël Gautron^e, Sophie Réhault-Godbert^{e,}

^a INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

^b CNRS, UMR6175 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France ^c Université François Rabelais de Tours, F-37041 Tours, France

d IFCE, F-37380 Nouzilly, France

^e INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France

^f CEPR, UMR INSERM U1100, Faculté de Médecine, Université de Tours, 10 Bd. Tonnellé, F-37032 Tours Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history: Received 15 March 2016 Received in revised form 22 June 2016 Accepted 22 August 2016 Available online 24 August 2016

Keywords: Serpins Birds Egg formation Reproduction Development

ABSTRACT

Twenty-seven serpins belonging to clade A, B, C, D, E, F, G, H and I serpins are currently referenced in chicken genome databases. Phylogenetic analysis of chicken serpins revealed that ovalbumin (Serpinb14) and its paralogs ovalbumin-related protein Y (Serpinb14b) and ovalbumin-related protein X (Serpinb14c) are found in bird species. These clade B serpins are specifically expressed in reproductive tissues and exported in the egg where they constitute major protein components. These data suggest that these three paralogs have probably appeared in birds to face new environments and ensure the extra-uterine development of an embryo in a shell egg. Twelve other serpins have been identified in the newly produced egg, some of them having a specific distribution in the respective egg structures (eggshell, egg white, vitelline membrane and egg yolk). The physiological role of these egg serpins remain largely unexplored, but there is increasing evidence in literature or by homologies with their mammalian counterparts, that some of them participate in cell proliferation, tissue remodeling and/or angiogenesis associated with folliculogenesis and development of extraembryonic structures, eggshell biomineralization, egg defense and nutrition of the embryo. A better knowledge of the phylogenetic evolution of these 15 serpins in other oviparous species, on their egg distribution, on their regulation during embryonic development (activation/degradation/transfer) and on their functional specificity, is needed to better appreciate their role and their bird-specificity. These review shed light on the multiple possibilities that offer the avian egg model to study the role of serpins in reproduction and developmental biology.

© 2016 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Contents

1.	Evolu	ution and distribution of egg serpins	
	1.1.	Phylogenetic analysis of chicken serpins	
	1.2.	Tissue distribution in chicken (the chicken and/or the egg question)	
2.	Egg s	serpins: an update	
	2.1.	Biological significance of egg volk serbins.	
	2.2.	Vitelline membrane servins: a predicted role in folliculogenesis, defense and angiogenesis	
	2.3.	Egg white serpins: a role in nutrition and defense. What else?	
	2.4.	Eggshell serpins as regulators of biomineralization process	
	2.5.	Serpins in extraembryonic tissues.	130
		2.5.1. Amniotic fluid	

http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.08.019

Abbreviations: ACC, amorphous calcium carbonate; CAM, chorioallantoic membrane; ESM, eggshell membrane; OVAX, ovalbumin-related protein X; OVAY, ovalbuminrelated protein Y.

Corresponding author at: INRA Centre Val de Loire, UR83 Recherches Avicoles-Function and Regulation of Egg Proteins, 37380 Nouzilly, France. E-mail address: srehault@tours.inra.fr (S. Réhault-Godbert).

^{1084-9521/© 2016} The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/ 4.0/)

	2.5.2.	Chorioallantoic membrane and allantoic fluid	
	2.5.3.	Eggshell membranes	
	2.5.4.	Yolk and yolk sac	
3.	Conclusions	-	
	Conflict of inte	rest	
	Acknowledger	nents	
	References		

1. Evolution and distribution of egg serpins

Systematic analysis of National Center for Biotechnology Information and chicken Ensembl databases for identifying serpins in chicken species revealed the presence of 27 members of this family (Table 1, Fig. 1). Among these, 16 serpins are still predicted and have been referenced in databases by automated computational analysis of genomic chicken sequences annotated using gene prediction methods, which sometimes can lead to discrepancies between gene and protein names (as an example, Serpinb2 gene corresponds to a predicted Serpinb10 protein, Table 1). However, the relevance of 5 of them have been recently validated, as serpins a8, c1, d1 and f1 were unambiguously identified in the egg (see $\S1.2$). Thus, 11 of the serpins identified to date from genome analysis, need further validation and the information available about their physiological functions is therefore very partial, even inexistent. Surprisingly enough, Serpine1 was not identified in this analysis. To investigate whether Serpine1 exists as a pseudogene in chicken or whether it was not annotated correctly in databases, Serpine1 was searched in the chicken genome using reciprocal tBLASTn. The serpin was not found and the closest gene identified by reciprocal tBLASTn against human genome referred to SERPINE2, which was actually identified in both Pubmed and Ensembl databases and referenced in Table 1. Thus, to date, we cannot ascertain that this gene is absent due to errors in genome annotation or whether it actually disappeared in chickens during evolution. Chicken ov-serpins are largely represented as 10 clade B serpins could be identified [1,2]. These ov-serpins are clustered on a 150 kb locus chromosome 2q (Fig. 1B) and comprise Serpinb1, Serpinb2, Serpinb5, Serpinb6, two Serpinb10 homologs (Serpinb10, Serpinb10b/MENT), Serpinb12 and Serpinb14, Serpinb14b and Serpinb14c namely ovalbumin and its related genes Y (OVAY) and X (OVAX). Another cluster on chromosome 5 was identified containing 7 members of the Serpina family (Fig. 1E). This cluster includes 5 homologs of alpha1-antitrypsin/alpha1-proteinase inhibitors, Serpina1, Serpina3, Serpina4, Serpina5, Serpina9, which correspond to human antitrypsin, alpha1-antichymotrypsin, kallistatin, Protein C inhibitor, and SERPINA9, respectively. Out of these 27 serpins, only 15 are actually recovered in the chicken egg in which the biological significance and biological activity intimately depends on the process of egg formation and on their subsequent localization (eggshell/egg white/vitelline membrane/yolk). This first part will review the evolution of these chicken serpins in vertebrate species and their distribution in the various egg compartments.

1.1. Phylogenetic analysis of chicken serpins

In serpin genes, some have shown a strong correlation between genomic organization, patterns of amino acids at specific sites, and insertion/deletion patterns, which contributed to identify serpin groups and to decipher vertebrate serpin evolution [3,4]. Serpin genes have rapidly evolved; a high sequence divergence is found between all serpin clades, the sequence identity varying from 22% to 29%.

Phylogenetic analysis of the 27 serpins found in the chicken genome shows that serpin genes have been originated and duplicated before the divergence of teleosteans. Another duplication event occurred after divergence between species, for example, the clade A of *Gallus gallus* encompasses seven *Serpina* genes with a sequence identity around 47%. The same phenomenon is observed for mammal and fish.

Using the phylogenetic trees available in Ensembl (http://www.ensembl.org), and because of the stringency of the method used, three serpins groups are distinguished. The first phylogenetic tree contains serpins from clade B, C, E and I (Fig. 2), the second refers to serpins from clade A, D, F, G and H (Fig. 3), and the last tree, contains only one clade A serpin, *Serpina8*.

The clade B serpin, present in the first tree, contains ovalbumin gene (Serpinb14) and its recently duplicated OVAY (Serpinb14b) and OVAX (Serpinb14c) [5-7]. OVAX, is not annotated in Ensembl but by using reciprocal tBLASTn alignment method (http://blast. ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), this gene could be easily identified as the closest neighbor of OVAY in chromosome 2 with a 73% of protein sequence identity as previously shown [1,2]. The evolution of clade B serpins starts before the split of bony fishes and tetrapods, 450 millions years ago, leading to at least six clade B serpin genes found in mammal and bird genomes. The G. gallus genome contains ten clade B serpin genes on chromosome 2 in the same syntenic locus (Figs. 1 and 2). Six of them could also be found in Homo sapiens genome (SERPINB1, B2, B5, B6, B10, B12). Chicken clade B serpins (Figs. 1 and 2) are syntenic with two loci on chromosome 6 and 18 in human and other mammalian genomes, which suggests a split resulting to a break of synteny in mammals [2]. Recent duplications events occurred independently in fishes, mammals and birds, after divergence between these species. Due to recent duplication, avian Serpinb14 (ovalbumin), Serpinb14b (OVAY) and Serpinb14c (OVAX), have no human or other mammalian species orthologues and seem to be specific to oviparous species [1,8,9]. Three orthologues to ovalbumin are referenced in duck, flycatcher and turkey in Ensembl database but information is lacking for other oviparous species. However, it is noteworthy that we found a potential orthologous of Serpinb14c in Alligator mississippiensis (A0A0Q3ZV65), sharing 56% protein sequence identity with the chicken homolog. These ovalbumin genes adapted to oviparous species, are supposed to have lost their protease inhibitor activity [1], and potentially acquired specific properties adapted to the development of an embryo in an egg exposed to terrestrial environments [8,9].

Clade A, D, F, G and H serpins are found in the second phylogenetic tree. As shown in Fig. 3, except clade A serpins, each of these serpins has an orthologue in both *G. gallus* and *Bos taurus*.

Similarly to clade B serpins, and for both species (*G. gallus*; *B. taurus*), duplication events led to the presence of several clade A serpins after species divergence (Fig. 4). Concerning *G. Gallus* genome, this duplication gave rise to Serpina1, a3, a4, a5, a9, a10 and a12. These serpins have similar peptidase inhibitor function and are essentially expressed by the liver. The synteny analysis (http://www.genomicus.biologie.ens.fr/)reveals that clade A genes are localized in a gene cluster in chicken chromosome 5 (Fig. 3). The same phenomenon is observed in *B. Taurus*, where all clade A serpins are localized in a unique gene cluster on chromosome 21. Clade A serpins show multiple recent duplications leading to ten

A. Chromosome 1: 169,314,156-169,437,377/194,273,709-194,367,705

Serpine3 ► ENSGAL00000017016 ►	Serpinh1	
<aadn03001259.1< th=""><th><aadn03001< th=""><th>452.1</th></aadn03001<></th></aadn03001259.1<>	<aadn03001< th=""><th>452.1</th></aadn03001<>	452.1
INTS6	RPS3	FCHSD2

B. Chromosome 2: 67,605,721-68,022,782-Chicken Clade B serpins

WRNIP1		VPS4B ►	KDSR - BCL2 -	-
	<aadn0300< th=""><th>)2201</th><th></th><th></th></aadn0300<>)2201		
MyLK4	 ✓ Serpinb1 ✓ Serpinb2 ✓ Serpinb6 ✓ Serpinb10 ✓ Serpinb10 ✓ Serpinb10 ✓ Serpinb10b ✓ Serpinb10b 	Serpinb12 Serpinb5 Ib inb14c		

C. Chromosome 3: 39,710,086-639,884,651

D. Chromosome 8: 7,311,755-7,430,238

COG2 ►		RC3H1 ►	Serpinc1 ►	
<aadn03003334.1< td=""><td></td><td></td><td><aadn03005691.1< td=""><td></td></aadn03005691.1<></td></aadn03003334.1<>			<aadn03005691.1< td=""><td></td></aadn03005691.1<>	
▲ Serpi	ina8		L.	ZBTB37

F. Chromosome 9:7,770814-7,860,071/20,010,493-20,102,119

AADN03005754.1 ► ENSGALG00000009468 ► Serpini1	ENSGALG00000028364 ► <aadn03005879.1 ₩WDFY1 Serpine2</aadn03005879.1
E. Chromosome 5:44,767,283-44,957,645	
AADN03004573.1	
G. Chromosome 15: 23,698-165,087	H. Chromosome 19: 5,378,317-5,465,204
P14KA ► <aadn03007039.1< td=""><td>Serpinf2 Serpinf1 RPA1 <aadn03007689.1< td=""></aadn03007689.1<></td></aadn03007039.1<>	Serpinf2 Serpinf1 RPA1 <aadn03007689.1< td=""></aadn03007689.1<>
CLTCL1	✓ SMYD4

Fig. 1. Chromosome localization of chicken serpins. Serpins and flanking genes with their respective orientation (backward/forward) are drawn to scale. Assignment of gene names was established based on Ensembl database information or by comparison with human orthologs. The name *MENT* (Gene ID: 1017749622) has been replaced by *Serpinb10* in accordance with [1], based on the high sequence identity of *Serpinb10* and *Serpinb10b*, suggesting that they are paralogs. Accession numbers are indicated in Table 1. With the exception of *Serpinb14c*, all genes were found in Ensembl database.

Table 1

Chicken serpins. Analysis of Pubmed database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) using "serpin" and "gallus" as key words in "Protein" database resulted in 93 proteins hits; whereas using "serpin" to search related proteins in Chicken Ensembl database (http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/) gave 83 hits (01-18-2016). Manual compilation and integration of results by removing redundancy to keep only gene IDs resulted in a total of 27 distinct serpin genes.

Protein Name [Gallus gallus]	Protein accession number	Gene symbol	Gene ID	Gene accession number
serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase,	NP_001264422.1	Serpina1	423434	ENSGALG00000023070
antitrypsin), member 1 precursor				
PREDICTED: protein Z-dependent protease inhibitor	XP_015143253.1	Serpina10	423432	ENSGALG00000020391
PREDICTED: serpin A3-4-like isoform X1	XP_015143255.1	Serpina12	107049127	ENSGALG00000028598
PREDICTED: alpha-1-antiproteinase	XP_015143260.1	Serpina3	772339	ENSGALG00000020388
serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase,	NP_001264421.1	Serpina4	423433	ENSGALG00000010969
antitrypsin), member 4 precursor				
PREDICTED: alpha-1-antitrypsin isoform X1	XP_421344.1	Serpina5	423435	ENSGALG00000020390
PREDICTED: angiotensinogen	XP_004935550.1	Serpina8	421543	ENSGALG00000011117
PREDICTED: alpha-1-antitrypsin	XP_004941955.1	Serpina9	423436	ENSGALG00000020389
PREDICTED: leukocyte elastase inhibitor isoform X1	XP_015137679.1	Serpinb1	420894	ENSGALG00000019555
PREDICTED: heterochromatin-associated protein MENT	XP_004939740.1	Serpinb10	101749622	ENSGALG00000019554
heterochromatin-associated protein MENT	073790.1	Serpinb10b	395715	ENSGALG00000019553
PREDICTED: serpin B12	XP_418985.2	Serpinb12	420899	ENSGALG00000012872
ovalbumin	AAB59956.1	Serpinb14	396058	ENSGALG00000012869
ovalbumin-related Y	NP_001026172	Serpinb14b	420897	ENSGALG00000019551
ovalbumin-related protein X	AGN32861.1	Serpinb14c	420898	NM_001276386.1
PREDICTED: serpin B10	XP_418982.1	Serpinb2	420896	ENSGALG00000019552
PREDICTED: serpin B5	XP_418986.3	Serpinb5	420900	ENSGALG00000012873
serpin B6	NP_001006377.1	Serpinb6	420895	ENSGALG00000012866
PREDICTED: antithrombin-III	XP_422282.3	Serpinc1	424440	ENSGALG0000004591
PREDICTED: heparin cofactor 2	XP_001232767.1	Serpind1	395877	ENSGALG0000001396
SERPINE2 serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen	E1BWU2	Serpine2	424805	ENSGALG0000005135
activator inhibitor type 1), member 2				
PREDICTED: serpin E3	XP_015131346.1	Serpine3	418875	ENSGALG00000017017
PREDICTED: pigment epithelium-derived factor isoform X1	NP_001244218.1	Serpinf1	417561	ENSGALG00000003015
serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment	XP_015151529.1	Serpinf2	100857105	ENSGALG0000002987
epithelium derived factor), member 2				
plasma protease C1 Inhibitor Precursor	XP_003641424.1	Serping1	423132	ENSGALG0000007381
PREDICTED: serpin H1 isoform X1	XP_015136453.1	Serpinh1	396228	ENSGALG00000011214
neuroserpin precursor	NP_001004411.1	Serpinh1	425002	ENSGALG0000009470

Serpina (Serpina1, a3, a4, a5, a6, a7, a10, a11, a12, a14). Six of them belong to the subgroup of Serpina3 (Serpina 3-1, a3-5, a3-6, a3-7, a3-7-like, a3-8), and share almost 70% of identity with human SER-PINA3 members [10]. The synteny analysis of clade A serpins for *B. taurus* shows the presence of a gene cluster in chromosome 21, similar to the cluster on chromosome 5 found in *G. gallus*. In both *G. gallus* and *B. taurus* loci, serpins from clade A are localized in the same syntenic locus.

In the third phylogenetic tree, only *S Serpina8* is present and could be found in all species. In contrast to the recent publication where authors used synteny and signature sequences to analyse *Serpina8* gene in other species [11], Ensembl phylogenetic tools reveals that the duplication of *Serpina8* occurred before divergence of teleosteans. This serpin has also diverged rapidly as opposed to the other serpins. Compared with other clade A inhibitory serpins, this SERPINA8 also named angiotensinogen has a very specific role in vertebrates, in that it is proteolytically processed by renin to generate angiotensin I, which is further trimmed into vasoactive angiotensin II that regulates blood pressure.

To conclude, serpins have been duplicated before the divergence of teleostean giving rise to 16 clades (from A to P) [12,13]. Nine clades are present in the avian genome and two of them (clade A and B) have been recently duplicated leading, among others, to ovalbumin, OVAX and OVAY, which are specific to bird species. A better understanding of the function of these proteins is necessary to highlight the reason of their duplication and specificity.

1.2. Tissue distribution in chicken (the chicken and/or the egg question)

There is very few information on the expression and biological activities of chicken serpins. Chickens, by homology with mammals are expected to express serpins at a basal state to ensure basic biological processes such as coagulation/hemostasis (PRE-DICTED: angiotensinogen, Plasma Protease C1 Inhibitor Precursor, PREDICTED: antithrombin-III, PREDICTED: heparin cofactor 2), cell proliferation (SERPINB5) although controversial [14], inflammation (PREDICTED: leukocyte elastase inhibitor), etc. At sexual maturity of the pullets, the secretion of ovarian steroid hormones by the theca of the growing follicle triggers the development and differentiation of the hen oviduct. This development is concomitant with the formation of the first egg that will contain nutrients and bioactive proteins to support embryonic development <a>[15]. The formation of chicken egg is a spatial and temporal process that relies on the ovary (site of sex steroid synthesis, gametogenesis and yolk formation) and the oviduct, which receipts the ovulated mature yolk and where the white, the shell membranes and the shell are successively deposited in very specialized regions, the magnum, the isthmus and the uterus/vagina, respectively (Fig. 5) [15]. Analyses and integration of the various proteomic data published on the cuticle/eggshell, egg white, vitelline membrane and egg yolk revealed the presence of 15 serpins in the freshly laid egg [16-28] (Fig. 5). The eggshell contains 14 different serpins, with Serpinb6 and Serpini1 being specifically found in this compartment. The egg white recovers 6 serpins including one which has been identified only in this compartment (Serpinb5). The vitelline membrane possesses 5 serpins which are also components of the egg white and the eggshell, and the egg yolk contains 10 serpins that are also listed in the other egg compartments (Fig. 5). As previously discussed, 3 of these egg serpins (Serpinb14, Serpinb14b, Serpinb14c) might be specifically associated with bird species and the extra-uterine development of the embryo within an egg.



Fig. 2. Phylogenetic tree of SERPINB, C, E and I and loci representation. Phylogenetic tree, generated by Ensembl, merging maximum likehood and neighbor joining trees, shows serpins orthologs found for chicken and cow. All *G. gallus* clade B serpins are localized in the same gene cluster on chromosome 2. *The Serpinb14c, not annotated in Ensembl was manualy added to this figure. The protein sequences of the 27 serpins genes found in the chicken gene genome were aligned and a serpin phylogenetic tree was generated (using the website http://www.phylogeny.fr), in order to compare validate the position of Serpinb14c in the phylogenetic tree.

2. Egg serpins: an update

With the exception of ovalbumin (Serpinb14) and its related protein X (Serpinb14c) and Y (Serpinb14b), most egg serpins recovered in the egg are not specifically expressed to support egg formation. Therefore, to appreciate their respective physiological activity in egg, it is important to have a good representation of the process of egg formation in mind, as their function is intimately linked to their localization within the egg.

2.1. Biological significance of egg yolk serpins

Major proteins of the egg yolk, with the exception of immunoglobulins, are synthesized by the liver of laying hens in which protein synthesis and lipogenesis are stimulated 15–20 fold at sexual maturity. Egg yolk proteins result from the stimulation of hepatic expression of preexisting proteins and neo synthesis of specific egg components. Once secreted into the blood, egg yolk

precursors such as very-low density lipoproteins are transported to the ovarian follicle and incorporated in the growing yolky follicles, via receptor-mediated endocytosis [29]. Meanwhile, the liver continues to express many proteins which are not related to vitellogenesis and which can be unselectively incorporated into the egg yolk by passive binding to egg yolk-specific proteins. Eleven serpins have been identified in the egg yolk: Serpina1 (alpha1antitrypsin), Serpina4 (kallistatin), Serpina8 (angiotensinogen), Serpinb14 (ovalbumin), Serpinb14b (OVAY), Serpinb14c (OVAX), Serpinc1 (antithrombin III), Serpind1 (heparin cofactor II), Serping1 (plasma Protease C1 Inhibitor), Serpinf1 (pigment epitheliumderived factor) and Serpinf2 (alpha2-antiplasmin) [25,27]. Except Serpina1, Serpinb14, Serpinb14b, Serpinb14c, serpins identified in egg yolk are expressed by the chicken liver, regardless of the sexual maturity of the hens [30], corroborating that these serpins are not specifically expressed to support vitellogenesis. Serpina1, Serpinb14, Serpinb14b, Serpinb14c might be expressed within the ovary by surrounding cells including granulosa cells and theca to



Fig. 3. Comparative analyses of *Gallus gallus* and *Bos Taurus* loci including clade A, D, F, G, and H serpins. Phylogenetic trees are generated by Ensembl. Clade A serpins are found in the same syntenic cluster in both *G. gallus* and *B. taurus*. The *B. taurus* genome was preferred for this study as it is well referenced for this locus. Moreover, serpins from clade B found in *B. taurus* genome possess more duplications (as chicken Serpinb14 for example) as compared with human genome. The phylogenetic trees were processed by ENSEMBL, with the complete sequences including amino- and carboxy- terminal extensions.



Fig. 4. Evolutionary scenario of SERPIN from clade A, D, F, G and H for mammal, birds and fishes. Last SERPINA duplication appears, for mammals, birds, and fishes, after divergence between species. Speciation branches are represented: for example, for SERPING1 and SERPINF2 the node represents the last common ancestor, and the divergence before speciation between different species. The red dot represents paralog duplication after divergence between species. This phylogenetic tree was made using PRANK (http://www.ebi.ac.uk/goldman-srv/prank/) to align sequences and RAxML (http://sco.h-its.org/exelixis/software.html) to build the tree.

C. Dombre et al. / Seminars in Cell & Developmental Biology 62 (2017) 120-132



Fig. 5. Schematic representation of egg formation and serpins identified in each egg compartments. For each compartment, the size of the font roughly indicates the relative quantity of one serpin to another. Bigger letter corresponds to abundant to very abundant proteins, smaller letters correspond to low abundant proteins and normal letters to proteins with intermediate abundance. Note that compartments are not comparable, as the relative quantity intimately depends on the intrinsic composition of each compartment. Data were extracted from [25,27] (egg yolk), [26] (virelline membrane), [22,28] (egg white), and [23,80] (eggshell).

be incorporated in the yolk, or be recovered in the egg yolk by passive diffusion from the egg white where they are major components. Actually, the exhaustive analysis of serpins expression in chicken male or female tissues has never been investigated and in females, except for Serpinb14, Serpinb14b and Serpinb14c, their expression does not seem to be hormone-regulated [30]. The functional annotation of egg yolk proteins has revealed that serpins identified in the egg yolk are essentially known actors of coagulation/fibrinolysis cascades [24]. This consideration, together with their very low abundance in egg yolk, questions the biological relevance of these eleven serpins in the egg yolk.

2.2. Vitelline membrane serpins: a predicted role in folliculogenesis, defense and angiogenesis

The vitelline membrane is the acellular proteinaceous membrane at the interface between the egg white and the egg yolk. This membrane is composed of two distinct layers (outer and inner layers) separated by a thin continuous membrane [31]. The inner layer, in contact with the yolk and the oocyte and corresponding to the zona pellucida in mammals, is constituted of interlaced proteinaceous fibers most likely produced by granulosa cells and/or liver cells, during vitellogenesis/folliculogenesis. The outer layer contains proteins forming a lattice network of fine fibrils, secreted by the infundibulum (Fig. 5). Fertilization of the oocyte by a sperm cell occurs in the infundibulum, presumably prior to the secretion of the vitelline membrane outer layer. The vitelline membrane has different roles in avian reproduction. The inner layer encloses zona pellucida proteins known for their role in sperm-egg interaction during fertilization [32]. The inner surface of vitelline membrane promotes cell growth [33] following egg fertilization, which in turn progressively degrades the vitelline membrane to form a vascularized tissue around the yolk, namely the yolk sac [34]. The vitelline membrane acts as a natural filter barrier to separate egg white from yolk components, and to prevent microbial contamination of yolk potentially coming from the albumen. The outer layer of the vitelline membrane is also rich in antimicrobial proteins (lysozyme, ovotransferrin, avian beta defensin 11). Proteomic analysis of hen egg vitelline membrane revealed the presence of 137 proteins [26] including 5 serpins: Serpinb14 (ovalbumin), Serpinb14b (OVAY), Serpinb14c (OVAX), Serpine2 (glia-derived nexin/protease nexin-1) and Serpinf2 (alpha2-antiplasmin). The distribution of these avian serpins within the various layers of the vitelline membrane remains unknown to date and their biological roles are still unclear. As previously mentioned, Serpinb14, Serpinb14b and Serpinb14c are egg-specific proteins. Their role within the egg and the vitelline membrane still remains elusive although they constitute major components of this compartment [26] (Fig. 5). No proteaseinhibiting activity has been found for these serpins to date. A recent study demonstrated that Serpinb14c possesses heparin-binding properties (Fig. 6) and antibacterial activities, in contrast to its homolog Serpinb14 [35]. Serpinb14c might therefore contribute to egg defense together with other active antimicrobials present in the vitelline membrane.

By comparison with their mammalian homologs, avian Serpine2 and Serpinf2 are presumed to have important functions

in egg formation, especially during follicular development and/or ovulation phases. Both serpins are expressed in bovine granulosa cells [36,37] and temporal expression of Serpine2 gene can be observed during follicular growth: high expression level is indeed associated with large growing follicles whereas lower expression is rather observed in small growing follicles or in pre-ovulatory follicles [36]. Plasmin, the cognate serine protease of Serpine2 and Serpinf2 [38,39], is involved in the extensive remodeling of the follicular connective tissue and degradation of the basal lamina during follicular expansion. Ovulation also involves proteolytic events at the follicular apex responsible for the formation of the stigma and the release of the mature oocvte. Plasminogen activators/plasmin system is believed to participate in follicular maturation in chickens [40]. Serpine2 possesses glycosaminoglycan-binding properties [38] and knowing that there are some pre-ovulatory changes of glycosaminoglycans content (i.e. degradation) in the stigma, the area of the ovarian surface where the mature chicken follicle will burst through during ovulation [41], glycosaminoglycans produced by granulosa cells and their degradation might regulate the proteolytic processes during the follicular growth and/or the ovulation, via the interaction with follicular serpins and the modulation of their activity [42].

Besides follicular growth, the vitelline membrane also supports cell proliferation and angiogenesis associated with embryonic development. In chicken, Haas and Spratt have reported that components of the inner membrane promote the outgrowth of extraembryonic tissues onto the vitelline membrane [33]. Serpins from vitelline membrane might participate in these processes via both antiprotease-dependent and independent mechanisms. SERPINE2 is known to interact with several modulators of angiogenesis, such as proteases (thrombin, plasmin, plasminogen activators), extracellular matrix proteins and glycosaminoglycans [43,44]. Antiangiogenic properties have been reported in vitro and in vivo for SERPINE2, which has been demonstrated to inhibit vascular epithelial growth factor activity on endothelial cells (including proliferation and migration) and to decrease cell spreading on vitronectin [45]. Interestingly, its anti-angiogenic effects do not involve its inhibitory site but rather rely on its glycosaminoglycan-binding properties [45]. Serpine2 might therefore regulate angiogenesis which guides the development of yolk sac by targeting pivotal cell signaling pathways such as the Hedgehog pathway [46].

2.3. Egg white serpins: a role in nutrition and defense. What else?

Egg white is an aqueous solution mainly composed of water (88%), proteins (90% dry matter), minerals (6% dry matter) and free glucose (3.5% dry matter). The dominant physiological role of egg white is assumed to provide nutrients for the embryo and protection against microbial contamination. Clade B serpins including ovalbumin (Serpinb14), OVAY (Serpinb14b) and OVAX (Serpinb14c) are major components of the egg white [28], with ovalbumin accounting for 54% of egg white proteins (about 50 mg/mL). All three proteins are mainly produced by the oviduct and more specifically by tubular gland cells of the chicken's magnum, responsible for egg white formation [8] (Fig. 5). The additional major proteins found in this compartment are lysozyme, ovotransferrin, which both prevent bacterial proliferation and dissemination. Egg white is also characterized by the presence of numerous active protease inhibitors including ovomucoid and ovoinhibitor (Kazal-like proteins), cystatin and ovostatin [47], which are assumed to protect egg white proteins from inappropriate/early proteolytic events. Non-inhibitory properties of certain serpins including ovalbumin, ovalbumin-related protein X or maspin (Serpinb5) can be possibly explained by multiple devi-

ations in the hinge region of the reactive center loop, compared with the consensus sequence for inhibitory serpins [1] (Fig. 6). The physiological function of all three paralogs is still unclear. The on-going hypothesis is that it would serve as a source of aminoacids for the developing chicken embryo from the eleventh day of incubation while the egg white migrates to the amniotic fluid to be orally absorbed by the embryo. Up to that stage, egg white proteins are probably protected from proteolysis thanks to major egg white active antiproteases. Indeed, egg white proteins remain essentially uncleaved during the first half incubation, as revealed by proteomic approaches [48]. It is noteworthy that Serpinb14 naturally undergoes some conformational changes during egg incubation, to convert to a heat-stable form named S-ovalbumin [49]. This S-ovalbumin is characterized by chemical inversions of serine residues into the D configuration, and other subtle changes, that are supposed to give a thermodynamic advantage to the structural stability of S-ovalbumin [50]. Interestingly, once swallowed from the amniotic fluid, ovalbumin does not seem to be fully altered in the gastrointestinal tract of the embryo [49]. Ovalbumin is recovered in the extracts of many embryonic organs including the head, eye, heart, liver, intestine, spinal cord, muscle, dermis, and bone [49]. Surprisingly enough, the presence of uncleaved ovalbumin persists in embryonic organs suggesting that at least a fraction of ovalbumin molecules could be transported intact to embryonic organs [49]. This observation together with the absence of ovalbumin mRNA expression in these organs and with the fact that the neonate organs are no longer positive for ovalbumin shortly after hatching [49], suggests that egg white ovalbumin may not merely serve as a source of amino acid but may also have a more active/direct function on developing tissues.

With regard to OVAY and OVAX, there is no information available about their susceptibility to convert to a S-form, similarly to ovalbumin, nor about their presence in embryonic tissues during incubation. But, the abundance of OVAY in egg white was shown to be significantly affected during incubation [48]. Its predicted Lys-His reactive site suggests that OVAY could inhibit trypsinlike proteases [1] and thus possibly gastrointestinal proteases of the embryo and/or yolk proteases. Considering OVAX, it was shown to lack inhibitory activity against trypsin/chymotrypsinlike proteases [35]. However, it exhibits antimicrobial activities against two pathogens, Listeria monocytogenes and Salmonella enterica Enteritidis via its heparin-binding domain [35]. These activities suggest a role for OVAX at least in innate defense. Similar function has been proposed for mammalian heparinbinding serpins including Heparin cofactor II/SERPIND1 [51], which is also present in the egg white. The expression of Serpind1 and Serping1 in the oviduct and more particularly in the magnum has not been investigated yet. Their presence in the egg white could be the consequence of oviducal expression but could also result from passive diffusion from the volk. Concerning Serpinb5, its role in the egg white will not be further discussed since it was identified as very minor component [52].

2.4. Eggshell serpins as regulators of biomineralization process

The calcified chicken eggshell is a natural envelope which protects the developing embryo from physical and microbial assaults. It is composed of 95% calcium carbonate (calcite polymorph), 1.5% water and 3.5% proteins, polysaccharides and proteoglycans [53]. Avian eggshell is a porous mineral layer with a well-defined structural polycrystalline organization (Fig. 7A). Biomineralization may be defined as the production of the hard tissue characterized by a specific minerals/organic matrix framework, by a living organism. Eggshell proteins and proteoglycans play a key role in shell formaΑ.



Alpha-1 antitrypsin



Fig. 6. Three-dimensional structures of clade A and clade B serpins.

Fig. 6. Three-dimensional structures of clade A and clade B serpins. (A) Cartoon representation of human alpha-1 antitrypsin/SerpinaA1 (1QLP) showing the exposed reactive site loop that interacts with the protease active site via the P1-P1/ residues (Met358-Ser359) to form a Michaelis complex. This loop is further cleaved by the protease and leads to the formation of an irreversible, covalent complex between the serpin and its cognate protease. (B and C) 3D structures of ovalbumin/Serpinb14 and OVAX/Serpinb14c, respectively. Although the structures of ovalbumin and ovalbumin-related protein X are highly similar to that of known inhibitory serpins, their reactive site loop are unlikely to interact with proteases [35,81], which can be explained by multiple deviations in the hinge region of the reactive center loop, compared with the consensus sequence for inhibitory serpins [1]. The solvent-accessible



Fig. 7. Structure of the eggshell and effect of ovalbumin on calcium carbonate crystals. (A) Ultrastructural structure of chicken eggshell (scanning electron microscopy). (B) Control crystal. (C) Crystal obtained in the presence of ovalbumin (133 µg/mL). The morphology and the size of crystals (half reduction) are significantly modified in the presence of ovalbumin. Unpublished data (J. Gautron, S. Solomon, M. Bain, Y. Nys). 1 bar = 100 µm.

tion [54]. This controlled process occurs in a confined space (lumen of the uterus) where ionic concentrations (calcium and bicarbonates) are highly supersaturated [15]. Recently, the investigation of early shell mineralization mechanisms highlighted the importance of the formation of a transient amorphous calcium carbonate mineral (ACC) at the initial stage of eggshell mineralization [55]. The ACC mineral first accumulates on eggshell membranes and on specific nucleation sites (mammillary knobs) (Fig. 7A). ACC deposited around these sites dissolves rapidly, providing a continuous supply of ions to form calcite crystals on specific nucleation sites. These units coalesce to form larger crystals in the mammillary layer, and then during the next rapid growth phase, they form the compact shell palisade layer characterized by columnar crystals with a preferred orientation (Fig. 7A). Calcite crystals result from aggregation of ACC particles that support rapid mineralization of the eggshell and there is evidence that this non-crystalline form of calcium carbonate is present throughout the various phases of shell formation [55]. During these distinct phases, matrix proteins play a key role to stabilize this transient form of calcium carbonate [55] but also influence the selection of the calcite polymorph into which it is ultimately converted and the preferential orientation of calcite crystals in the eggshell [53,56]. This interaction leads to the eggshell ultrastructure and its associated mechanical properties [53,54]. Many efforts are driven to identify and characterize the role of eggshell matrix proteins in the eggshell biomineralization process. Ovalbumin/Serpinb14 was the second protein and the first eggshell serpin identified in the shell matrix [57]. Its presence in the mammillary bodies of decalcified shell was confirmed by immunohistochemistry, indicating that ovalbumin is present during the initial phase of shell formation and becomes incorporated into the protein matrix of the mammillary bodies [57]. The numerous eggshell proteomics studies performed in the last decade, widely confirmed the presence of ovalbumin in eggshell as an abundant protein and identified 13 additional serpins in this biomineral [17-21,23,58].

Ovalbumin/Serpinb14 is believed to play a crucial role in calcium carbonate formation and ACC stabilization [59,60]. Calcium binds to ovalbumin and this accumulation creates a nucleation center for the minerals [60]. Calcium ions are bound to the protein by complexation via acidic groups leading to protein structural rearrangements [59]. The calcium cations are the starting points for the subsequent formation of ACC nuclei, which then undergo a series of transition phases to the stable crystalline polymorphs [59]. In a recent study, ovalbumin was reported as a major protein at all key time events of shell mineralization. Furthermore, ovalbumin is overabundant when larger calcite crystal units are growing on the seeding sites of shell (mammillary knobs) [18] and it controls both calcite crystal morphology and size (Fig. 7B and C).

Serpinf2, was identified as a protein of intermediate [23] or major abundance in the shell [18]. Serpinb14b, Serpine2, Serpinf1 and Serpini1 are eggshell matrix protein with intermediate abundance. Serpinb14c, Serpina8, Serping1, Serpinc1, Serpind1 are present in the shell at low abundance or intermediate abundance [18,23]. The remaining 4 eggshell serpins (Serpinb6, Serpina1, Serpina4 and Serpinb14c) were identified in very low concentration in the shell. The function of all these serpins has not been explored yet. As potential antiproteases, they could participate in controlling the calcification process by limiting proteolytic degradation [61,62]. Other eggshell serpins such as the antibacterial Serpinb14c could also participate in egg defense [35] within the eggshell and/or during the process of its formation. It is also noticeable that several of these eggshell serpins are actually glycosaminoglycan binding proteins (Serpinb14c, Serpind1, Serpinc1, Serpine2). Considering that eggshell matrix contains numerous glycosaminoglycans including keratan sulfate, chondroitin sulfate, hyaluronan and heparan sulfate [63], these heparin-binding proteins may also trigger the interaction with the mineral phase and/or the other eggshell proteins.

surface of both serpins is shown and colored according to values of electrostatic potentials (blue: positive charges; red: negative charges). The cluster of positive charges in OVAX corresponding to the putative heparin-binding site is surrounded by a black circle. This cluster is not present in ovalbumin nor in OVAY despite their high sequence identity with OVAX. Atomic coordinates of ovalbumin (10XA) and those of OVAX model were obtained by comparative modeling based on ovalbumin structure using Swiss-Model server (swissmodel.expasy.org). The figure was prepared with PYMOL software.



Fig. 8. Schematic representation of a fertilized egg at day 16 of incubation and serpins identified in each egg structure during chicken development. For each compartment, the size of the font roughly indicates the relative quantity of one serpin to another. Bigger letter corresponds to abundant to very abundant proteins, smaller letters correspond to low abundant proteins and normal letters to proteins with intermediate abundance. Note that compartments are not comparable, as the relative quantity intimately depends on the intrinsic composition of each compartment, *Data related to the relative abundance of serpins in the chorioallantoic membrane were not available [71]. Serpins found amnitotic fluid from day 11 onwards (the composition of egg white remains globally unchanged during the first half of incubation [48]). Data were extracted from [71] (shell membrane and chorioallantoic membrane), [76] (yolk), and [22,28,52] (egg white).

2.5. Serpins in extraembryonic tissues

During the 21-day incubation, the extraembryonic structures that include the amniotic, chorioallantoic and yolk sacs, are essential during embryonic development (Fig. 8). Amniotic sac appears early in the development and embraces the embryo to protect it from mechanical shocks, dehydration and adhesion [64]. In parallel, the allantois expands from the hind gut of the embryo at day 3 of the development (E3) and fuses with the chorion, an extraembryonic membrane lying under the eggshell membranes (Fig. 8). The close contact between the chorioallantoic membrane (CAM) and the eggshell allows oxygenation of the embryo, as well as calcium intake for its skeletal development [64]. This structure also provides a reservoir for disposal wastes produced by the embryonic metabolism, some of its components being reabsorbed by the CAM and used by the embryo for its growth. The yolk sac begins to form from the embryo's gut and encloses the yolk during incubation while the vitelline membrane is disrupted (Fig. 8). This resulting membrane supports yolk nutrients digestion and their transport through the blood system to the embryo [65,66]. Both yolk sac and CAM support angiogenesis. Meanwhile, extraembryonic fluids are transferred from one compartment to another during incubation. Thus, egg white and its components are moving to the amniotic sac from E11 onward, and are orally absorbed by the embryo [64] before reaching the yolk sac [67].

Except ovalbumin which has been detected in many extraembryonic and embryonic tissues, there is little information related to the analysis of serpins in the various structures and fluids of incubated eggs.

2.5.1. Amniotic fluid

Given that egg white transfers into the amniotic sac, ovalbumin (Serpinb14) are other egg white serpins are assumed to be found in the amniotic fluid from day 11 onward [68], in the embryonic serum and organs [49]. The antimicrobial properties of OVAX (Serpinb14c) could protect the embryo during its development [35], but the impact of the changing environment (*i.e.* transfer to the amniotic fluid) on its properties has not been explored yet. As regards to the Serpinb14b, its role in embryonic development is still not known. The plasma protease C1 inhibitor/Serping1 and heparin cofactor II/Serpind1 as egg white proteins are supposed to be similarly transferred into the amniotic fluid (Fig. 8). The former has been detected in the woman amniotic fluid [69] and has even been described as synthesized by the amnion [70].

2.5.2. Chorioallantoic membrane and allantoic fluid

Exhaustive analysis of allantoic fluid using proteomic tools has not been investigated yet whereas the proteome of the CAM allowed the identification of three serpins: ovalbumin (Serpinb14) and its related protein Serpinb14b (OVAY), and Serpinb14c (OVAX) [71]. Serpinb14 has been found in the chorioallantoic fluid from E6 to E12 [68] and in the CAM and the blood at E19 [71]. Serpinb14c and Serpinb14b have also been detected in the CAM at E19 [71], but further studies are needed to identify their origins, even if the albumen – amniotic fluid – gastrointestinal tract – chorioallantoic fluid – CAM is assumed to be the main route.

2.5.3. Eggshell membranes

During the embryonic development, there is a global enrichment in serpins' amount in the eggshell membranes (ESM). Serpinb14, Serpinb14b, and Serpinb14c has been described as higher in abundance in the ESM of fertilized eggs compared to the ESM of unfertilized sample all along the incubation. However, Serpinb14c and Serpinb14b have not been detected in the embryonic blood at E19, which suggests a local expression by the chrorioallantoic membrane or a gradual solubilization from the upper part of the eggshell. Serpinb10 was found to be enriched in the ESM from fertilized eggs at E3. This serpin is mainly known as a nuclear protein converting DNA into a compact transcriptionally inert heterochromatin [72]. It has been shown to be regulated during development to accumulate in adult chicken erythrocyte nuclei [73] and could also be involved in the chicken host defense [74]. In contrast, neuroserpin/Serpini1, plasma protease C1 inhibitor/Serping1 and alpha2-antiplasmin/Serpinf2 were only increased in the third part of the development just before pipping (E19). This distribution implies that each serpin is likely to have a specific role in the ESM

during incubation. Serpini1 is involved in neuronal development and synaptic plasticity, and is restricted to the nervous system of the chicken [75]. The biological significance of its presence in the ESM at E15 remains unclear. Of the eight serpins identified in the ESM during embryonic development, Serpinb6 is the only one to decrease in abundance. Its role in this compartment is not known to date.

2.5.4. Yolk and yolk sac

Ovalbumin/Serpinb14 has been found in the yolk at E18 [49]. It has been proposed that this protein could be digested by enzymes of the egg yolk to release amino-acids and some specific peptides with additional biological activities (antioxidant, antihypertensive etc.) [8].

A small amount of angiotensinogen/Serpina8 has been found in the yolk sac at EO and decreases until E12 [76]. The protein is expressed by the chicken volk sac membrane from E2 onward [77], indicating a potential function of the protein in the regulation of homeostasis and primitive erythropoiesis in the yolk sac. Moreover, some have shown that targeted deletion of the genes encoding SERPINA8 produces specific renal abnormalities in mammalian embryos suggesting a crucial role of SERPINA8 in kidney development [78]. Plasma protease C1 inhibitor/Serping1, heparin cofactor/Serpind1, and alpha-1 antitrypsin/Serpina1 have been detected in very small amount in the yolk of unfertilized eggs [25,27], which question their biological significance (§2.1). Serpind1 and Serpina4 have been described at lower abundance in the egg yolk of fertilized eggs after E12 [76], and thus, might be used by the embryo or the extraembryonic structures during this period.

3. Conclusions

Out of the 27 serpins identified in the chicken genome, only 15 have been detected in the egg. Their localization in the different egg compartments suggests a specific role either during egg formation or during embryonic development. The biological function of most egg serpins is still unknown but the available data suggests that they participate in tissue remodeling and angiogenesis (folliculogenesis, development of yolk, amniotic and allantoic membranes), egg defenses (antibacterial serpins, eggshell serpins) and nutrition (as a source of amino-acids). Amongst the 15 serpins present in the chicken egg, chicken clade B ovalbumin (Serpinb14) and its related proteins (Serpinb14b, Serpinb14c) retain much interest as these serpins are found exclusively in the egg and as their functions remains largely unknown. This observation suggests that Serpinb14 members might have contributed to evolution of egg laying species, similarly to egg yolk vitellogenins, which have been lost in mammals, concomitantly with the development of placentation in eutherian and marsupial animals [79]. Additional evidence from other species laying eggs would be very informative to strengthen this hypothesis/conjecture. All three Serpinb14 paralogs display subtle conformational and physicochemical differences, which may affect their respective activity. Uniquely in the serpins world, ovalbumin is converted to a heat-stable form while migrating to the extraembryonic fluids and embryonic organs where it recovers as an uncleaved protein. This observation does not actually support its unique role as a source of amino-acids and suggests some more direct function on developing organs. Ovalbumin also contributes to shape eggshell ultrastructure by interacting with the mineral phase. Comprehensive and functional analyses of egg serpins in embryonic and extraembryonic tissues is lacking to date. This review highlights that chicken egg serpins offer multiples axes of research in the field of developmental biology.

Conflict of interest

All authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Aurélien Brionne (UR83 Recherches Avicoles) for his remarkable work to integrate all published proteomic data on the chicken egg. We thank Region Centre - Val de Loire, France for M. Da Silva PhD fellowship.

References

- [1] C. Benarafa, E. Remold-O'Donnell, The ovalbumin serpins revisited: perspective from the chicken genome of clade B serpin evolution in vertebrates, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102 (2005) 11367–11372.
- Vertebrates, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102 (2005) 11367-11372.
 [2] D. Kaiserman, P.I. Bird, Analysis of vertebrate genomes suggests a new model for clade B serpin evolution, BMC Genomics 6 (2005) 167.
 [3] W.R. Atchley, T. Lokot, K. Wollenberg, A. Dress, H. Ragg, Phylogenetic analyses of amino acid variation in the serpin proteins, Mol. Biol. Evol. 18 (2001) 1500-1511
- 1502–1511. [4] H. Ragg, T. Lokot, P.B. Kamp, W.R. Atchley, A. Dress, Vertebrate serpins: construction of a conflict-free phylogeny by combining exon-intron and diagnostic site analyses, Mol. Biol. Evol. 18 (2001) 577–584.
- P. Chambon, Determination of the organization of coding and intervening sequences in the chicken ovalbumin split gene, Differentiation 13 (1979) 43_44
- [6] R. Heilig, R. Muraskowsky, C. Kloepfer, J.L. Mandel, The ovalburnin gene family: complete sequence and structure of the Y gene, Nucleic Acids Res. 10 (1982) 4363-4382.
- R. Heilig, F. Perrin, F. Gannon, J.L. Mandel, P. Chambon, The ovalburnin gene family: structure of the X gene and evolution of duplicated split genes, Cell 20 [7] 1980) 625-637.
- M. Da Silva, S. Beauclercq, G. Harichaux, V. Labas, N. Guyot, J. Gautron, et al., The family secrets of avian egg-specific ovalburnin and its related proteins Y and X, Biol. Reprod. 93 (2015) 71.
 [9] X. Tian, J. Gautron, P. Monget, G. Pascal, What makes an egg unique? Clues
- from evolutionary scenarios of egg-specific genes, Biol. Reprod. 83 (2010) 893-900.
- P. Pelissier, D. Delourme, A. Germot, X. Blanchet, S. Becila, A. Maftah, et al., An original SERPINA3 gene cluster: elucidation of genomic organization and gene expression in the Bos taurus 21q24 region, BMC Genomics 9 (2008).
 A. Kumar, S.J. Sarde, A. Bhandari, Revising angiotensinogen from phylogenetic
- and genetic variants perspectives, Biochem. Biophys. Res. Commun. 446 2014) 504-518.
- [12] G.A. Silverman, P.I. Bird, R.W. Carrell, F.C. Church, P.B. Coughlin, P.G. Gettins, et al., The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature, J. Biol. Chem. 276 (2001) 33293-33296
- [13] J.A. Irving, R.N. Pike, A.M. Lesk, J.C. Whisstock, Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function, Genome Res. 10 (2000) 1845–1864.
 S.S. Teoh, J. Vieusseux, M. Prakash, S. Berkowicz, J. Luu, C.H. Bird, et al., Maspin
- is not required for embryonic development or tumour suppression, Nat. Commun. 5 (2014) 3164.
- Y. Nys, N. Guyot, Egg formation and chemistry, in: Y. Nys, M. Bain, F. Van Immerseel (Eds.), Improving the Safety and Quality of Egg and Egg Products, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, U.K, 2011, pp. 83–132.
 C. Guerin-Dubiard, M. Pasco, D. Molle, C. Desert, T. Croguennec, F. Nau,
- Proteomic analysis of hen egg white, J. Agric. Food. Chem. 54 (2006)
- [17] M. Rose-Martel, J. Du, M.T. Hincke, Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle, J. Proteomics 75 (2012) 2697–2706. [18] P. Marie, V. Labas, A. Brionne, G. Harichaux, C. Hennequet-Antier, A.B.
- Rodriguez-Navarro, 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 126 (2015) 40-154.
- I. Miksik, A. Eckhardt, P. Sedlakova, K. Mikulikova, Proteins of insoluble matrix of avian (Gallus gallus) eggshell, Connect. Tissue Res. 48 (2007) 1–8.
 I. Miksik, P. Ergang, J. Pacha, Proteomic analysis of chicken eggshell cuticle membrane layer, Anal. Bioanal. Chem. 406 (2014) 7633–7640.
- [21] I. Miksik, P. Sedlakova, K. Lacinova, S. Pataridis, A. Eckhardt, Determination of insoluble avian eggshell matrix proteins, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 205-214
- [22] C. D'Ambrosio, S. Arena, A. Scaloni, L. Guerrier, E. Boschetti, M.E. Mendieta, et al., Exploring the chicken egg white proteome with combinatorial peptide ligand libraries, J. Proteome Res. 7 (2008) 3461–3474.
 [23] K. Mann, B. Macek, J.V. Olsen, Proteomic analysis of the acid-soluble organic
- matrix of the chicken calcified eggshell layer, Proteomics 6 (2006) 3801-3810.

C. Dombre et al. / Seminars in Cell & Developmental Biology 62 (2017) 120-132

- [24] A. D'Alessandro, P.G. Righetti, E. Fasoli, L. Zolla, The egg white and yolk interactomes as gleaned from extensive proteomic data. J. Proteomics 73 (2010) 1028-1042
- A. Farinazzo, U. Restuccia, A. Bachi, L. Guerrier, F. Fortis, E. Boschetti, et al., [25] [25] A. Parmazzo, G. Restucta, A. Bacin, L. Guerrin, P. Outs, E. Boschett, et al., Chicken egg yolk cytoplasmic proteome: mined via combinatorial peptide ligand libraries, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 1241–1252.
 [26] K. Mann, Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane, Proteomics 8 (2008) 2322–2332.
- [27] K. Mann, M. Mann, The chicken egg yolk plasma and granule proteomes,
- Proteomics 8 (2008) 178–191
- [28] K. Mann, The chicken egg white proteome, Proteomics 7 (2007) 3558–3568.
 [29] H.D. Griffin, M.M. Perry, A.B. Gilbert, Yolk formation, in: D.J. Bell, B.M. Freeman (Eds.), Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl, Academic Press, London/New York, 1984.
 [30] M. Bourin, J. Gautron, M. Berges, C. Hennequet-Antier, C. Cabau, Y. Nys, et al.,
- Transcriptomic profiling of proteases and antiproteases in the liver of sexually mature hens in relation to vitellogenesis, BMC Genomics 13 (2012) 457.
- [31] R. Bellairs, M. Markness, R.D. Markness, The vitelline membrane of the hen's egg, J. Ultrastruct. Res. 8 (1963) 339–359.
 [32] T. Sasanami, T. Murata, M. Ohtsuki, K. Matsushima, G. Hiyama, N. Kansaku, et al., Induction of sperm acrosome reaction by perivitelline membrane glycoprotein ZP1 in Japanese quail (Coturnix japonica), Reproduction 133 (007)41-49
- [33] H.J. Haas, N.T. Spratt, Contributions to an analysis of avian vitelline
- [33] H. Haas, W. 1. Sprack, contributions to an analysis of available termine membranes potential to promote outgrowth of yolk sac serosal membrane, Anat. Rec. 184 (1976) 227–231.
 [34] N. Yoshizaki, W. Yamaguchi, S. Ito, C. Katagiri, On the hatching mechanism of quail embryos: participation of ectodermal secretions in the escape of accounter the secret of the embryos from the vitelline membrane, Zoolog. Sci. 17 (2000) 751–758. [35] S. Rehault-Godbert, V. Labas, E. Helloin, V. Herve-Grepinet, C. Slugocki, M
- [35] S. Keltault-Goubert, V. Labas, E. Henolni, V. Helve-Grephiet, C. Sugucu, M. Berges, et al., Ovalbumin-related protein X is a heparin-binding ov-serpin exhibiting antimicrobial activities, J. Biol. Chem. 288 (2013) 17285–17295.
 [36] J. Bedard, S. Brule, C.A. Price, D.W. Silversides, J.G. Lussier, Serine protease inhibitor-E2 (SERPINE2) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicle in cattle, Mol. Reprod. Dev. 64 (2003) 152–165.
 [37] K.-G. Hayashi, K. Ushizawa, M. Hosoe, T. Takahashi, Differential gene expression of critic protease inhibitors in bovine ovarian follicle: possible
- expression of serine protease inhibitors in bovine ovarian follicle: possible involvement in follicular growth and atresia, Reprod. Biol. Endocrinol. 9 (2011).
- [38] M.-C. Bouton, Y. Boulaftali, B. Richard, V. Arocas, J.-B. Michel, M. Jandrot-Perrus, Emerging role of serpinE2/protease nexin-1 in hemostasis and vascular biology, Blood 119 (2012) 2452–2457.
 P.B. Coughlin, Antiplasmin – the forgotten serpin, FEBS J. 272 (2005)
- 4852-4857
- [40] J.A. Jackson, P. Zhang, J.M. Bahr, Plasminogen activator activity in preoxulatory folicles during the ovulatory cycle of the chicken, Biol. Reprod. 49 (1993) 1141–1146.
 [41] J.A. Jackson, A.C. Friberg, J.M. Bahr, Preovulatory changes in
- [41] J.A. Jackson, A.C. Fiberg, J.M. Ball, Prevulatory tranges in glycosaminoglycans and collagen content in the stigma region of the follicle of the domestic hen, Biol. Reprod. 45 (1991) 301–307.
 [42] S. Hasan, G. Hosseini, M. Princivalle, J.C. Dong, D. Birsan, C. Cagide, et al.,
- Coordinate expression of anticoagulant heparan sulfate proteoglycans and volume expression of anticoaguiant neparan surface proteogycans and serine protease inhibitors in the rat ovary: a potent system of proteolysis control, Biol. Reprod. 66 (2002) 144–158.
 P. Rossignol, B. Ho-Tin-Noe, R. Vranckx, M.C. Bouton, O. Meilhac, H.R. Lijnen, et al., Protease nexin-1 inhibits plasminogen activation-induced apoptosis of the series of the series
- adherent cells, J. Biol. Chem. 279 (2004) 10346–10356. [44] D.A. Low, R.W. Scott, J.B. Baker, D.D. Cunningham, Cells regulate their
- mitogenic response to thrombin through release of protease nexin, Nature 298 (1982) 476-478.
- [45] S. Selbonne, F. Azibani, S. Iatmanen, Y. Boulaftali, B. Richard, M. Jandrot-Perrus, et al., In vitro and in vivo antiangioenic properties of the serpin protease nexin-1, Mol. Cell. Biol. 32 (2012) 1496–1505.
 [46] N. Byrd, S. Becker, P. Maye, R. Narasimhaiah, B. St-Jacques, X.Y. Zhang, et al., 1000 (2012) 10000 (2012) 1000 (2012) 1000 (2012) 1000 (2012) 1000 (2012) 1000
- Hedgehog is required for murine yolk sac angiogenesis, Development 129
- (2002) 361–372.
 [47] I. Saxena, S. Tayyab, Protein proteinase inhibitors from avian egg whites, Cell. Mol. Life Sci. 53 (1997) 13–23.
 [48] N. Qiu, M. Ma, Z. Cai, Y. Jin, X. Huang, Q. Huang, et al., Proteomic analysis of
- (40) W. Ort, M. May Z. Cal, F. Jin, X. Huang, G. Huang, et al., Froteomic analysis of egg white proteins during the early phase of embryonic development, J. Proteomics 75 (2012) 1895–1905.
 (49) Y. Sugimoto, S. Sanuki, S. Ohsako, Y. Higashimoto, M. Kondo, J. Kurawaki, et al., Ovalbumin in developing chicken eggs migrates from egg white to a series of the series of th
- embryonic organs while changing its conformation and thermal stability, J. Biol. Chem. 274 (1999) 11030–11037.
 [50] M. Yamasaki, N. Takahashi, M. Hirose, Crystal structure of S-ovalburnin as a non-loop-inserted thermostabilized serpin form, J. Biol. Chem. 278 (2003) 35524–35530.
- [51] M. Kalle, P. Papareddy, G. Kasetty, D.M. Tollefsen, M. Malmsten, M. Morgelin, et al., Proteolytic activation transforms heparin cofactor II into a host defense molecule, J. Immunol. 190 (2013) 6303–6310.
 [52] K. Mann, M. Mann, In-depth analysis of the chicken egg white proteome using
- an LTQ Orbitrap Velos, Proteome Sci. 9 (2011) 7.

- [53] Y. Nys, J. Gautron, J.M. Garcia-Ruiz, M.T. Hincke, Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix
- mineralization: blochemical and functional characterization of matrix proteins, C.R. Palevol 3 (2004) 549–562.
 [54] M.T. Hincke, Y. Nys, J. Gautron, The role of matrix proteins in eggshell formation, J. Poult. Sci. 47 (2010) 208–219.
 [55] A.B. Rodriguez-Navarro, P. Marie, Y. Nys, M.T. Hincke, J. Gautron, Amorphous 1990.
- calcium carbonate controls avian eggshell mineralization: a new paradigm for understanding rapid eggshell calcification, J. Struct. Biol. 190 (2015) 291–303.
- [56] A. Hernandez-Hernandez, M.L. Vidal, J. Gomez-Morales, A.B. Rodriguez-Navarro, V. Labas, J. Gautron, et al., Influence of eggshell matrix proteins on the precipitation of calcium carbonate (CaCO3), J. Cryst. Growth 310 (2008) 1754–1759.
 [57] M.T. Hincke, Ovalbumin is a component of the chicken eggshell matrix,
- Connect. Tissue Res. 31 (1995) 227–233. [58] K. Mann, J.V. Olsen, B. Macek, F. Gnad, M. Mann, Phosphoproteins of the
- [56] K. Mahr, J.V. Ober, B. Macck, P. Onar, W. Mahr, Phosphopheterils of the chicken eggshell calcified layer, Proteomics 7 (2007) 106–115.
 [59] V. Pipich, M. Balz, S.E. Wolf, W. Tremel, D. Schwahn, Nucleation and growth of CaCO(3) mediated by the egg-white protein ovalbumin: a time-resolved in situ study using small-angle neutron scattering, J. Am. Chem. Soc. 130 2008)6879-6892
- [60] D. Schwahn, M. Balz, W. Tremel, Crystallization of the CaCO(3) mineral in the presence of the protein ovalburnin, Phys. B 350 (2004) E947–E949.
 [61] V. Jonchere, S. Rehault-Godbert, C. Hennequet-Antier, C. Cabau, V. Sibut, LA.
- [61] V. Joncher, S. Reham-Soubert, C. Heinequet-Anter, C. Cabadi, V. Johd, E.K. Cogburn, et al., Gene expression profiling to identify eggshell proteins involved in physical defense of the chicken egg, BMC Genomics 11 (2010).
 [62] A. Brionne, Y. Nys, C. Hennequet-Antier, J. Gautron, Hen uterine gene expression profiling during eggshell formation reveals putative proteins involved in the supply of minerals or in the shell mineralization process, BMC Generative 17 (2014). Genomics 15 (2014). [63] Z.G. Liu, F.M. Zhang, L.Y. Li, G.Y. Li, W.Q. He, R.J. Linhardt, Compositional
- analysis and structural elucidation of glycosaminoglycans in chicken eggs Glycoconj. J. 31 (2014) 593–602.
- [64] A.L. Romanoff, The Avian Embryo, Structural and Functional Development, Macmillan Publishers Ltd, New York, 1960.
 [65] R. Bauer, J.A. Plieschnig, T. Finkes, B. Riegler, M. Hermann, W.J. Schneider, The developing chicken yolk sac acquires nutrient transport competence by an archive and differentiation encourse fit in red add and with the link of the link. orchestrated differentiation process of its endodermal epithelial cells, J. Biol.
- orchestrated differentiation process of its endodermal epithelial cells, J. Biol. Chem. 288 (2013) 1088–1098.
 [66] J.S. Speier, L. Yadgary, Z. Uni, E.A. Wong, Gene expression of nutrient transporters and digestive enzymes in the yolk sac membrane and small intestine of the developing embryonic chick, Poult. Sci. 91 (2012) 1941–1949.
- [67] E.T. Moran Jr., Nutrition of the developing embryo and hatchling, Poult Sci. 86 (2007) 1043–1049.
- [68] N. Cirkvencic, M. Narat, P. Dovc, D. Bencina, Distribution of chicken cathepsins B and L, cystatin and ovalbumin in extra-embryonic fluids during embryogenesis, Br. Poult. Sci. 53 (2012) 623–630. [69] N. Tamura, S. Kimura, M. Farhana, T. Uchida, K. Suzuki, K. Sugihara, et al., C1
- esterase inhibitor activity in amniotic fluid embolism, Crit. Care Med. 42 2014) 1392-1396
- [70] Y. Katz, S. Gur, M. Aladjem, R.C. Strunk, Synthesis of complement proteins in amnion, J. Clin. Endocrinol. Metab. 80 (1995) 2027–2032.
 [71] C.M. Cordeiro, M.T. Hincke, Quantitative proteomics analysis of eggshell
- (2016) 11–25. omics 130
- S.A. Grigoryev, J. Bednar, C.L. Woodcock, MENT, a heterochromatin protein that mediates higher order chromatin folding, is a new serpin family member, [72] J. Biol. Chem. 274 (1999) 5626–5636. [73] S.A. Grigoryev, V.O. Solovieva, K.S. Spirin, I.A. Krasheninnikov, A novel
- nonhistone protein (MENT) promotes nuclear collapse at the terminal stage of avian erythropoiesis, Exp. Cell Res. 198 (1992) 268–275.
- [74] I. Rychlik, M. Elsheimer-Matulova, K. Kyrova, Gene expression in the chicken caecum in response to infections with non-typhoid Salmonella, Vet. Res. 45 2014) 119.
- [75] T. Osterwalder, J. Contartese, E.T. Stoeckli, T.B. Kuhn, P. Sonder Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor, EMBO J. 15 1996) 2944-2953.
- [76] S. Rehault-Godbert, K. Mann, M. Bourin, A. Brionne, Y. Nys, Effect of
- [76] S. Kehault-toodbert, K. Mahn, M. Bourin, A. Bronne, Y. Mys, Effect of embryonic development on the chicken egg yolk plasma proteome after 12 days of incubation, J. Agric Food Chem. 62 (2014) 2531–2540.
 [77] K. Savary, A. Michaud, J. Favier, E. Larger, P. Corvol, J.M. Gasc, Role of the renin-angiotensin system in primitive erythropoiesis in the chick embryo, Neural 102 (2002) 1020 4104.

- renin-angiotensin system in primitive erythropotesis in the chick emoryo, Blood 105 (2005) 103–110.
 [78] C.D. Sigmund, D.E. Stec, Genetic manipulation of the renin-angiotensin system using cre-loxP-recombinase, Methods Mol. Med. 51 (2001) 53–65.
 [79] D. Brawand, W. Wahli, H. Kaessmann, Loss of egg yolk genes in mammals and the origin of lactation and placentation, PLoS Biol. 6 (2008) ee63.
 [80] C. Sun, G. Xu, N. Yang, Differential label-free quantitative proteomic analysis of avian eggshell matrix and uterine fluid proteins associated with eggshell mechanical normetry. Proteomics 13 (2013) 3523, 2536. mechanical property, Proteomics 13 (2013) 5521–5536. [81] P.E. Stein, A.G. Leslie, J.T. Finch, R.W. Carrell, Crystal structure of uncleaved
- ovalbumin at 1.95 A resolution, J. Mol. Biol. 221 (1991) 941–959



Mylène DA SILVA



Les liquides amniotique et allantoïque de l'œuf de poule : caractérisation et rôles dans la protection de l'embryon au cours du développement

Résumé

Avec le développement concomitant de l'embryon et des structures extra-embryonnaires, les défenses initiales de l'œuf de poule s'altèrent, ce qui suggère la mise en place de systèmes relais pour protéger l'embryon jusqu'à son éclosion. Pour comprendre le rôle des fluides extra-embryonnaires dans cette fonction, nous avons analysé la composition et les propriétés biochimiques et antibactériennes des fluides amniotique et allantoïque de l'œuf. Comme chez l'humain, le fluide amniotique chez la poule protège l'embryon contre les agressions physiques et microbiennes. De plus, nous avons démontré que le transfert des molécules antibactériennes du blanc au 12^{ème} jour d'incubation augmente son potentiel antibactérien, assurant ainsi une protection de l'embryon jusqu'à l'éclosion, et probablement après, dans son tractus digestif, après l'ingestion du fluide amniotique. Les spécificités phylogénétiques de certaines des protéines identifiées suggèrent un processus d'adaptation des oiseaux à la flore microbienne terrestre. Pour le fluide allantoïque en revanche, nous n'avons pas pu confirmer son rôle antibactérien, mais nous avons mis en évidence la présence de protéases actives qui pourraient contribuer à la digestion et au recyclage des déchets métaboliques de l'embryon.

Résumé en anglais

Concomitantly with the development of the embryo and extra-embryonic structures, initial chicken egg defenses are progressively altered, which suggests that alternative mechanisms appear to protect the embryo until hatching. To better understand the role of extra-embryonic fluids in the chicken egg defense during incubation, we analyzed the biochemical composition and antibacterial properties of the chicken amniotic and allantoic fluids. As for humans, the chicken amniotic fluid protects the embryo against mechanical shocks and microbial infections. Moreover, at the 12th day of incubation, the transfer of antibacterial molecules from the egg white increases the antibacterial potential of the chicken amniotic fluid, thus protecting the embryo until hatching, and probably after, all along its digestive tract, after oral absorption of the amniotic fluid. Some of these antibacterial proteins are specific to oviparous species and/or birds, which highlights the processes of evolution and adaptation of birds to their terrestrial environment. On the other hand, the antibacterial potential of the allantoic fluid still needs to be explored, but our study demonstrated the presence of active proteases, which could contribute to the digestion and recycling of embryonic metabolic wastes.