

ÉCOLE DOCTORALE « Santé, Sciences, Technologies »

ÉQUIPE FONCTION ET REGULATION DES PROTEINES DE L'ŒUF

THÈSE présentée par :

Marie BOURIN

Soutenue le : 14 décembre 2011

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie

**Caractérisation fonctionnelle et
biochimique des protéases et antiprotéases
présentes dans le jaune d'œuf « *Gallus
gallus* ».**

THÈSE dirigée par :

Mr NYS Yves

Mme REHAULT-GODBERT Sophie

Directeur de Recherche, INRA de Tours

Chargé de Recherche, INRA de Tours

RAPPORTEURS :

Mr ANTON Marc

Mr JAFFREDO Thierry

Directeur de Recherche, INRA de Nantes

Directeur de Recherche, CNRS de Paris

JURY :

Mr ANTON Marc

Mr JAFFREDO Thierry

Mme ATTUCCI Sylvie

Mr DIOT Christian

Mr NYS Yves

Mme REHAULT-GODBERT Sophie

Directeur de Recherche, INRA de Nantes

Directeur de Recherche, CNRS de Paris

Maître de Conférences, HDR, Université de Tours

Directeur de Recherche, INRA de Rennes

Directeur de Recherche, INRA de Tours

Chargé de Recherche, INRA de Tours

A ma mère,
C'est dans ces moments que ton absence me pèse cruellement...

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord la Région Centre et le département PHASE (Physiologie Animale et Systèmes d'Elevage) pour la bourse de thèse dont j'ai bénéficiée. Je remercie également l'INRA (Institut National de Recherche Agronomique) et le Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour leurs aides financières *via* le programme OVO-Mining (contrat ANR-09-BLAN-0136), qui a permis en partie la réalisation des expérimentations de ce travail de thèse.



Je suis reconnaissante envers les membres du Jury qui ont accepté d'évaluer ce mémoire, tout d'abord Messieurs Marc ANTON et Thierry JAFFREDO qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi que Madame Sylvie ATTUCCI et Monsieur Christian DIOT, pour avoir accepté d'être membres de ce jury

Je souhaite également remercier toutes les personnes qui m'ont permis de mener à bien ce travail et tout particulièrement Monsieur Michel DUCLOS en tant que directeur de l'Unité de Recherches Avicoles pour m'avoir accueillie au sein de cette structure de l'INRA mais aussi et surtout, tous les membres de l'équipe FRPO.

Les mots ne seront jamais assez forts pour exprimer toute ma gratitude à Yves NYS et Sophie REHAULT-GODBERT. Ils ont su m'accompagner et me guider tout au long de ce travail de thèse. Leurs compétences, leur patience, leurs qualités humaines m'ont permis de mener à bien ce projet, qui s'est révélé être une véritable collaboration. Je tiens également à remercier pour sa gentillesse, son aide précieuse et ses compétences Joël GAUTRON. Mes remerciements vont aussi à Christelle HENNEQUET-ANTIER pour sa compétence et le temps passé à l'analyse statistique. Je tiens également à remercier l'équipe de SIGENAE et plus particulièrement Cédric CABAU et Philippe BARDOU pour leur aide précieuse dans les analyses bioinformatiques.

Mes remerciements s'adressent aussi à Maryse MILLS, Magali BERGES et Julie DALIFARD pour leur implication et leur énergie dans la réalisation technique des expériences nécessaires au bon déroulement de ce projet. Je remercie également Jean-Claude POIRIER et Aurélien BRIONNE pour leur aide technique. Je tiens également à remercier les autres membres de l'équipe FRPO temporaires ou titulaires Cédric CABAU, Nicolas GUYOT, Virginie HERVE, Vincent JONCHERE, Lucile BORDEAU, Alix SAUSSET, Marion LAVERGNE et Larbi BEDRANI qui ont tous contribué de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse. Merci encore à vous tous pour les bons moments passés en votre compagnie, les sujets de discussions animés, votre gentillesse et votre bonne humeur. Bref, un grand merci à cette équipe sans l'aide de laquelle ce travail n'aurait pu aboutir !

Je tiens à remercier tout particulièrement Maryse MILLS et Virginie HERVE pour le temps consacré à la relecture de ce manuscrit.

Merci à ma famille, vous avez été mon premier soutien dans ce projet de thèse. Un ENORME merci à mon Papa, ma sœur Sophie et Flo : votre confiance en ma réussite m'a permis d'avancer sans douter. Un merci tout particulier à toi Papa qui m'a supportée ces 3 dernières années et m'a chouchoutée ces derniers mois. Merci à Enzo et Maylène : mes petits chéris, vous m'avez permis de vrais moments d'évasions et de détente, vous avez été ma bouffée d'oxygène !

Merci à Fred, dont la patience a été mise à rude épreuve... Merci pour ta présence. Merci aussi pour ta relecture attentive et le temps consacré à ce mémoire.

Enfin un grand merci à tous mes amis de France et de Navarre : avec du Nord au Sud, Audrey O, Anne et Sébastien, Servane et Yann, Yannou, Jean, Vanessa, Audrey F., Mickaële, Gwennina, Virginie G., Cédric et Flo, Tref, et Nath. Ma vie serait bien triste sans vous !

Et enfin un petit clin d'œil aux Esmisabiens, chez qui j'ai fait mes premiers pas dans la recherche.

Résumé

L'œuf de poule est une enceinte close naturelle qui renferme l'intégralité des éléments nécessaires au développement et à la protection d'un embryon. Le jaune d'œuf constitue une source de nutriments et de molécules bioactives pour l'embryon. Il contient notamment une quarantaine de protéases et antiprotéases dont les activités n'ont pas encore été explorées. D'une manière générale, les protéases et antiprotéases sont connues pour être impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, que ce soit chez les procaryotes ou les eucaryotes. L'objectif de la thèse était 1) d'identifier les protéases et antiprotéases associées spécifiquement à la formation du jaune d'œuf, 2) d'évaluer l'origine tissulaire et les spécificités fonctionnelles de deux candidats, une protéase et une antiprotéase.

Les protéines du jaune sont d'origine hépatique et sont acheminées par voie sanguine à l'ovaire pour être déposées dans les oocytes en croissance. Nous avons étudié l'expression de l'ensemble des gènes du foie au moment de la mise en place de la fonction de reproduction chez la poule (maturité sexuelle, capacité à pondre des œufs) afin d'identifier parmi eux les protéases et antiprotéases qui pourraient avoir un rôle spécifique dans la vitellogénèse. Cette approche révèle 582 gènes surexprimés au cours de l'acquisition de la maturité sexuelle dont 15 protéases et antiprotéases. Au moins trois d'entre elles, la « similar to nothepsin », la « similar to porin » et la « similar to oviductin » sont stimulées lors de la maturité sexuelle et sont présentes dans le jaune ou dans la membrane périvitelline. Nous avons montré que l'expression de la « similar to nothepsin », une protéase à aspartate surexprimée 35 fois dans le foie de poule matures, était spécifique du foie des femelles *Gallus gallus*. Cette protéase pourrait participer à la maturation des précurseurs du jaune, à l'instar de la cathepsin D, une autre protéase à aspartate, ou jouer un rôle dans la défense de l'œuf contre les pathogènes. D'autre part, nous avons purifié et étudié les activités biologiques d'une antiprotéase à sérine possédant 7 domaines de type Kazal et ubiquiste dans l'œuf : l'ovoinhibiteur. Cette antiprotéase s'avère active contre *Bacillus sp.* et pourrait jouer un rôle dans la défense de l'œuf contre les pathogènes. L'intégration de l'ensemble des résultats de ce travail fournira des données essentielles relatives à la vitellogénèse et à la fonction des protéases et des antiprotéases au niveau de l'oocyte en croissance et/ou au cours du développement embryonnaire.

Mots Clés : Œuf de poule, Jaune d'œuf, Protéases, Antiprotéases, « Similar to Nothepsin », Ovoinhibiteur, Puce à oligonucléotides, Physiologie.

Résumé en anglais

The chicken egg is a natural closed chamber which contains all the elements required for the development and for the protection of an embryo. Egg yolk is a source of nutrients and of active biomolecules. It contains about 40 different proteases and antiproteases, the function of which has not been yet explored. Generally, proteases and antiproteases are known to be involved in numerous physiological and pathological processes in both procaryotes and eucaryotes. The objectives of the PhD were 1) to identify which proteases and antiproteases are specifically associated with egg yolk formation, and 2) to evaluate the tissue and functional specificity of two of these candidates.

Egg yolk proteins are essentially synthesized in the liver of the sexually mature hen and are secreted into the blood to be deposited in the growing oocytes. We studied the gene expression in the liver of sexually mature hens (capable to forming an egg) versus immature pullets. This approach allowed us to identify 582 genes that are over-expressed in the liver during sexual maturation including 15 proteases and antiproteases potentially associated with egg yolk formation. Three of them “similar to nothepsin”, “similar to porin” and “similar to oviductin” are actually recovered in the egg yolk or the perivitelline membrane. Additionally, we have shown that the expression of “similar to nothepsin”, an aspartic protease which is highly overexpressed in liver of laying hens, was tissue and sex-specific. This protein might assist cathepsin D, another aspartic protease, in the processing of egg yolk precursors and/or play a role in egg defense. In parallel, we purified and studied the biological activities of an antiprotease possessing 7 Kazal type domains: the ovoinhibitor. This antiprotease turns out to be active against 2 *Bacillus sp.* and might therefore play a role in egg defense. The integration of all these results will provide essential findings related to vitellogenesis and to the biological functions of egg yolk proteases and antiproteases in the growing oocytes and/or during the development of a chick embryo.

Keywords: Hen's egg, Egg yolk, Proteases, Antiproteases, Similar to Nothepsin, Ovoinhibitor, Oligoarray, Physiology.

Table des matières

I INTRODUCTION	- 1 -
II SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	- 7 -
1. Formation de l'œuf.....	- 9 -
1.1. Anatomie et formation de l'appareil reproducteur femelle	- 9 -
1.1.1. <i>Développement de l'appareil reproducteur durant la vie embryonnaire</i>	- 9 -
1.1.2. <i>Développement de l'appareil reproducteur après la naissance du poussin</i>	- 10 -
1.1.3. <i>Anatomie de l'ovaire et de l'oviducte chez la poule adulte</i>	- 10 -
1.2. Formation du jaune.....	- 13 -
1.2.1. <i>Développement de l'ovocyte.....</i>	- 13 -
1.2.2. <i>Chronologie et régulation du dépôt du jaune (vitellogenèse).....</i>	- 15 -
1.2.3. <i>Synthèse hépatique des constituants du jaune.....</i>	- 16 -
1.2.4. <i>Transfert des précurseurs plasmatiques et dépôt dans le jaune</i>	- 16 -
1.3. Ovulation.....	- 17 -
1.4. Formation et dépôt des constituants de l'œuf.....	- 18 -
2. Le jaune d'œuf.....	- 23 -
2.1. Structure et composition du jaune d'œuf	- 23 -
2.1.1. <i>Composition biochimique globale.....</i>	- 23 -
2.1.2. <i>Structure du jaune d'œuf.....</i>	- 24 -
2.1.3. <i>Constituants majeures du jaune d'œuf.....</i>	- 25 -
2.2. Les fonctions biologiques des molécules du jaune d'œuf.....	- 28 -
2.2.1. <i>Fonction nutritive.....</i>	- 28 -
2.2.2. <i>Protection de l'embryon.....</i>	- 29 -

3. Les protéases et les antiprotéases du jaune d'œuf.....	- 31 -
3.1. Les protéases	- 31 -
3.1.1. Les protéases à sérine	- 34 -
3.1.2. Les métalloprotéases	- 36 -
3.1.3. Les protéases à cystéine	- 38 -
3.1.4. Les protéases acides.....	- 39 -
3.2. Les inhibiteurs de protéases	- 40 -
3.2.1. Les inhibiteurs de protéases à sérine	- 43 -
3.2.2. Les inhibiteurs de protéases à cystéine : la superfamille des cystatines	- 47 -
3.2.3. Les inhibiteurs universels : les alpha-2 macroglobulines.....	- 48 -

III RESULTATS EXPERIMENTAUX..... - 53 -

Article 1 : Expression des Protéases et Antiprotéases Hépatiques lors de la Maturité Sexuelle de la Poule : Implication dans la Vitellogénèse Ovarienne. - 55 -

Contexte et objectifs du travail.....	- 55 -
Résumé du travail.....	- 56 -
<i>Introduction</i>	- 56 -
<i>Résultats et discussion</i>	- 57 -
<i>Conclusions</i>	- 60 -

Article 2 : Les Protéases Acides du Jaune d'œuf de Poule : Expression en Fonction du Sexe et Spécificité Tissulaire de la « Similar to Nothepsin » et de la Cathepsine D, en Relation avec la Formation du Jaune d'œuf..... - 101 -

Contexte et objectifs du travail.....	- 101 -
Résumé du travail.....	- 102 -
<i>Introduction</i>	- 102 -
<i>Résultats et discussion</i>	- 103 -
<i>Conclusions</i>	- 104 -

Article 3 : Potentiel Antimicrobien de l'Ovoinhibiteur du Jaune, un Inhibiteur Multidomaine de Type Kazal	- 129 -
Objectifs du travail	- 129 -
Résumé du travail.....	- 130 -
<i>Introduction</i>	- 130 -
<i>Résultats et discussion</i>	- 130 -
<i>Conclusion</i>	- 131 -
IV DISCUSSION ET PERSPECTIVES	- 143 -
V CONCLUSION.....	- 159 -
VI LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS	- 163 -
Publications	- 165 -
Communications à des congrès scientifiques.....	- 165 -
Communications à des journées professionnelles	- 166 -
Autre	- 167 -
Participation à des programmes de recherches	- 169 -
VII INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES.....	- 171 -
Liste des tableaux	- 172 -
Liste des figures.....	- 173 -
Liste des annexes	- 174 -
VIII BIBLIOGRAPHIE	- 175 -
ANNEXES.....	- 175 -

Abréviations

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

Asp : Aspartate

BH : Benjamini Hochberg (test statistique)

BPTI : Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor

Ct : Cycle threshold (seuil de cycle)

Da : Dalton

EST : Expressed Sequence Tag (marqueur de séquence exprimée)

FRPO : Fonction et Régulation des Protéines de l'œuf

FSH : Follicle Stimulating Hormone (Hormone folliculostimulante)

Glu : Glutamate

Gly : Glycine

GO : Gene Ontology

HDL : High Density Lipoprotein (lipoprotéines de haute densité)

His : Histidine

i.e. : *id est* (c'est-à-dire)

INRA : Institut National de Recherche Agronomique

IPI : International Protein Index

kDa : kilo Dalton

LDL : Low Density Lipoprotein (lipoprotéines de basse densité)

LH : Luteinizing Hormone (hormone lutéinisante)

MMP : Matrix MetalloProteinase (métalloprotéase de la matrice)

PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction (Réaction quantitative de polymérisation en chaîne)

RT : Reverse Transcription (transcription inverse)

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (Électrophorèse en gel de polyacrylamide avec du dodécyl sulfate de sodium)

Ser : Sérine

SIGENAE : Système d'Information des GENomes des Animaux d'Elevage

TBP : Tata box Binding Protein

TFPI: Tissue Factor Pathway Inhibitor

Thr : Thréonine

TIMP : Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (inhibiteur tissulaire de métalloprotéinase)

UTI : Urinary Trypsin Inhibitor (Bikunine)

VLDL : Very Low Density Lipoprotein (lipoprotéines de très basse densité)

Xaa : Acide-aminé

α_2 M : Alpha-2 macroglobuline

I
INTRODUCTION

L'œuf de consommation est pour l'homme un aliment essentiel, de haute valeur nutritive du fait de la diversité et de l'équilibre de ses constituants facilement assimilables. C'est une production importante dans le monde correspondant à plus de 20 % de la production de protéines animales. La communauté européenne est le second producteur d'œufs au monde, derrière la Chine et devant les Etats-Unis. Au niveau Européen, c'est la France qui occupe la première place de producteur avec près de 13,8 milliards d'œufs par an pour 65 millions d'habitants (Magdelaine *et al.*, 2010). Chaque Français consomme en moyenne 248 œufs par an (la moyenne mondiale étant de 145 œufs par an et par personne), sous forme d'œufs en coquille ou d'ovoproduits. Lorsqu'il est consommé cru, l'œuf présente un risque de toxi-infections alimentaires de type salmonelloses (60% lui sont attribués). Ce risque a été considérablement diminué grâce aux efforts fournis par les agences sanitaires depuis une vingtaine d'années. Cependant, ce risque pourrait être accru par la mise en place de nouveaux systèmes de production en Europe. En effet, pour des raisons de bien-être animal, la directive européenne 1999/74 interdira à partir de 2012, l'utilisation de cages conventionnelles au sein des pays de l'Union européenne, au profit de systèmes alternatifs (volières, élevage au sol, cages aménagées). Cette mise en place de systèmes d'élevage pourrait être à l'origine d'une recrudescence des toxi-infections alimentaires, en raison d'un contact possible de l'œuf avec la litière particulièrement propice à la prolifération bactérienne. Dans ce contexte, il est important de mieux caractériser les défenses naturelles de l'œuf (physique et chimique) afin d'appréhender l'origine de leur variabilité et de trouver des moyens génétiques ou d'élevage pour renforcer ces protections.

L'œuf n'est pas seulement un aliment de grande qualité nutritionnelle. C'est avant tout une enceinte close naturelle autosuffisante et stérile, qui renferme l'intégralité des éléments nécessaires au développement et à la protection d'un embryon. Le développement de cet embryon se produit dans le milieu extérieur potentiellement hostile. L'œuf contient des systèmes de protections efficaces, physiques et biochimiques, pour permettre le développement harmonieux du poussin. La défense physique de l'embryon est assurée en premier lieu par la coquille, qui constitue une enveloppe protectrice et empêche ainsi la pénétration d'agents microbiens si elle reste intacte. Cette défense physique est également assurée par les propriétés physico-chimiques du blanc d'œuf (viscosité) qui ralentit la progression des microorganismes lorsqu'ils ont réussi à passer à travers la coquille. La défense chimique regroupe les molécules antimicrobiennes présentes dans les différents

compartiments de l'œuf (jaune, blanc, membranes coquillières, coquille). Ces molécules sont nombreuses et possèdent un large spectre d'activités (antibactériennes, antifongiques, antivirales) (Réhault-Godbert *et al.*, 2011). L'essentiel des activités de recherche de l'équipe Fonction et Régulations des Protéines de l'Oeuf de l'unité Recherches Avicoles (INRA) est centré principalement sur la caractérisation biochimique et fonctionnelle de ces molécules de défenses de l'œuf. Ces études sont menées afin d'explorer à terme leur variabilité génétique et phénotypique pour étudier la possibilité de sélectionner des animaux pondant des œufs présentant des systèmes de défense renforcés, ou de proposer des conditions optimales de stockage des œufs limitant ainsi le risque de toxi-infection alimentaires pour le consommateur.

Pour mener ces études, l'équipe s'appuie en partie sur la spécificité et le rôle de chacun des compartiments de l'œuf afin d'identifier et de caractériser l'ensemble des acteurs moléculaires de cette défense. L'œuf résulte du dépôt séquentiel, à la fois spatial et temporel, de protéines par les différents tissus reproducteurs de la poule. Les protéines du jaune sont essentiellement synthétisées dans le foie et sont acheminées par voie sanguine à l'ovaire pour être déposées dans les ovocytes en croissance. Après ovulation, le jaune d'œuf circule dans les différents segments de l'oviducte et s'entoure successivement de la membrane vitelline (infundibulum), du blanc (sécrété par le magnum), des membranes coquillières (isthme) et de la coquille (utérus) avant d'être pondu (oviposition). Cette spécialisation temporelle et tissulaire est particulièrement adaptée à une approche transcriptomique afin d'identifier les protéines spécifiques de chaque compartiment de l'œuf (jaune, membrane, blanc, coquille). Cette stratégie a été utilisée avec succès dans le cadre d'une thèse récente où la comparaison de l'expression des gènes dans l'utérus (coquille) *versus* le magnum (blanc) et l'isthme (membranes coquillières) a permis d'identifier les protéines impliquées dans la formation de la coquille (Jonchère, 2010). Pour ma part, je me suis intéressée à la spécificité d'expression des gènes du foie de poule en relation avec la formation du jaune d'œuf. La réalisation de ces approches a été rendue possible grâce aux différents projets internationaux de caractérisation des transcrits, la publication en 2004 de la séquence du génome de la poule, le développement de puces à ADNc ou à oligonucléotides, et le développement d'outils bioinformatiques de prédiction de fonctions, qui ont considérablement enrichi les bases de données. Ces données combinées aux diverses analyses protéomiques de l'œuf ont révélé de nombreux candidats

antimicrobiens et ouvert de nouvelles perspectives pour la caractérisation biochimique et fonctionnelle des molécules de l'œuf.

Parmi les molécules biologiquement actives de l'œuf, les protéases et antiprotéases sont largement représentées dans tous ses compartiments. D'une manière générale, les protéases et antiprotéases sont connues pour être impliquées dans de nombreux processus physiologiques (défense innée, fertilité, développement embryonnaire, inflammation, etc.) et pathologiques, que ce soit chez les procaryotes ou les eucaryotes. La publication récente de deux protéomes du jaune a révélé la présence de plusieurs protéases et antiprotéases dans ce compartiment (Mann *et al.*, 2008, Farinazzo *et al.*, 2009), mais leur fonction reste méconnue. Les données de la littérature suggèrent que les protéases et antiprotéases jouent un rôle dans la défense de l'hôte contre les pathogènes. Les protéases agiraient directement en dégradant les pathogènes alors que les antiprotéases agiraient indirectement, en inhibant les protéases microbiennes qui sont des facteurs de virulence majeurs.

La protection de l'œuf de table résulte de celle mise en place par la poule pour protéger l'embryon. Les protéases et antiprotéases de l'œuf participeraient à la défense de l'œuf embryonné dans la phase initiale du développement embryonnaire. Cependant, au cours de l'embryogenèse, les protéines du blanc sont assimilées par le futur poussin et la coquille est graduellement solubilisée (absorption du calcium, libération de protéines bioactives), ce qui conduit à une fragilisation des lignes de défenses majeures de l'œuf. Le jaune, quant à lui subit de nombreuses modifications physicochimiques au cours de l'incubation. Aussi, il est possible que des molécules antimicrobiennes soient activées/régulées par le système protéases/antiprotéases dans le jaune assurant un relai au système de protection initial.

L'objectif de cette thèse est d'identifier et de caractériser sur un plan biochimique et fonctionnel les protéases et antiprotéases présentes dans le jaune d'œuf.

La première partie de ce mémoire est consacrée à l'étude bibliographique qui présente la formation des différents constituants de l'œuf dont le jaune, la composition du jaune d'œuf et enfin la nature et le rôle des protéases et antiprotéases présentes dans ce compartiment. La deuxième partie du manuscrit présente les études expérimentales. Pour mener à bien notre projet, deux approches, l'une globale et l'autre ciblée ont été menées en parallèle. L'approche globale porte sur l'étude de l'expression des gènes du foie au moment de la mise en place de

la fonction de reproduction chez la poule (maturité sexuelle, capacité à pondre des œufs), ceci afin d'identifier les gènes surexprimés au cours de l'acquisition de la maturité sexuelle et notamment d'identifier les protéases et antiprotéases associées à la formation du jaune d'œuf. L'approche ciblée concerne la caractérisation de protéines candidates avec d'une part, l'étude de l'expression du gène de la « similar to nothepsin », et d'autre part la purification et l'étude des activités biologiques d'une antiprotéase, l'ovoinhibiteur. La dernière partie tirera des conclusions générales sur les résultats obtenus et analysera les perspectives découlant de ce travail.

II

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Formation de l'œuf

Les données présentées dans ce chapitre sont relatives à la composition de l'œuf et à sa formation et sont extraites des revues de Bernard Sauveur (Sauveur *et al.*, 1988) et de Yves Nys (Nys, 2010). Les références complémentaires correspondent à des résultats particuliers ou postérieurs à ces revues.

1.1. Anatomie et formation de l'appareil reproducteur femelle

Chez la poule, comme dans la plupart des espèces aviaires, seuls l'ovaire et l'oviducte gauches se développent et sont présents chez l'adulte en production. L'appareil reproducteur des oiseaux femelles se compose de deux parties : l'ovaire (lieu de formation du jaune) et l'oviducte (lieu de synthèse et dépôt des autres constituants tels que blanc, membranes coquillières et coquille).

1.1.1. Développement de l'appareil reproducteur durant la vie embryonnaire

1.1.1.1. *Mise en place de l'ovaire*

Jusqu'au 3^{ème} jour de la vie embryonnaire, les cellules germinales primordiales (futurs gamètes), s'accumulent à gauche et à droite de l'embryon. Au-delà du 8^{ème} jour, l'apport devient beaucoup plus important à gauche. C'est après le 7^{ème} jour que la différenciation sexuelle gonadique s'accomplit, et seule la gonade gauche se développe en ovaire, tandis que la gonade droite régresse.

1.1.1.2. *Mise en place de l'oviducte*

Durant les 4 premiers jours de la vie embryonnaire, l'oviducte se développe de façon symétrique à gauche et à droite de l'embryon (Guioli *et al.*, 2007). L'oviducte droit cesse de

croître au 8^{ème} jour. Celui-ci régressera ensuite jusqu'à ne constituer qu'un résidu de tissu médullaire au moment de l'éclosion. L'oviducte gauche sera le seul à se développer et constituera à l'âge adulte l'appareil génital fonctionnel. L'oviducte gauche se différencie dès le 12^{ème} jour en plusieurs segments : l'infundibulum, le magnum, l'isthme, l'utérus et le vagin.

1.1.2. Développement de l'appareil reproducteur après la naissance du poussin

Lors de l'éclosion, l'ovaire contient principalement du tissu conjonctif mais aussi des cellules interstitielles capables de sécréter des hormones. A 3 mois, il atteint une taille d'environ 1 cm et est constitué d'une partie centrale très irriguée, la *medulla*, et d'une partie périphérique, le cortex, qui prend un aspect granuleux dès 5 semaines d'âge lors du développement progressif des follicules. L'ovaire présente une croissance très rapide entre 16 et 20 semaines, passant de 5 à 60 g et pouvant atteindre 120 à 150 g chez une poule reproductrice alimentée à volonté. Son aspect est de plus en plus granuleux, jusqu'à former la grappe ovarienne. Les différences de taille entre follicules sont très marquées chez la poule pondeuse.

Après éclosion, la croissance de l'oviducte est sensiblement proportionnelle à celle de l'ovaire, qui tous deux sont sous la dépendance des sécrétions stéroïdiennes ovariennes. Chez l'embryon, l'oviducte a l'aspect d'un fil et pèse quelques milligrammes. Sa croissance et sa différenciation cellulaire se produisent essentiellement lors de la maturation sexuelle, 2 à 3 semaines avant la production du 1^{er} œuf (entre 13 et 16 semaines). Son poids augmente alors de moins de 1 g à plus de 40 g en 2 semaines; sa taille passe de 12-15 cm à 70 cm.

1.1.3. Anatomie de l'ovaire et de l'oviducte chez la poule adulte

La formation de l'œuf de poule se déroule en 2 étapes distinctes. Une première étape longue correspond au dépôt des constituants du jaune au niveau de l'ovaire au cours des 7 à 11 jours qui précèdent l'ovulation. La seconde étape courte, d'environ 24 heures, se produit dans l'oviducte après ovulation du jaune. C'est dans l'oviducte que sont déposés la membrane vitelline externe, le blanc, les membranes coquillières et la coquille. Ce dépôt est séquentiel dans le temps et l'espace.

A l'âge adulte, l'ovaire, lieu de la formation du jaune d'œuf (Fig. 1), est un organe largement différencié assurant deux fonctions : une de reproduction liée à la production de gamètes et une endocrine liée à la production d'hormones. L'ovaire est constitué de deux régions bien distinctes, une enveloppe externe ou cortex qui entoure une partie centrale très vascularisée : la zone médullaire. Le cortex contient les follicules ovariens, siège de l'ovogenèse et de la folliculogénèse. Chez la poule adulte, l'ovaire a l'aspect d'une grappe ovarienne présentant 7 à 10 follicules, dont le jaune est en phase d'accroissement rapide. Des milliers d'autres follicules sont apparents sur l'ovaire mais seule une partie d'entre eux se développera pour former un jaune.

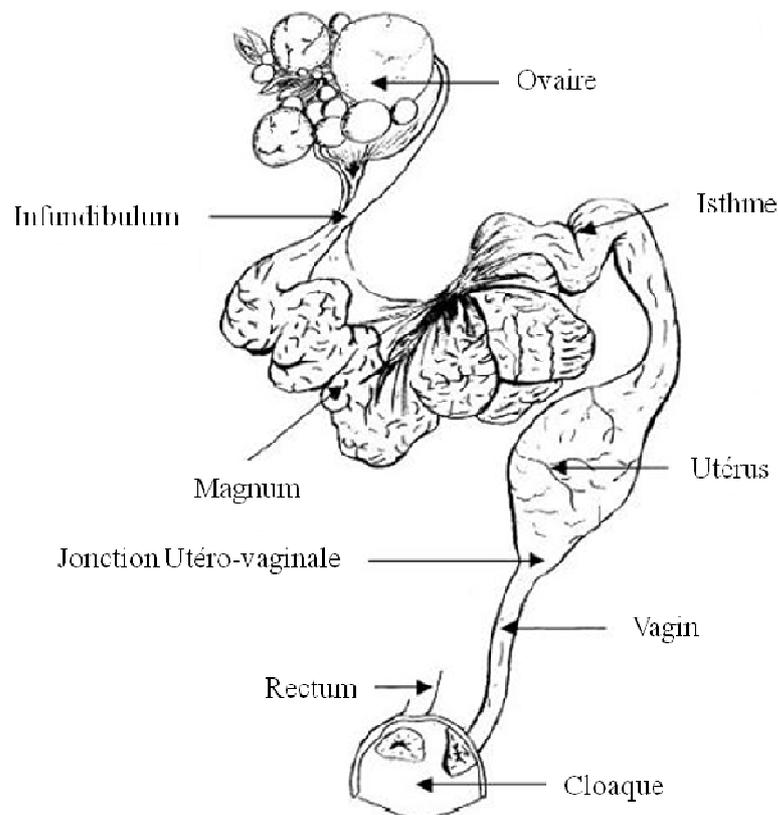


Figure 1 : Représentation de l'ovaire et de l'oviducte de poule mature (Nys *et al.*, 2004).

L'oviducte est le lieu de dépôt des autres constituants de l'œuf. *In situ*, il est en position latérale gauche, replié contre la paroi de l'abdomen. L'oviducte est vascularisé à

quatre niveaux à partir du système artériel général. Son innervation est particulièrement développée : elle joue un rôle essentiel dans la progression de l'œuf en formation.

De l'ovaire au cloaque, 6 régions anatomiques successives ayant chacune une fonction bien définie se distinguent (Fig. 1) :

– **L'infundibulum** (ou pavillon) : il est situé dans la partie haute de l'oviducte. En forme d'entonnoir et ouvert à son extrémité la plus large, il capte l'ovocyte au moment de l'ovulation. Sa paroi est particulièrement fine et sa muqueuse contient plusieurs espèces cellulaires ayant ou une fonction sécrétoire (dépôt des protéines formant la membrane périvitelline externe de l'œuf) ou une fonction de stockage des spermatozoïdes (glandes infundibulaires). L'infundibulum est le siège de la fécondation de l'œuf.

– **Le magnum** : (30 à 35 cm chez une poule adulte) zone dans laquelle l'albumen (ou blanc) est synthétisé puis déposé. Dans sa partie inférieure, le magnum est séparé de l'isthme par un net rétrécissement de son diamètre.

– **L'isthme** : moins long (environ 15 cm) et légèrement plus étroit que le magnum. C'est le lieu de formation des membranes coquillières. De couleur très comparable à celle du magnum dans la partie haute, la muqueuse devient rougeâtre dans la région proche de l'utérus. Les deux régions sont ainsi respectivement appelées isthme blanc et isthme rouge.

– **L'utérus** : partie la plus épaisse de l'oviducte. De forme plus ou moins arrondie, ses parois épaisses contiennent une musculature très développée. La muqueuse utérine est responsable de la sécrétion des constituants de la coquille. Cette muqueuse se distingue nettement de la muqueuse utéro-vaginale par l'absence d'orientation des replis.

– **La jonction utéro-vaginale** : (1 à 2 cm) elle possède une forme évasée se rétrécissant dans la partie basse. Elle est rattachée à l'utérus par une structure fibreuse épaisse. Cette région joue un rôle essentiel dans le stockage prolongé des spermatozoïdes (Bakst *et al.*, 1994).

– **Le vagin** : (environ 10 cm) partie la plus distale de l'oviducte et débouche dans le cloaque. Il est constitué d'une couche importante de tissus musculaires qui permettront l'expulsion finale de l'œuf (oviposition).

1.2. Formation du jaune

1.2.1. Développement de l'ovocyte

A l'éclosion, environ 12000 ovocytes primaires sont présents dans l'ovaire et constituent le stock définitif de gamètes pour la poule. A ce stade, les entrées en méioses des ovocytes sont terminées et leurs noyaux se trouvent en prophase de la première division méiotique. Moins de 2000 de ces ovocytes, présents au départ, feront l'objet d'un développement aboutissant à la production d'un jaune. La phase initiale d'accroissement lent affecte l'ensemble des ovocytes et prend place au cours des premières semaines après l'éclosion. Cette phase correspond à une individualisation des ovocytes par la mise en place de l'épithélium folliculaire, puis à une accumulation de protéines dans les ovocytes, issues de la *granulosa* ou du fluide périvitellin. Beaucoup de ces follicules primordiaux restent à l'état quiescent au cours des années suivantes et parmi eux, un grand nombre disparaît par atrophie. C'est donc un nombre limité de follicules qui poursuit sa croissance par accumulation de matériel protéique puis lipidique. Le bon déroulement du développement folliculaire nécessite une phase de sélection des follicules avec un décalage journalier. Ces follicules sélectionnés accumulent rapidement les protéines et lipides produits par le foie : c'est le stade de follicule en plein accroissement. A ce stade, le follicule possède une structure caractéristique (Fig.2). En effet, à partir de l'ovocyte interne, différentes couches se succèdent en commençant par une couche périvitelline acellulaire, avec ensuite la *granulosa*, la couche basale, les thèques internes et externes et enfin un tissu conjonctif. Cette structure particulière et fortement vascularisée permet de collecter les lipoprotéines circulantes et de les transférer vers le jaune (Moran, 1987).

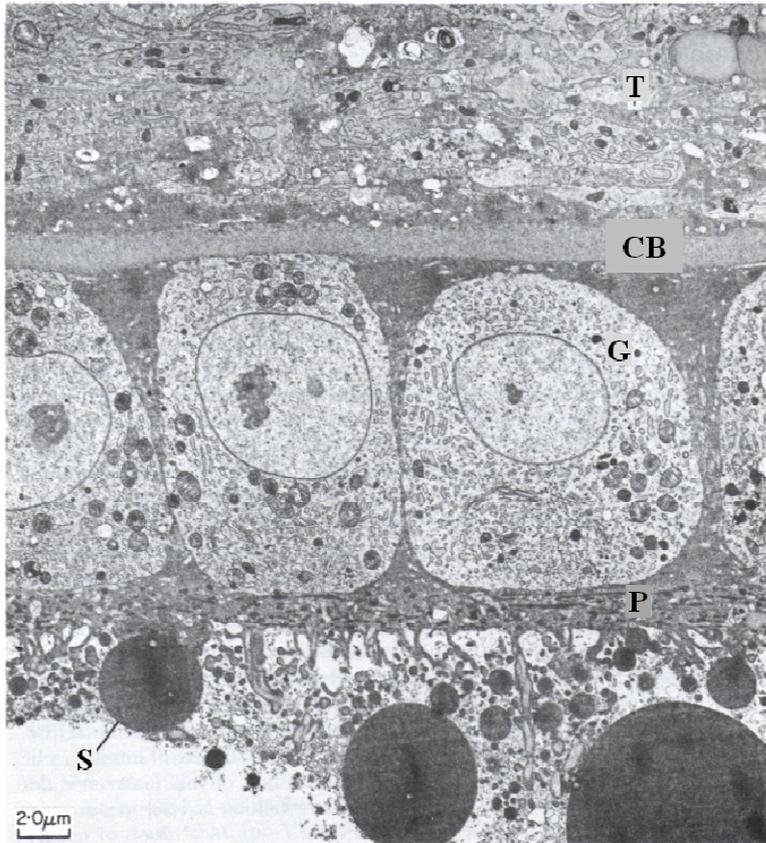


Figure 2 : Structure folliculaire avec thèques interne et externe (T), couche basale (CB), la *granulosa* (G); la couche acellulaire périvitelline (P) et les sphères constituant le jaune d'œuf (S) (Perry *et al.*, 1979)

La sélection des ovocytes et la hiérarchisation folliculaire est sous la dépendance des hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire et notamment les hormones gonadotrophines (luteinising hormone (LH) et la folliculo stimulating hormone (FSH)). La LH et la FSH sont fortement impliquées dans plusieurs processus : le développement ovarien, le développement des follicules et l'activation des sécrétions des stéroïdes ovariens (œstrogène, testostérone et progestérone). La FSH est responsable du recrutement initial et de la croissance des follicules. La FSH est active uniquement sur les follicules en phase initiale de grand accroissement, alors que la LH agit sur le follicule prêt à être ovulé. Les hormones intra-ovariennes elles, stimulent la croissance des follicules et réduisent leur atrophie.

1.2.2. Chronologie et régulation du dépôt du jaune (vitellogenèse)

Parallèlement à l'acquisition de la compétence ovocytaire, la vitellogenèse commence. Lors de cette phase, le vitellus (jaune) s'accumule dans l'ovocyte. La vitellogenèse est un processus qui débute chez la jeune poulette et se termine juste avant l'ovulation. Ainsi, 98% du jaune est déposé linéairement au cours des 7 à 11 jours qui précèdent l'ovulation. Le dépôt du jaune s'interrompt 2 à 3 heures avant l'ovulation. La production pratiquement journalière d'un œuf, est rendue possible grâce au développement simultané sur l'ovaire d'un ensemble d'environ huit follicules répartis selon une hiérarchie précise, aboutissant à la présence régulière d'un seul follicule prêt à ovuler.

La vitellogenèse comprend trois étapes :

1. La **phase initiale « d'accroissement lent »** correspondant au dépôt de quelques gouttelettes lipidiques. Il faudra 4 à 5 mois pour que les ovules passent d'un diamètre de 1 à 2 centièmes de millimètre à presque 1 mm.

2. La **phase « intermédiaire »** correspond au développement des follicules sélectionnés qui atteindront un diamètre de 4 mm. Elle se caractérise par un dépôt de protéines essentiellement mais également de quelques lipides. Cette phase se conduit sur 60 jours et aboutit à ce que l'on appelle le vitellus blanc.

3. La **phase de « grand accroissement »** se déroule 7 à 11 jours avant l'ovulation. La croissance de l'ovule s'accélère rapidement et son poids passe de 200 mg à 15-18 g. Durant cette phase, les couches successives de jaune sont déposées.

Sur l'ovaire d'une poule, 8 follicules environ sont simultanément en phase de grand accroissement avec un décalage initial d'une journée. La taille des follicules est ainsi hiérarchisée et en aucun cas anarchique.

La vitesse avec laquelle s'effectue cette croissance rapide du jaune varie avec l'âge de l'animal. Le poids des jaunes augmente avec l'âge de la poule.

1.2.3. Synthèse hépatique des constituants du jaune

A l'exception des immunoglobulines, l'essentiel des protéines du jaune, ainsi que les triglycérides, les phospholipides et le cholestérol sont synthétisés par le foie de la poule. Le besoin en protéines chez la poule sexuellement mature est fonction de ses besoins de maintien auxquels s'ajoutent ses besoins pour former un œuf (Moran, 1987). A la maturité sexuelle, la lipogenèse est multipliée par 10. L'acquisition de la maturité sexuelle chez la poule coïncide avec la forte stimulation de la synthèse de certaines protéines déjà fabriquées dans le foie de la poule immature, mais également avec l'induction de la synthèse de nouveaux constituants spécifiques du jaune. Cette synthèse hépatique des constituants du jaune est contrôlée par les œstrogènes produits principalement par la thèque des petits follicules. La production d'œstrogènes et de progestérone 2 à 3 semaines avant la production du premier œuf favorisent également la mise en place des organes reproducteurs et des caractères sexuels secondaires.

Au final le jaune est une émulsion d'eau, de lipoprotéines riches en triglycérides (Very Low Density Lipoproteins ou VLDL) et de protéines, essentiellement lipovitelline et phosvitine auxquelles s'ajoutent de nombreux constituants en quantité mineure.

1.2.4. Transfert des précurseurs plasmatiques et dépôt dans le jaune

Les précurseurs du jaune sont acheminés par voie sanguine *via* des VLDL de taille et de structure propres à la poule en production et sont transférés dans la paroi folliculaire *via* de grandes fenestrations des capillaires sanguins à ce niveau. La pénétration des précurseurs du jaune (VLDL et vitellogénine) dans le follicule, par endocytose est spécifique (Fig. 3). Cette intégration des constituants du jaune concerne d'autres protéines entrant dans la composition finale du jaune. C'est le cas pour certaines protéases et antiprotéases, la riboflavine et les immunoglobulines. Ces dernières ont un rôle primordial dans la défense innée de la poule.

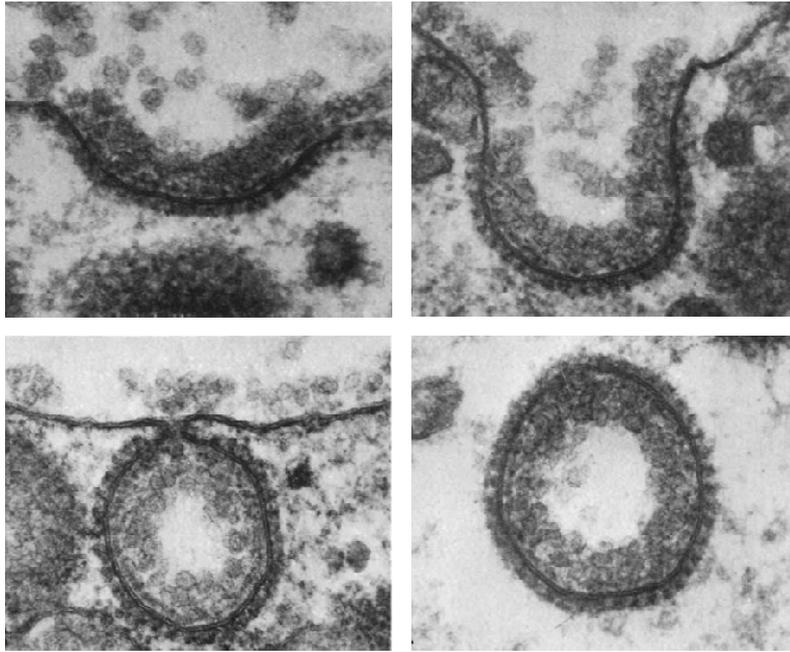


Figure 3 : Phénomène d'endocytose avec internalisation de granules au niveau de l'oocyte (Perry *et al.*, 1979)

1.3. Ovulation

L'ovulation du jaune précède l'oviposition (ponte) de 24-26 heures et se produit 15 minutes avant à 30 minutes après l'oviposition de l'œuf précédent. Le cycle ovulatoire est de 23 à 25 heures et est dépendant de la luminosité.

La production pratiquement journalière d'un œuf est permise par le développement simultané sur l'ovaire d'un ensemble de follicules répartis selon une hiérarchie précise. L'acquisition de la capacité à ovuler correspond à la maturation du follicule avec l'accroissement de l'ovule qui atteint une taille importante et la sécrétion en quantité abondante de la progestérone par le follicule, hormone devenant prépondérante quelques heures avant l'ovulation.

Lors de la phase pré-ovulatoire initiée par la décharge de LH, 6 heures avant l'ovulation, le tissu conjonctif est considérablement modifié au niveau du stigma (zone dépourvue de vascularisation) du follicule. A ce niveau, le collagène est partiellement dégradé et les liaisons

interfibrillaires sont digérées. Cette phase s'achève par la sortie du jaune, rendue possible grâce à la rupture locale de la paroi folliculaire au niveau du stigma. De nombreuses protéases interviennent dans ce processus.

1.4. Formation et dépôt des constituants de l'œuf

Lors de l'ovulation, le jaune est libéré et est capté par l'oviducte. Il y a alors dépôts successifs des autres constituants de l'œuf dans les différents segments de l'oviducte au cours d'un processus qui durera 23 à 25 heures (Fig. 4).

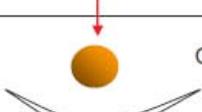
Repères anatomiques			Fonctions	Temps	
OVAIRE	Dimension (cm)	Follicules		Dépôt du jaune	150 j
	7			Ovulation	10 j
OVIDUCTE	9	Infundibulum		Fécondation	0
	33	Magnum		Dépôt du blanc	20 min
	10	Isthme		Dépôt des membranes coquillières	3 h 30
	10	Utérus		Dépôt de la coquille	1 h 15
	10	Vagin		Expulsion de l'œuf (oviposition)	21 h

Figure 4 : Cinétique des dépôts et lieu de formation de l'œuf de poule (Sauveur *et al.*, 1988).

Le jaune ovulé ne séjourne que quelques minutes dans l'**infundibulum** (siège de la fécondation). C'est dans l'infundibulum que la membrane vitelline externe est déposée (Bain *et al.*, 1969). L'ensemble des membranes vitellines ont une épaisseur totale de 8 à 11 μm . Elles sont constituées de glycoprotéines (GPM I, II, III), qui pourraient s'apparenter aux protéines majeures de la zone pellucide, et de nombreuses protéines dont il reste à explorer le rôle (Takeuchi *et al.*, 1999, Mann, 2008) (Fig. 4).

L'œuf en formation pénètre dans le **magnum** environ 20 minutes après l'ovulation et ressort 3 h 30 plus tard. Le jaune s'entoure alors des protéines du blanc (albumen) (Fig. 4). Toutes les protéines de l'albumen sont synthétisées puis sécrétées localement par le magnum (Etches, 1996, Nys *et al.*, 2004). La distension associée au passage de l'œuf en formation provoque la sécrétion rapide de ces protéines. L'albumen ne contient pas de lipides et est constitué à 88% d'eau, de protéines (90% de la matière sèche) et de glucose libre (3,5% de la matière sèche).

On distingue 4 zones dans le blanc d'œuf (Gilbert, 1971) (Fig. 5) :

- le blanc liquide interne présent entre le blanc épais et le jaune (17%) ;
- le blanc épais attaché aux deux extrémités de l'œuf et présentant l'aspect d'un gel (57%);
- le blanc liquide externe au contact des membranes coquillières (23%) ;
- les chalazes, filaments spiralés allant du jaune vers les deux extrémités de l'œuf à travers le blanc et assurant sa suspension (3%).

La texture « gélifiée » du blanc épais et des chalazes est en partie due à l'ovomucine molécule fortement glycosylée en interaction avec d'autres protéines.

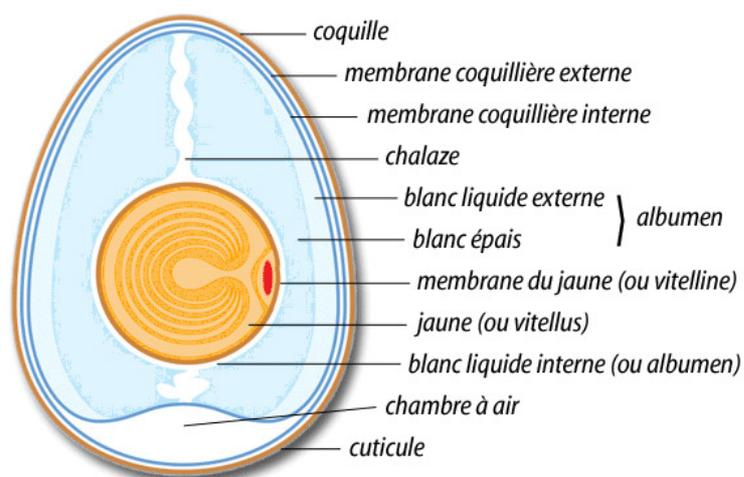


Figure 5 : Représentation schématique de l'œuf pondue.

Le tableau 1 indique la proportion des protéines majeures du blanc d'œuf. La composition du blanc d'œuf a récemment été complétée par des analyses protéomiques (Guérin-Dubiard *et al.*, 2006, Mann, 2007, D'Ambrosio *et al.*, 2008). Ces études ont permis l'identification de 148 protéines différentes. Parmi celles-ci, de nombreuses protéines présentent des activités antimicrobiennes potentielles ou avérées.

Tableau 1 : Principales protéines du blanc d'œuf (Li-Chan *et al.*, 1989).

Protéines	%	Caractéristiques importantes
Ovalbumine	54	Phosphoglycoprotéine immunogénique
Ovotransferrine	12	Fixe le fer, antimicrobien
Ovomucoïde	11	Inhibiteur de trypsine
Ovomucine	1,5-3,5	Viscosité; hémagglutination virale
Lysozyme	3,4-3,5	Lyse les parois des bactéries Gram+ ; antimicrobien
Globuline G1	4	Antibactérien
Globuline G2	4	Antibactérien
Ovoinhibiteur	0,1-1,5	Inhibiteur de protéase à serine
Ovoglycoprotéine	0,5-1,0	
Flavoprotéine	0,8	Fixe la riboflavine
Ovomacroglobuline	0,5	Propriétés antigéniques
Cystatine	0,005	Inhibiteur des protéases à SH
Avidine	0,005	Fixe la biotine ; antimicrobien

L'œuf en formation pénètre dans l'**isthme** 3 heures 30 après l'ovulation du jaune. Il séjournera dans ce segment pour une durée de 1 heure environ (Fig. 4). Deux phénomènes s'y produisent : tout d'abord le recouvrement des protéines du blanc par des fibres protéiques dans l'isthme blanc. Cet entrelacement de fibres constituera les membranes coquillières. Vient ensuite le dépôt dans l'isthme rouge d'amas organiques en surface des membranes coquillières externes. Ces amas constituent les noyaux mamillaires à partir desquels la minéralisation sera initiée.

L'œuf pénètre dans l'**utérus** environ 5 heures après l'ovulation du jaune (Fig.4). Il y séjournera 19 heures environ. Durant les six à sept premières heures de séjour de l'œuf dans l'utérus, les protéines du blanc sont hydratées et la teneur en eau du blanc double passant de 3,5 à 7 g d'eau par gramme de matière sèche. Ce phénomène appelé « plumping », donne à l'œuf sa forme ovoïde définitive et lui permet d'être en contact étroit avec les parois de l'utérus. Une fois l'hydratation des protéines du blanc achevée, la minéralisation de la coquille commence dans le fluide utérin. Cette minéralisation est produite par précipitation de carbonate de calcium associé à des constituants organiques. L'œuf ainsi constitué transite alors par le vagin et le cloaque avant d'être pondue (oviposition), 24 heures environ après l'ovulation du jaune et sa captation par l'oviducte (Fig. 4). L'expulsion de l'œuf de l'oviducte, ou oviposition, résulte d'un ensemble de facteurs physiologiques coordonnés dans le temps, qui provoque une contraction des muscles de l'utérus et une relaxation du vagin, aboutissant à l'expulsion de l'œuf en quelques minutes (Saito *et al.*, 1988). L'œuf ainsi achevé (Fig. 4, 5), contient une réserve de nutriments divers ainsi que des éléments protecteurs indispensables au développement extra-utérin de l'embryon.

2. Le jaune d'œuf

Les données présentées dans ce chapitre sont relatives à la formation et la composition du jaune d'œuf et sont extraites des revues de Yves Nys (Nys, 2010), de Marc Anton (Anton, 2007) et de Catherine Guérin-Dubiard (Guérin-Dubiard *et al.*, 2010). Les références complémentaires correspondent à des résultats particuliers ou postérieurs à ces revues.

2.1. Structure et composition du jaune d'œuf

2.1.1. Composition biochimique globale

Le jaune d'œuf représente près de 30% du poids de l'œuf entier. Il contient plus de 50% de matière sèche et tous les lipides de l'œuf. Le jaune est principalement composé de lipides et protéines (Tableau 2). Les lipides représentent 65% de la matière sèche du jaune et se répartissent entre les triglycérides (62%), les phospholipides (33%) et le cholestérol (< 5%). Les protéines représentent 16% de la matière sèche du jaune. La majeure partie des protéines est associée aux lipides pour former les lipoprotéines de basse densité (LDL) et des lipoprotéines de haute densité (HDL). Le reste des protéines se présente sous forme libre et correspond à des protéines globulaires (livétine, phosvitine et protéines mineures).

Tableau 2 : Composition du jaune d'œuf de poule (Powrie *et al.*, 1986).

Constituants du jaune d'œuf	% de la matière sèche
Lipides	62,5
Protéines	33,0
Glucides	1,2
Cendres	3,5

2.1.2. Structure du jaune d'œuf

Le jaune d'œuf possède une macrostructure complexe se présentant sous forme d'une émulsion de particules lipidiques dispersée dans une solution aqueuse de protéines.

Le jaune, lorsqu'il est dilué et centrifugé, peut être séparé en 2 fractions : le surnageant fluide et translucide est appelé plasma et le culot blanchâtre représente les granules. En fonction de la méthode de fractionnement du jaune d'œuf, la nature des molécules dans chacune de ces fractions peut varier (Anton *et al.*, 1997, Mann *et al.*, 2008, Farinazzo *et al.*, 2009). Cependant lorsque le jaune d'œuf est dilué dans une solution isotonique et centrifugé à faible vitesse (10000 g), les LDL et les protéines hydrosolubles se retrouvent dans le **plasma**, alors que les HDL, la phosvitine et certains LDL résiduels se retrouvent dans les **granules** (Fig. 6). Le fractionnement du jaune d'œuf par centrifugation est souvent une étape préalable à la purification de ses constituants.

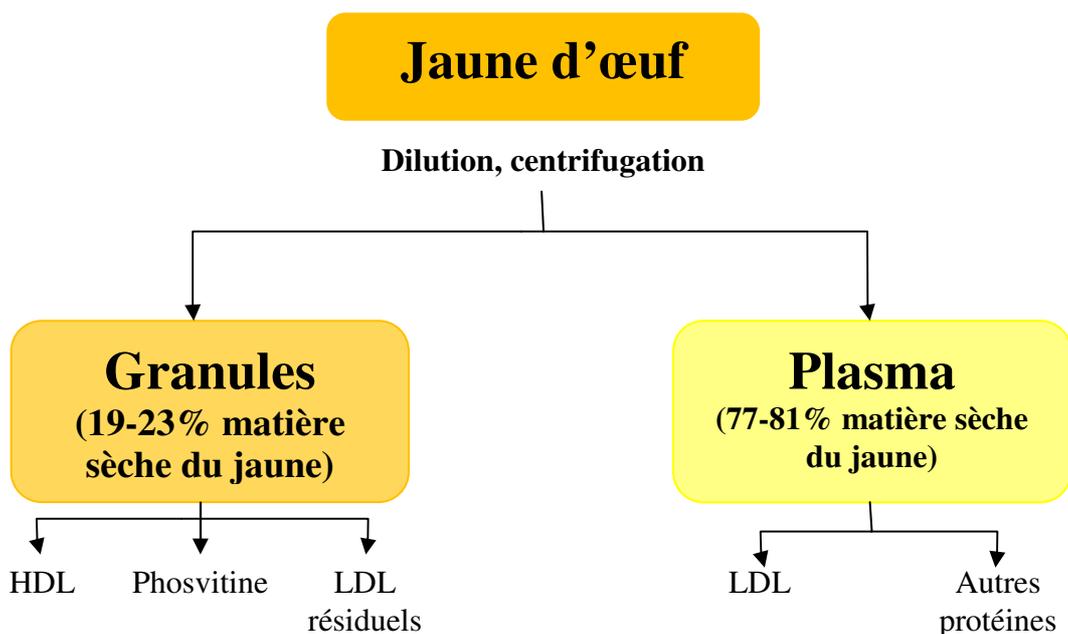


Figure 6 : Schéma de séparation et composition des fractions du jaune d'œuf.

Les granules, de part leur composition en HDL et phosvitine fortement liés entre eux par des ponts phosphocalciques, ont une structure compacte, peu hydratée, peu accessible aux enzymes et protègent les protéines qu'ils renferment contre la dénaturation. La solubilisation des granules est possible lorsque le milieu est fortement acidifié ou alcalinisé. Cette

solubilisation est réversible. Il est également possible de dissocier les granules en augmentant la force ionique du milieu par l'ajout de chlorure de sodium.

2.1.3. Constituants majeurs du jaune d'œuf

2.1.3.1. Lipoprotéines de faible densité (LDL)

Les LDL sont les constituants majeurs du jaune d'œuf. Elles contiennent entre 83 et 89% de lipides et 11 à 17% de protéines.

Les LDL comprennent un noyau de lipides neutres (triglycéride et ester de cholestérol) entouré par une monocouche de phospholipides et de protéines en contact avec la phase aqueuse (Fig. 7).

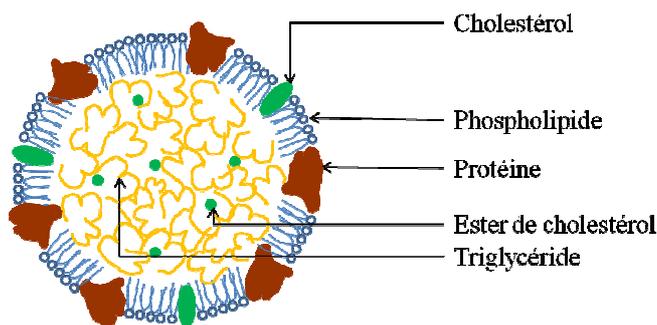


Figure 7 : Représentation schématique des LDL du jaune d'œuf

Les LDL du jaune sont issus de lipoprotéines précurseurs synthétisées dans le foie de la poule, les VLDL (lipoprotéines de très faible densité).

Des VLDL sont synthétisées dans le foie de jeunes poulettes mais leur production hépatique est très fortement augmentée lors de l'acquisition de la maturité sexuelle de la poule. Chez les poules sexuellement matures, ces VLDL possèdent une structure et une composition particulière. Elles sont transportées par le flux sanguin jusqu'à l'ovocyte (formation de l'œuf). Leur concentration sanguine s'accroît d'un facteur 20 environ au cours de l'acquisition de la maturité sexuelle, pour atteindre la concentration de 10 à 20 g/L chez la

poule. La taille de ces VLDL est très homogène chez la poule sexuellement mature, ce qui facilite leur transfert dans le jaune d'œuf. Ce transfert se fait *via* des fenestrations, au diamètre bien défini, dans la paroi des vaisseaux sanguins près des ovocytes. Des récepteurs spécifiques de membrane de l'ovocyte permettent la fixation des VLDL et leur internalisation par endocytose dans le follicule en croissance (Fig. 3).

Les VLDL des poules sexuellement matures contiennent 2 protéines particulières : l'apo-VLDL-II et l'apo-B. La synthèse de **l'apo-VLDL-II** est strictement dépendante des œstrogènes et est présente uniquement chez la poule sexuellement mature. Elle est produite sous une forme pré-apolipoprotéine où la présence d'un peptide de 24 résidus empêche sa liaison aux lipides membranaires. Cette protéine protégerait les VLDL contre l'action des lipases, au cours de leur transfert du foie vers la circulation sanguine, jusqu'aux follicules ovariens en croissance (Schneider *et al.*, 1990). **L'apo-B** est la protéine majeure des VLDL. Présente chez la poulette, sa synthèse hépatique est également très fortement stimulée par les œstrogènes au cours de l'acquisition de la maturité sexuelle. L'apo-B est une protéine hydrophobe de haut poids moléculaire qui participe à la stabilisation des VLDL.

2.1.3.2. *Livétines*

Les livétines désignent les protéines globulaires présentes dans le plasma. Ces livétines ne sont pas liées à des lipides. Elles représentent 11% de la matière sèche du jaune et 30% de ses protéines. Ce sont des protéines sanguines déposées dans le jaune d'œuf sans modification. Plusieurs types de livétines sont présentes : la livétine α ou albumine sérique, la livétine β et la livétine γ qui correspond aux immunoglobulines du jaune d'œuf (IgY) (Moran, 1987).

2.1.3.3. *Lipoprotéines de haute densité (HDL)*

Les HDL représentent environ 17% de la matière sèche du jaune et 36% de ses protéines. Ce sont des dimères composés de 80% de lipides et 20% de protéines. Les HDL sont issues des vitellogénines qui sont des macroprotéines synthétisées par le foie. Les vitellogénines subissent une protéolyse par la cathepsine D après leur transfert dans le jaune. Elles se dissocient en un complexe HDL-phosvitine et lipovitelline.

La synthèse des vitellogénines I, II et III est inexistante chez la poule sexuellement immature. Cette synthèse débute lors de l'acquisition de la maturité sexuelle et est œstrogène dépendante. Les vitellogénines subissent de nombreuses modifications post-transcriptionnelles dans le foie (phosphorylation et glycosylation de la phosvitine, lipidation des lipovitellines) avant d'être secrétées dans le plasma, pour être captées au niveau du jaune d'œuf par un récepteur spécifique, et intégrées par endocytose. Ce récepteur membranaire pourrait être identique à celui des LDL (Schneider, 2009).

La phosvitine représente 3% de la matière sèche du jaune et est le deuxième constituant des granules après les HDL. C'est une protéine fortement phosphorylée, qui représente à elle seule 80% du phosphore lié aux protéines du jaune d'œuf. La phosvitine est une protéine extrêmement hydrophile. Elle possède une forte affinité pour les cations, ce qui en fait le premier transporteur de fer dans le jaune d'œuf (Greengard *et al.*, 1964). La phosvitine est également capable de lier d'autres ions tels que le calcium, le magnésium, le manganèse ou le cobalt.

2.1.3.4. *Les lipides*

Composants principaux du jaune (60%), les lipides sont distribués dans les lipoprotéines (LDL et HDL). Ces lipides sont composés de triglycérides (65%), phospholipides (29%), de cholestérol (5%) et d'acides-gras libres (< 1%).

Les **triglycérides** possèdent une répartition en acides-gras très proche des lipides totaux, avec environ 30-35% d'acides gras saturés, 40-45% d'acides gras mono-insaturés et 20-25% d'acides gras polyinsaturés.

Les **phospholipides** présentent une forte proportion en acides gras polyinsaturés. Ils se composent principalement de la phosphatidylcholine (76%) et de la phosphatidyléthanolamine (20%). D'autres phospholipides sont présents à l'état de trace.

Le **cholestérol** représente 5% des lipides totaux du jaune. Le transport du cholestérol vers le jaune se fait *via* les VLDL et dans une moindre mesure *via* les vitellogénines. La

concentration du cholestérol dans le jaune d'œuf ne dépend donc que de sa concentration dans les VLDL. Ce cholestérol est essentiel pour l'établissement de la structure et les propriétés des VLDL.

2.1.3.5. *Les vitamines et les pigments*

Le jaune contient également des molécules liposolubles telles que les vitamines A, D, E et les caroténoïdes. Les **caroténoïdes** sont les colorants du jaune. Ils lui confèrent sa couleur allant du jaune très pâle à l'orange soutenu. Ce sont essentiellement des xanthophylles. Les caroténoïdes proviennent exclusivement de l'alimentation.

2.1.3.6. *Les protéines mineures du jaune*

De nombreuses autres protéines entrent dans la constitution du jaune d'œuf. La plupart d'entre elles sont faiblement concentrées dans le jaune, et leur identification a été possible avec l'avènement des techniques à haut débit telle que la protéomique. Ces analyses protéomiques ont permis de mettre en évidence à ce jour 260 protéines dans le jaune (Mann *et al.*, 2008, Farinazzo *et al.*, 2009). Ces études ont confirmé la présence dans le jaune de protéines majeures (albumine sérique, apovitellénines, phosvitine, glycoprotéines du jaune, vitellogénines), mais aussi des molécules mineures telles que des apolipoprotéines, des protéines liant des vitamines (rétinol, vitamine D, biotine, riboflavine), des immunoglobulines Y, des protéases et antiprotéases, des enzymes antioxydantes et d'autres protéines retrouvées dans le sérum sanguin.

2.2. Les fonctions biologiques des molécules du jaune d'œuf

2.2.1. Fonction nutritive

L'ensemble des protéines du jaune d'œuf constitue une réserve de nutriments remarquable pour l'embryon. Ces protéines sont parfaitement digestibles, en accord avec le développement de l'embryon dans une enceinte close sans possibilité d'évacuation des déchets. Outre cette valeur nutritive, nombre des protéines du jaune portent également des

activités biologiques propres, de transport et de stockage de vitamines (« riboflavin-binding protein », « vitamin-D-binding protein », avidine) ou d'ions métalliques (ovotransferrine, phosvitine), d'activités inhibitrice de lipases (apovitellenine), etc. De nombreuses autres activités biologiques potentielles ont été avancées par comparaison avec des homologues présents dans les autres espèces (Mann *et al.*, 2008, Farinazzo *et al.*, 2009, D'Alessandro *et al.*, 2010).

2.2.2. Protection de l'embryon

Le jaune d'œuf possède plusieurs molécules ayant un potentiel antimicrobien. Ces molécules sont de 2 natures : les immunoglobulines de l'immunité adaptative et les protéines du système de défense innée (Réhault-Godbert *et al.*, 2011).

Les immunoglobulines sont transmises de la poule vers l'embryon *via* le jaune d'œuf (Morrison *et al.*, 2002). Elles participent à l'immunité de l'embryon en développement puisque que le système immunitaire du poussin ne se met en place que plus tardivement, après éclosion. Cette composante « immunoglobuline » joue un rôle majeur dans la protection précoce de l'embryon.

Les protéines du système de défense inné du jaune d'œuf regroupent essentiellement les protéines chélatrices de fer ou de vitamines, le lysozyme, des antiprotéases et d'autres protéines telles que les histones (Maclachlan *et al.*, 1994, Réhault *et al.*, 2007, Mann *et al.*, 2008, Farinazzo *et al.*, 2009, Réhault-Godbert *et al.*, 2011).

3. Les protéases et les antiprotéases du jaune d'œuf

Les protéases et antiprotéases sont des familles de protéines ubiquistes dans le monde vivant et sont connues pour intervenir dans de nombreux processus physiologiques (défense innée, fertilité, développement embryonnaire, inflammation, etc.) et pathologiques. Cependant leur fonction reste méconnue dans le jaune d'œuf, et la question sera à terme de savoir si ces protéases/antiprotéases ont un rôle dans la défense antimicrobienne de l'œuf, la formation et/ou la maturation des protéines du jaune, ou le remodelage tissulaire lors de l'ovulation ou lors du développement embryonnaire (angiogénèse).

Au moins 17 protéases et 20 antiprotéases sont présentes dans le jaune d'œuf d'après les approches protéomiques (Tableaux 3 et 4). La plupart de ces protéases sont des protéines prédites (« similar to ») qui possèdent des homologues chez d'autres espèces animales. Les informations de fonctions relatives à ces protéines n'ont à l'heure actuelle pas été vérifiées chez le poulet ou dans le jaune d'œuf, mais fournissent néanmoins des pistes de recherche intéressantes.

3.1. Les protéases

Les protéases sont des protéines ubiquistes retrouvées à tous les niveaux du règne vivant : animal, végétal et microbien. Leur importance biologique est notamment illustrée par le fait que 2%, voir plus, des gènes totaux, codent des protéases ou leurs homologues, tous organismes vivants confondus (Rawlings *et al.*, 1999). Les protéases forment un ensemble très hétérogène puisqu'elles vont du monomère de 10 kDa au complexe multimérique de plusieurs centaines de kDa (Sajid *et al.*, 2002). En 2008, 66000 séquences de protéases ont été classifiées en 50 clans et 184 familles (Page *et al.*, 2008), mais avec l'avènement des techniques à haut débit, le nombre de séquences de protéases ne cesse de croître.

Les protéases sont des enzymes protéolytiques, qui hydrolysent les liaisons peptidiques de protéines ou fragments de protéines (Barrett *et al.*, 2001). Cette hydrolyse peut être initiée soit au centre de la séquence polypeptidique (endopeptidase), soit à partir des extrémités en NH₂ ou COOH-terminal (exopeptidase). Il est estimé que sans la présence des protéases, des centaines d'années seraient nécessaires pour hydrolyser une liaison peptidique, alors que les protéases sont capables d'en dégrader plus d'un million par seconde (Sajid *et al.*, 2002). Ce processus d'hydrolyse est essentiel à la synthèse de toutes les protéines puisqu'il permet de contrôler leur taille, leur composition, leur structure tridimensionnelle, leur turnover et enfin leur destruction ultime (Seife, 1997). Elles jouent un rôle important de régulation dans la conception, la naissance, la digestion, la croissance, le vieillissement et même la mort de tous les organismes (Shen *et al.*, 2009).

Les protéases diffèrent entre elles de par la position et la nature de la liaison peptidique qu'elles sont capables d'hydrolyser et la séquence en acides-aminés qui entoure cette liaison (Barrett *et al.*, 2001). La spécificité d'action des protéases est étudiée *via* l'interaction entre les résidus P1/S1 selon la nomenclature de Schechter et Berger (Schechter *et al.*, 1967) (Fig. 8). Le substrat peptidique est divisé entre les acides aminés allant du site de clivage vers le NH₂-terminal nommés P₁, P₂, P₃, etc. et ceux situés entre le site de clivage et le COOH-terminal nommé P₁', P₂', P₃', etc. (Kraut, 1977). Le résidu P1 est l'acide aminé qui définit, par sa nature, la spécificité d'action de la protéase. Les poches S1 et S1', quant à elles, représentent les acides aminés de la protéase qui interagissent avec le substrat ou l'inhibiteur (Hedstrom, 2002). Avant l'hydrolyse de la liaison peptidique, la protéase doit se fixer sur la protéine ou le substrat peptidique au niveau de son site actif. L'efficacité de cette fixation dépend de l'environnement chimique créé par la protéase et de la nature chimique du peptide qui interagit directement avec le site actif. Bien qu'une seule liaison peptidique soit dégradée au cours de cette protéolyse, de nombreux acides-aminés de chaque côté du site de clivage sont décisifs pour déterminer la spécificité d'une protéase (Sajid *et al.*, 2002).

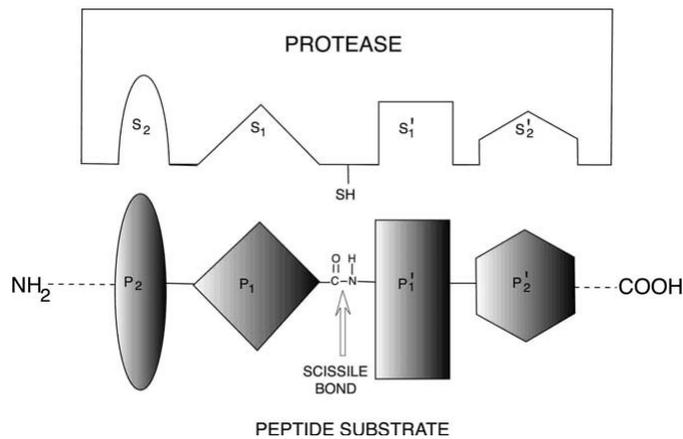


Figure 8 : Représentation de l'interaction entre le substrat (peptide substrat) et la protéase (ici une protéase à cystéine présentant un groupement -SH) (Sajid *et al.*, 2002).

Initialement 4 groupes de protéases ont été définis en fonction de la nature du ou des acides aminés du site actif impliqués dans la catalyse : les protéases à sérine, les protéases à cystéine, les protéases acides (protéases à aspartate), et les métalloprotéases (Rawlings *et al.*, 1993). Plus récemment, 3 autres groupes ont été décrits : les protéases à thréonine, les protéases à acide glutamique et les protéases à asparagine (Rawlings *et al.*, 2004b). Chaque groupe de protéases comprend plusieurs familles. Chacune des familles regroupe les protéases ayant des séquences peptidiques significativement similaires (Barrett *et al.*, 2001). Les clans réunissent les familles ayant *a priori* une évolution commune sans qu'il y ait de séquences significativement similaires d'un point de vue statistique (Rawlings *et al.*, 1993).

Dans le chapitre qui suit, nous nous intéresserons aux 4 familles principales, les protéases à sérine, les métalloprotéases, les protéases à cystéine, et les protéases à aspartate, dans la mesure où aucune protéase à thréonine, à asparagine ou à glutamate n'a été retrouvée dans les analyses protéomiques du jaune (Tableau 3).

Tableau 3 : Liste des protéases identifiées dans le jaune d'œuf, d'après les études protéomiques de Mann *et al.* (Mann *et al.*, 2008) et Farinazzo *et al.* (Farinazzo *et al.*, 2009)

Nom des protéases	Famille
<i>Protéases à aspartate</i>	
Similar to nothepsin	Peptidase A1
<i>Protéases à cystéine</i>	
Similar to ubiquitin specific protease 42	Peptidase C19
<i>Métalloprotéases</i>	
Aminopeptidase N	Peptidase M1
Similar to carboxypeptidase D	Peptidase M14
Similar to thrombin-activable fibrinolysis inhibitor	Peptidase M14
<i>Protéases à sérine</i>	
Anticoagulant protein C	Peptidase S1
Coagulation factor IX	Peptidase S1
Coagulation factor X	Peptidase S1
Complement factor B-like protease	Peptidase S1
Hepatocyte growth factor like	Peptidase S1
Similar to complement component C2	Peptidase S1
Similar to Hepatocyte growth factor activator	Peptidase S1
Similar to plasminogen	Peptidase S1
Similar to transmembrane protease serine 13	Peptidase S1
Similar to transmembrane protease serine 9	Peptidase S1
Thrombin	Peptidase S1
56 kDa protein	Peptidase S10

3.1.1. Les protéases à sérine

3.1.1.1. Mode d'action des protéases à sérine

Dans le monde vivant, plus d'une protéase sur trois est une protéase à sérine. Ce groupe est très largement représenté dans la nature et est retrouvé à tous les niveaux de la vie cellulaire ainsi que dans de nombreux génomes viraux (Page *et al.*, 2008). La plupart des protéases à sérine sont des endopeptidases hydrolysant les protéines au milieu de leur chaîne peptidique. Cependant plusieurs protéases à sérine sont des exopeptidases qui excisent un ou plusieurs acides aminés à la fin de la séquence peptidique. Classiquement ces protéases sont actives à pH neutre à alcalin (Page *et al.*, 2008).

Les protéases à sérine doivent leur nom à la présence d'une sérine incluse dans une triade catalytique caractéristique comprenant donc une sérine, mais aussi une histidine et un aspartate (Fig.9) (Page *et al.*, 2008).

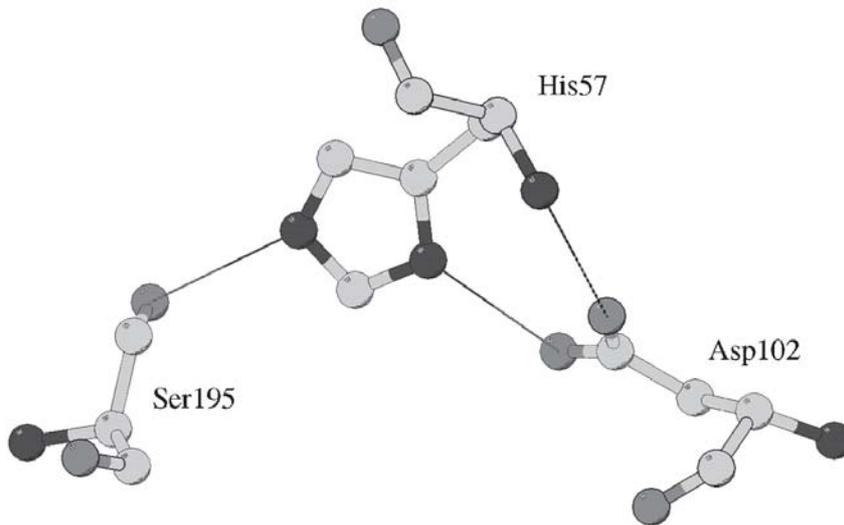


Figure 9 : Triade catalytique de la chymotrypsine (Polgar, 2005)

Le site actif des protéases à sérine est nécessaire et suffisant pour connaître leur spécificité et leur évolution (Krem *et al.*, 2000). Cependant, la spécificité d'action de ces protéases n'est pas simplement contrôlée par l'interaction entre les résidus P1/S1 et les autres résidus entourant le site actif, elle résulte plutôt d'une propriété de la structure de la protéine entière, contrôlée par la distribution des charges à travers un réseau de liaisons hydrogènes et peut-être aussi par la structure tertiaire de la protéase et du substrat correspondant (Hedstrom, 2002). Le segment en COOH-terminal du domaine protéase joue également un rôle dans la reconnaissance du substrat (Krem *et al.*, 2000).

A l'heure actuelle les protéases à sérine sont classées en 13 clans et 47 familles (Merops, August 2011 (Release 9.5)) (annexe 1).

Les protéases à sérine sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que la digestion (trypsine, chymotrypsine), l'homéostasie, la transduction du signal, les réponses immunes (facteurs du complément B, C, D), la coagulation sanguine (thrombine,

facteurs VIIa, IXa, Xa, XIIa), la fibrinolyse, la reproduction (acrosine), le développement embryonnaire, le remodelage tissulaire, la différenciation et la cicatrisation (Rawlings *et al.*, 1993, Hedstrom, 2002, Polgar, 2005). L'activation de ces protéases requiert la protéolyse d'un précurseur (zymogène) inactif. Ce précurseur pro-protéique est clivé à la même position pour tous les membres du clan (Page *et al.*, 2008).

3.1.1.2. *Les protéases à sérine du jaune*

Dans le jaune d'œuf, les protéases à sérine constituent le groupe de protéases le plus représenté (Tableau 3). Un grand nombre de ces protéases a été décrit initialement chez d'autres organismes et parfois chez le poulet comme des facteurs clefs du système coagulation/fibrinolyse (thrombine, facteurs IX et X, « Anticoagulant protein C », « hepatocyte growth factor like », « hepatocyte growth factor activator », « plasminogen » (Walsh *et al.*, 2002, Miyazawa, 2010) ou des protéines du complément faisant partie de l'immunité innée (« complement factor B-like protease », « similar to complement component C2 ») (Kjalke *et al.*, 1993, Sim *et al.*, 2000).

3.1.2. Les métalloprotéases

3.1.2.1. *Mode d'action des métalloprotéases*

Les métalloprotéases sont des protéases dont l'activité est dépendante de la présence de zinc ou de calcium (Borkakoti, 1998). A l'heure actuelle, elles sont classées en 62 familles et 14 clans (Merops, August 2011 (Release 9.5)) (Annexe 2)

Les métalloprotéases sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que la reproduction, le développement embryonnaire, l'implantation des blastocystes, l'ovulation, la morphogénèse, la formation osseuse, la croissance, le remodelage osseux, la cicatrisation, l'angiogénèse et l'apoptose (Hooper, 1994, Borkakoti, 1998, Woessner, 2002).

Les premières **MMPs** (« Matrix MetalloProteinases ») ont été identifiées il y a près de 50 ans et étaient connues pour avoir une activité collagénase. Au delà de leur première fonction de collagénases, les MMPs se sont avérées capables de dégrader de nombreux

composants de la matrice extracellulaire et ont été donc identifiées comme étant les principaux agents du remaniement des composés de cette matrice (Tallant *et al.*, 2010). Les MMPs sont caractérisées par la présence de 3 domaines conservés : (1) le propeptide en NH₂-terminal (qui recouvre le site actif jusqu'à son activation), (2) leur domaine catalytique incluant la séquence consensus **His-Glu-Xaa-Xaa-His-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-His** qui contient 2 atomes de zinc et de nombreux atomes de Calcium, et (3) le domaine de type hémopexine en COOH-terminal impliqué dans la reconnaissance macromoléculaire du substrat. Le propeptide se compose de 80-90 acides-aminés dont un résidu cystéine qui interagit avec l'atome zinc du site catalytique *via* son groupement thiol. Le domaine de type hémopexine, quant à lui, joue un rôle fonctionnel dans la fixation du substrat (Borkakoti, 1998, Massova *et al.*, 1998, Tallant *et al.*, 2010). *In vitro*, les pro-métalloprotéases sont activées par d'autres protéases ou par des agents non protéolytiques tels que des agents possédant des groupements soufre actifs, des groupements oxygène actifs ou des agents dénaturants. *In vivo*, les pro-métalloprotéases sont activées par des protéases tissulaires ou plasmatiques et, dans le cas de pathologies, par des protéases bactériennes (Nagase *et al.*, 1999). L'activité catalytique des MMPs est régulée à différents niveaux : la transcription, la sécrétion, l'activation et l'inhibition. En effet, la plupart des métalloprotéases ne sont exprimées et transcrites qu'après induction par des cytokines ou des facteurs de croissance. Certaines métalloprotéases sont stockées dans les granulocytes ce qui restreint leur panel d'action. Le dernier niveau de régulation de leur activité passe par l'activation de la métalloprotéase avec le clivage du pro-peptide (Massova *et al.*, 1998, Clark *et al.*, 2008, Tallant *et al.*, 2010).

3.1.2.2. *Les métalloprotéases du jaune*

Trois métalloprotéases ont été identifiées dans le jaune (Table 3). L'aminopeptidase N (ou Ey) est une enzyme ayant une large spécificité d'action (Tanaka *et al.*, 1993). Elle joue un rôle chez les mammifères dans la phase finale de digestion des peptides générés par les protéases gastriques et pancréatiques. Dans l'œuf, elle pourrait intervenir au cours du développement embryonnaire pour dégrader des molécules permettant ainsi l'assimilation des nutriments par l'embryon (Yadgary *et al.*, 2011). Le rôle de la « similar to carboxypeptidase D » n'a pas encore été exploré et sa fonction chez d'autres organismes n'est

pas clairement définie. La « similar to thrombin-activable fibrinolysis inhibitor », est quant à elle, exprimée chez les mammifères par le foie, pour se retrouver dans le plasma, où elle joue un rôle prépondérant dans la régulation de la fibrinolyse (Wang *et al.*, 1998). Son rôle dans l'œuf reste méconnu.

3.1.3. Les protéases à cystéine

3.1.3.1. *Mode d'action des protéases à cystéine*

Les protéases à cystéine sont majoritairement des endopeptidases qui sont classées en 69 familles et 10 clans (Merops, August 2011 (Release 9.5)) (Annexe 3). Près de la moitié de ces protéases sont retrouvées chez les virus. Les protéases à cystéines sont aussi présentes chez les protozoaires, les vers, les bactéries, certains champignons (*Aspergillus flavus*), les plantes et les mammifères y compris les humains. Chez les parasites, les protéases à cystéine auraient un rôle important dans leur virulence, leur nutrition et leur protection (dégradation d'IgY de l'hôte), ainsi que dans l'activation des autres enzymes, l'invasion tissulaire et cellulaire, et le contournement du système de défense immune (Otto *et al.*, 1997, Sajid *et al.*, 2002). Chez les mammifères, les protéases à cystéines sont impliquées dans le remodelage osseux, l'apoptose, la réponse immune, l'homéostasie épidermique ainsi que la morphogénèse et le cycle folliculaire (Turk *et al.*, 2001).

Les protéases à cystéine requièrent un résidu cystéine dans leur site actif pour réaliser l'hydrolyse. Elles possèdent des similarités dans leur mécanisme d'action avec les protéases à sérine mais sont cependant beaucoup plus nucléophiles grâce à l'atome de soufre du groupement thiol de la cystéine (Sajid *et al.*, 2002).

La majorité des protéases à cystéines sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs, activés par l'élimination du pro-peptide. Ce pro-peptide, de par sa position dans la structure tridimensionnelle, cache le site actif de la protéase et le rend ainsi inaccessible.

3.1.3.2. *Les protéases à cystéine du jaune*

Seule une protéase à cystéine a été identifiée dans le jaune : La « similar to ubiquitin specific protease 42 ». La signification biologique de cette molécule dans le jaune d'œuf est difficile à appréhender. En effet, les protéines de cette famille sont en général intracellulaires, elles régulent le turn-over des protéines ubiquitinylées (Quesada *et al.*, 2004).

3.1.4. Les protéases acides

3.1.4.1. *Mode d'action des protéases acides*

Ces protéases sont ubiquistes puisque retrouvées chez les vertébrés, les champignons, les plantes et les rétrovirus. Elles sont caractérisées par un pH optimal d'activité acide (Davies, 1990).

Les protéases acides couvrent de nombreuses fonctions très variées. Elles sont impliquées dans des processus biologiques tels que la digestion (pepsine, gastricine, chymosine), le catabolisme des protéines (cathepsine D) et le contrôle de la pression sanguine (rénine). Chez les champignons, les protéases acides sont supposées jouer un rôle dans la sporulation (Davies, 1990, Kay *et al.*, 1992).

La plupart des protéases acides ont une structure en simple chaîne de 35 kDa environ. Elles possèdent une séquence peptidique caractéristique au niveau des résidus catalytiques aspartiques : (résidu hydrophobe)-Asp-Thr-Gly-Ser en NH₂-terminal et (résidu hydrophobe)-Asp-Thr-Gly-Ser/Thr en COOH-terminal. La quasi-totalité des protéases acides est synthétisée sous forme de précurseurs inactifs. Elles contiennent un segment peptidique en NH₂-terminal, d'environ 45 acides aminés, clivé pour permettre leur activation (Davies, 1990). Ce pro-peptide, plutôt basique par la présence de lysine(s), d'arginine(s), et d'histidine(s), recouvre le site actif. A pH neutre et alcalin, le pro-peptide est stabilisé dans sa conformation inactive, alors qu'à pH acide, sa protonation permet un changement de conformation qui libère l'accès du site actif. Cette activation ne nécessite donc pas le clivage du pro-peptide, bien que certains membres de cette famille soient activés à pH acide par autolyse du pro-peptide (Szecsi, 1992).

Ces protéases acides sont classées en 16 familles et 5 clans (Merops, August 2011 (Release 9.5)) (Annexe 4). La majeure partie d'entre elles sont des endopeptidases. Les protéases acides de la famille des pepsines (A1) sont exclusivement retrouvées chez les eucaryotes et sont classées en cathepsine D, cathepsine E, gastricine, pepsine, chymosine et rénine. Des protéases acides ont été isolées d'invertébrés, de plantes, de bactéries et de rétrovirus (Rawlings *et al.*, 1993, De Luca *et al.*, 2009). Les pepsines et les gastricines sont retrouvées tout le long du tractus digestif chez les mammifères mais aussi chez le poulet (Foltmann, 1992, Kostka, 1992).

3.1.4.2. *Les protéases acides du jaune*

Deux protéases acides pourraient jouer un rôle dans l'œuf de poule. La cathepsine D est décrite depuis de nombreuses années comme une enzyme clef de l'activation des précurseurs du jaune dans l'ovocyte en croissance. Cette protéase a été identifiée et purifiée à partir du foie et des follicules mais n'a pas été retrouvée dans le jaune d'œuf mature (œuf pondu) (Retzek *et al.*, 1992, Mann *et al.*, 2008). Une seule protéase acide a été identifiée dans les protéomes du jaune d'œuf : la « similar to nothepsin » (Mann *et al.*, 2008, Farinazzo *et al.*, 2009) (Tableau 3). Cette protéase est, de par sa séquence, très proche de la cathepsine D et il n'existe que peu d'informations publiées sur son homologue, la nothepsine. En effet, cette dernière n'a été décrite que chez le poisson et le lézard (Riggio *et al.*, 2000, Borrelli *et al.*, 2006) et sa fonction dans ces deux espèces reste à explorer. Ces deux protéases ont fait l'objet d'une étude expressionnelle précise qui sera présentée dans la partie « Résultats expérimentaux ».

3.2. Les inhibiteurs de protéases

Au regard de leurs nombreuses fonctions physiologiques, les protéases apparaissent comme étant des éléments déterminants dans la plupart des mécanismes biologiques, à tous les niveaux du développement. Néanmoins, de par leur capacité à dégrader la plupart des protéines, leur activité peut s'avérer délétère pour l'hôte si elle n'est pas régulée. Plusieurs mécanismes coexistent pour contrôler une activité excessive des protéases, tels que la

régulation de leur expression ou de leur sécrétion, l'activation ou non de leur forme zymogène et l'inhibition directe de la forme active par des inhibiteurs de protéases (Krowarsch *et al.*, 2003, Rawlings *et al.*, 2004a).

Les inhibiteurs de protéases, également nommés antiprotéases, se comptent par centaines et sont très largement étudiés. Les antiprotéases ont été identifiées sous de multiples formes dans de nombreux tissus et fluides biologiques chez les animaux et les plantes, mais aussi chez les microorganismes. Leur rôle, dans le sens large du terme, est de prévenir d'une protéolyse extrême et non physiologique. En effet, de très nombreuses pathologies sont imputables à un déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases en faveur des protéases, qui vont alors dégrader les protéines endogènes tissulaires entraînant des situations mettant en jeu la survie de l'hôte (Laskowski *et al.*, 1980, Rawlings *et al.*, 2004a).

La structure des inhibiteurs de protéases, leur mode d'action et la nature du complexe protéase-inhibiteur diffèrent énormément d'une antiprotéase à l'autre. Initialement, il était supposé qu'un inhibiteur de protéase était spécifique d'un groupe de protéases (sérine, cystéine, acides ou métalloprotéases). Ceci est vrai dans la majorité des cas mais certaines antiprotéases sont capables d'inhiber plusieurs groupes de protéases grâce à des sites d'interaction distincts (Krowarsch *et al.*, 2003).

Leur classement en familles a été réalisé par Neil D. Rawlings et ses collaborateurs en fonction de l'unité inhibitrice des antiprotéases (Rawlings *et al.*, 2004a). Cette base de données est régulièrement mise à jour (Annexe 5). Cette unité inhibitrice correspond au segment de la séquence peptidique contenant le site inhibiteur, exclusivement. Certaines antiprotéases sont caractérisées par la présence de plusieurs sites inhibiteurs sur la même chaîne polypeptidique, résultat de l'élongation du gène par duplication (Laskowski *et al.*, 1980). Les antiprotéases possédant une seule unité inhibitrice sont nommées « inhibiteurs simples » et celles possédant plusieurs unités inhibitrices sont nommées « inhibiteurs composés » (Rawlings *et al.*, 2004a).

D'un point de vue structural, le blocage du site actif de la protéase est toujours réalisé par une interaction entre le site actif de la protéase et un segment accessible de l'antiprotéase. Ce

dernier peut être une boucle ou une extrémité de la séquence polypeptidique pouvant agir en synergie ou indépendamment l'une de l'autre (Krowarsch *et al.*, 2003).

Dans les paragraphes suivants, nous détaillerons les 3 types d'inhibiteurs représentatifs des antiprotéases retrouvées dans le jaune d'œuf (Tableau 4) : les inhibiteurs de protéases à sérine, les inhibiteurs de protéases à cystéine et les alpha2-macroglobulines. Ces dernières sont capables d'inactiver la majorité des protéases : protéases à sérine, à cystéine mais aussi les protéases acides et les métalloprotéases.

Tableau 4 : Liste des antiprotéases identifiées dans le jaune d'œuf, d'après les études protéomiques de Mann *et al.* (Mann *et al.*, 2008) et Farinazzo *et al.* (Farinazzo *et al.*, 2009)

Type/Nom des antiprotéases	Famille/domaine
<i>Inhibiteurs de protéases à sérine</i>	
Ovoinhibitor	<i>Kazal</i>
Similar to ovomucoid	<i>Kazal</i>
Similar to putative porin	<i>Kunitz</i>
39 kDa protein	<i>Kunitz</i>
52 kDa protein	<i>Serpine</i>
Heparin cofactor II	<i>Serpine</i>
Ovalbumin-related protein X	<i>Serpine</i>
Ovalbumin-related protein Y	<i>Serpine</i>
Similar to alpha-1 antitrypsin	<i>Serpine</i>
Similar to alpha-2 plasmin inhibitor	<i>Serpine</i>
Similar to angiotensinogen	<i>Serpine</i>
Similar to antithrombin	<i>Serpine</i>
Similar to mouse counterpart for human pigment epithelium derived factor	<i>Serpine</i>
Similar to plasma protease C1 inhibitor	<i>Serpine</i>
<i>Inhibiteurs de protéases à cystéine</i>	
Cystatin	<i>Cystatin</i>
Similar to fetuin	<i>Cystatin</i>
Similar to prekininogen	<i>Cystatin</i>
<i>Inhibiteurs universels</i>	
Ovostatin	<i>α2-macroglobulin</i>
Similar to alpha2-macroglobulin	<i>α2-macroglobulin</i>
Similar to MGC68875	<i>α2-macroglobulin</i>

3.2.1. Les inhibiteurs de protéases à sérine

Près de 60% des familles d'antiprotéases sont des inhibiteurs de protéases à sérine. Il en existe 3 types : les antiprotéases non canoniques, les antiprotéases canoniques et les serpinines. Les antiprotéases canoniques sont des petites protéines de 14 à 200 acides-aminés alors que les serpinines ont un poids moléculaire plus élevé et comptent entre 350 et 500 acides-aminés (Krowarsch *et al.*, 2003). Dans ce chapitre, nous n'aborderons pas les inhibiteurs à sérine non canoniques dans la mesure où aucun inhibiteur de ce type n'a été retrouvé dans le jaune d'œuf. En effet, ce type d'inhibiteur n'a été décrit que chez les organismes hématophages (Krowarsch *et al.*, 2003).

3.2.1.1. Mode d'action des inhibiteurs de protéases à sérine

Inhibiteurs canoniques

Les inhibiteurs canoniques sont très nombreux et très divers. Il s'agit du plus grand groupe d'inhibiteurs de protéases. Ils ont été isolés de cellules, de tissus et d'organismes très variés. Ils sont souvent accumulés en grande quantité dans les graines de plantes, les œufs des oiseaux et les fluides corporels.

Le segment responsable de l'inhibition de la protéase est appelé boucle inhibitrice de la protéase ou « protease-binding loop ». Cette boucle, complémentaire du site actif de la protéase, renferme dans sa région la plus exposée, la liaison peptidique P₁-P₁' du site actif. Le contact entre la protéase et l'antiprotéase se fait par le résidu P1 de l'antiprotéase qui interagit avec le résidu S1 de la protéase. Cependant les acides aminés qui entourent le résidu P1 sont essentiels pour la reconnaissance. On distingue dans ce groupe notamment les inhibiteurs de type Kazal, Kunitz ou « inter-alpha-trypsin inhibitor ».

La famille d'inhibiteurs de type **Kazal** a été nommée ainsi en référence au travail sur l'inhibiteur de la trypsine pancréatique conduit par Kazal et ses collaborateurs en 1948 (Kazal *et al.*, 1948). Ces antiprotéases sont retrouvées chez les vertébrés (humains, bovins, ovins, porcins, oiseaux...) et les invertébrés (hématophages, écrevisses, crevettes, escargots,

punaises...) (Laskowski *et al.*, 1980, Rimphanitchayakit *et al.*, 2010). Le domaine « antiprotéase » de type Kazal se compose de 40 à 60 acides aminés et est parfois organisé en multidomaines. Le site inhibiteur des inhibiteurs de type Kazal est extrêmement variable mais la structure de ces inhibiteurs reste très conservée. Les domaines de type Kazal contiennent 6 cystéines engagées dans des ponts disulfures selon un arrangement précis (Fig. 10). Les antiprotéases, avec des domaines multiples de type Kazal, sont très polyvalentes puisque chacun des domaines peut interagir avec la protéase correspondante. Ceci est rendu possible par les liaisons entre les différents domaines qui sont suffisamment flexibles pour éviter toute interférence et encombrement stérique (Laskowski *et al.*, 1980, Rimphanitchayakit *et al.*, 2010). Ces antiprotéases interagissent classiquement de façon réversible avec les protéases, en formant des complexes stables inhibant l'activité catalytique de ces dernières (Major *et al.*, 2008, Migliolo *et al.*, 2010). De par leur mécanisme d'action, les antiprotéases de la famille Kazal sont capables d'inhiber les protéases microbiennes et ainsi intervenir dans la défense antimicrobienne de l'hôte. Certaines de ces antiprotéases possèdent une activité bactériostatique (Li *et al.*, 2009, Rimphanitchayakit *et al.*, 2010).

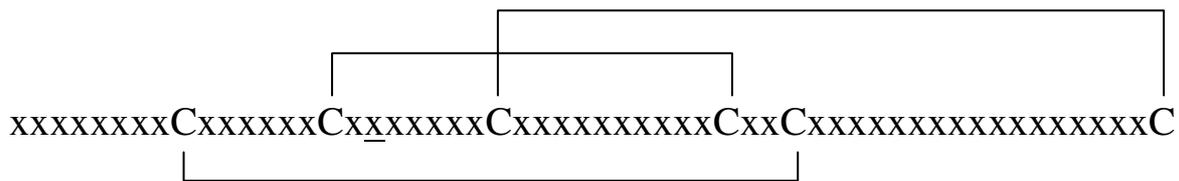


Figure 10 : Représentation schématique d'un domaine de type Kazal.

Les inhibiteurs de type **Kunitz** ont été initialement caractérisés par Mr Kunitz (Kunitz, 1946). La structure des domaines de type Kunitz est contrainte par la présence de trois ponts disulfures selon l'arrangement présenté Figure 11. Il existe au minimum 3 familles d'antiprotéases chez les vertébrés possédant un ou plusieurs domaines de type Kunitz dans leur séquence protéique : la « bovine basic trypsin inhibitor » ou BPTI (1 domaine), la « bikunin » ou UTI (2 domaines) et la « tissue factor pathway inhibitor » ou TFPI (3 domaines) (Shigetomi *et al.*, 2010). Chez les insectes, il a été montré que certaines antiprotéases possédant un domaine de type Kunitz inhibent des protéases fongiques et bactériennes, ce qui suggère qu'elles pourraient avoir un rôle dans la défense contre les pathogènes (Nirmala *et al.*, 2001). Les antiprotéases possédant un domaine de type Kunitz inhibent essentiellement les protéases à sérine mais certains membres de cette superfamille

sont capables d'inhiber certaines protéases à cystéine et protéases acides (Mares *et al.*, 1989, Major *et al.*, 2008, Migliolo *et al.*, 2010).

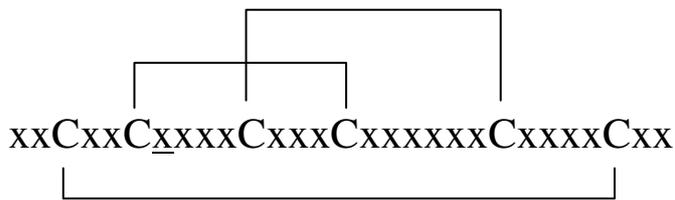


Figure 11 : Représentation schématique d'un domaine de type Kunitz.

Les serpinés

Les serpinés sont les antiprotéases les plus largement distribuées dans le monde vivant. Elles ont été identifiées chez plusieurs espèces animales (humains, arthropodes, nématodes, poissons, amphibiens, reptiles et un oiseau : le poulet), les plantes, les virus, les bactéries et les archaebactéries. Tous les organismes eucaryotes multicellulaires synthétisent des serpinés, alors que chez les procaryotes, elles sont retrouvées sporadiquement. Les serpinés possèdent un large panel de fonctions de régulation, tels que le remodelage de la matrice extracellulaire, l'activation et le transport d'hormones, la protéolyse intracellulaire, la pression et la coagulation sanguine, la suppression de tumeurs, le pouvoir pathogène des parasites et des virus, la modulation de la réponse inflammatoire, la différenciation cellulaire, la migration cellulaire, la conformation des protéines, la fibrinolyse et la cascade du complément (Potempa *et al.*, 1994, Gettins, 2002, Law *et al.*, 2006). La plupart des serpinés inhibent les protéases à sérine, mais quelques membres de cette famille sont capables d'inhiber certaines protéases à cystéine (Silverman *et al.*, 2001).

Les serpinés sont de larges molécules d'environ 330-500 acides-aminés qui interagissent avec les protéases *via* une boucle de 30-40 acides-aminés, présente à l'extrémité COOH-terminale de la protéine (Figure 12). Les serpinés agissent comme des antiprotéases à « usage unique » : l'interaction de la protéase avec la boucle inhibitrice de la serpine se traduit par un clivage de la boucle pour former un complexe protéase-serpine réversible. Il s'en suit

un réarrangement conformationnel de la serpine qui entraîne la protéase dans un complexe covalent (voie inhibitrice). Dans certains cas, après interaction, la protéase est libérée alors que la serpine est irréversiblement inactivée après clivage et réarrangement (voie substrat). L'activité inhibitrice des serpinés peut-être régulée par des co-facteurs comme l'héparine permettant de maintenir la boucle d'activation exposée ou de promouvoir l'activité d'inhibition (Potempa *et al.*, 1994, Gettins, 2002, Law *et al.*, 2006).

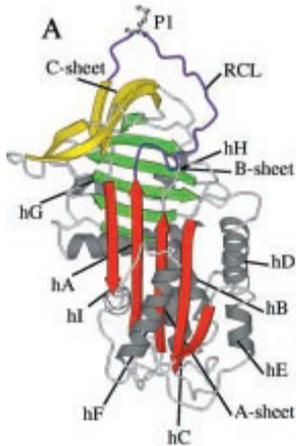


Figure 12 : Représentation schématique d'une serpine. Les hélices alpha et les feuillets bêta de la molécule sont indiqués par hA à hI et A-sheet à C-sheet, respectivement. RCL désigne la boucle inhibitrice (reactive site loop, en violet) interagissant avec la protéase cible par son résidu P1 (Silverman *et al.*, 2001).

3.2.1.2. Mode d'action des inhibiteurs de protéases à sérine

Quatorze antiprotéases à sérine ont été identifiées dans le jaune d'œuf (Tableau 4) : deux inhibiteurs de type kazal, deux inhibiteurs de type Kunitz et dix serpinés. Les inhibiteurs de type Kazal, l'ovoinhibiteur et l'ovomucoïde sont des protéines omniprésentes dans l'œuf. Ils sont retrouvés dans tous les compartiments (Réhault-Godbert *et al.*, 2011). Bien qu'elles soient connues depuis de nombreuses années (Liu *et al.*, 1971, Yamashita *et al.*, 1983), leur rôle physiologique reste toujours méconnu. Les deux antiprotéases de type Kunitz ont été révélées récemment par deux approches protéomiques complémentaires (Mann *et al.*, 2008, Farinazzo *et al.*, 2009), et leur rôle et activités restent à être explorés dans l'œuf. Les serpinés constituent le groupe le plus représenté dans l'œuf. Celles majeures de l'œuf sont les serpinés de la famille de l'ovalbumine. L'ovalbumine constitue plus de 50% des protéines du blanc d'œuf et on la retrouve dans tous les compartiments. Cette serpine est l'un des rares membres de cette famille d'inhibiteurs qui ne possède pas d'activité inhibitrice (Benarafa *et al.*, 2005). Deux homologues de cette famille, l'ovalbumin-related protein Y et l'ovalbumin-related protein X ont été décrits. Des études de comparaison de séquences de ces protéines avec

celles de serpins inhibitrices, suggèrent que ces deux serpins pourraient quant à elles constituer de vrais inhibiteurs (Benarafa *et al.*, 2005). Cette propriété n'a cependant pas encore été vérifiée du fait de la non-disponibilité des protéines purifiées. Par ailleurs, plusieurs des serpins identifiées dans le jaune pourraient initialement jouer un rôle dans le plasma sanguin. En effet, l'« heparin cofactor II », la « similar to alpha1-antitrypsin », la « similar to alpha 2 plasmin inhibitor », la « similar to angiotensinogen », la « similar to antithrombin » et la « similar to plasma protease C1 inhibitor » ont toutes été identifiées dans d'autres espèces comme des molécules intervenant dans la régulation de diverses cascades plasmatiques (Rau *et al.*, 2007, D'Alessandro *et al.*, 2010). La « similar to mouse counterpart for human pigment epithelium derived factor » pourrait quant à elle jouer un rôle dans la régulation de l'angiogenèse (Subramanian *et al.*, 2011), bien que son homologue humain ne possède pas d'activité inhibitrice (Becerra *et al.*, 1995). La signification biologique et les activités de ces molécules demeurent inconnues dans l'œuf.

3.2.2. Les inhibiteurs de protéases à cystéine : la superfamille des cystatines

3.2.2.1. *Mode d'action des cystatines*

La superfamille des **cystatines** regroupe la plupart des antiprotéases à cystéine. Elle est composée de 3 principales familles d'antiprotéases : les stéfines, les cystatines et les kininogènes. Ces antiprotéases interagissent avec de nombreux sites conservés des protéases à cystéine : il y a une glycine en NH₂-terminal avec une boucle où les résidus glutamine, valine, glycine sont présents, et une autre boucle en COOH-terminal avec les résidus proline et tryptophane. Le mécanisme d'inhibition des antiprotéases à cystéine est plus complexe que celui décrit pour les antiprotéases à sérine (Ochieng *et al.*, 2010). Ces antiprotéases sont actives à pH neutre, alors que leurs protéases cibles retrouvées dans les lysosomes essentiellement, sont actives à pH acide. Les antiprotéases à cystéine permettent ainsi de réguler l'activité de protéases cibles, lorsque celles-ci sont relarguées accidentellement des lysosomes vers le milieu extérieur où le pH est proche de la neutralité. Les antiprotéases à cystéine protègent donc les cellules et les tissus contre une activité excessive des protéases à cystéine. Les antiprotéases à cystéine protègent également les organismes vivants contre

l'invasion par des microbes et des parasites, qui utilisent des protéases à cystéine pour pénétrer et envahir le corps de l'hôte (Chapman *et al.*, 1997, Turk *et al.*, 2002).

Les antiprotéases de la famille des **stéfines** sont des petites protéines ayant un poids moléculaire d'environ 11 kDa. Elles possèdent un seul domaine inhibiteur et n'ont pas de ponts disulfures dans leur structure. Les antiprotéases de la famille des **cystatines** ont un poids moléculaire de 13-14 kDa, un peptide signal et des ponts disulfures en COOH-terminal. Les antiprotéases de la famille des **kininogènes**, quant à elles, sont de larges glycoprotéines multifonctionnelles de 80-120 kDa, circulant dans le plasma sanguin des mammifères. Elles sont composées de 3 domaines inhibiteurs correspondant chacun à la chaîne polypeptidique des cystatines (Ochieng *et al.*, 2010).

3.2.2.2. *Les cystatines du jaune*

Trois protéines de type « cystatine » ont été identifiées dans le jaune d'œuf (Tableau 4). De nombreuses études menées avec la cystatine purifiée à partir de l'œuf ont montré que cet inhibiteur de protéases à cystéine avait un large spectre d'activités antimicrobiennes et antiparasitaires (Korant *et al.*, 1985, Serveau *et al.*, 1996, Blankenvoorde *et al.*, 1998, Réhault-Godbert *et al.*, 2011). Ces données suggèrent que la cystatine pourrait être un acteur essentiel de la défense de l'œuf contre les pathogènes. La « Similar to prekininogen » contient trois domaines de type cystatine. Sa fonction dans l'œuf est méconnue mais son homologue, le kininogène, est décrit pour jouer un rôle dans les processus de coagulation et d'inflammation (Lalmanach *et al.*, 2010). Son activité antimicrobienne a été démontrée à plusieurs reprises (Nordahl *et al.*, 2005, Frick *et al.*, 2006). La « similar to fetuin » appartient également à la famille des protéases à cystéine mais sa fonction biologique reste à être explorée.

3.2.3. Les inhibiteurs universels : les alpha-2 macroglobulines

3.2.3.1. *Mode d'action des alpha-2 macroglobulines*

L'alpha-2 macroglobuline humaine (α_2M) est capable d'inactiver la majorité des protéases connues qu'elles soient des protéases à sérine, à cystéine, acides, ou des

métalloprotéases. C'est une grosse glycoprotéine de 725 kDa, présente dans le plasma humain. Cette protéine est un tétramère composé de sous-unités de 185 kDa identiques, liées par paires grâce à des ponts disulfures. Deux paires s'associent de façon non covalente pour former le tétramère biologiquement actif. Sur chacune des sous-unités, la région amorce (« appât ») ou « bait region », constituée de 25 acides-aminés, peut être clivée par les protéases. Le clivage de la « bait région » conduit à un changement de conformation de l' α_2M qui a pour conséquence de piéger la protéase à l'intérieur même de l'inhibiteur, sans blocage de son site actif (Fig.13). De par l'encombrement stérique, les substrats de haut poids moléculaire ne peuvent ainsi plus accéder, ou difficilement, au site actif de la protéase. Ainsi, cette prise au piège de la protéase diminue drastiquement son activité envers les substrats de haut poids moléculaire (jusqu'à 90%), et dans une moindre mesure son activité envers les substrats de faible poids moléculaire (jusqu'à 20%) (Travis *et al.*, 1983, Borth, 1992).

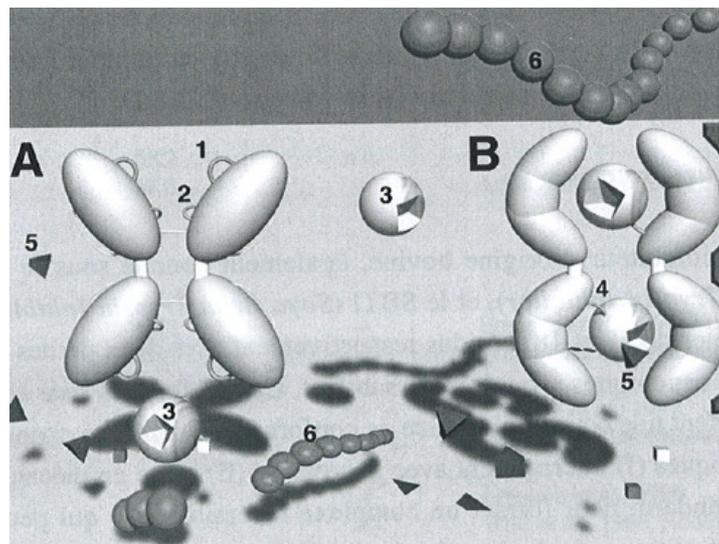


Figure 13 : Illustration du mécanisme d'inhibition des protéases par l'alpha-2 macroglobuline
A) alpha-2 macroglobuline formée de deux paires de sous-unités identiques. **B)** alpha-2 macroglobuline après interaction avec la protéase cible. Chaque sous-unité de l'alpha2-macroglobuline expose une région « appât » (1) et une boucle (2). Le clivage de la région « appât » par la protéase (3) entraîne un changement conformationnel avec parallèlement la formation d'une liaison covalente entre alpha2-macroglobuline et la protéase (4). Le site actif de l'enzyme reste accessible à de petits substrats (5) mais pas à des substrats macromoléculaires (6). D'après Moreau T. (1999) (Moreau, 1999).

3.2.3.2. *Les alpha-2 macroglobulines du jaune*

L'ovostatine est l'alpha-2 macroglobuline majeure de l'œuf. On la retrouve dans tous les compartiments. Elle a été caractérisée pour la première fois dans les années 80, après purification à partir du blanc d'œuf (Nagase *et al.*, 1983a, Nagase *et al.*, 1983b). Cet inhibiteur est capable d'inhiber différentes protéases à sérine, mais également des protéases à cystéine (Nagase *et al.*, 1983a, Nagase *et al.*, 1983b) et des protéases acides telles que la rénine et la pepsine (Kato *et al.*, 1991). A l'heure actuelle, on ne connaît toujours pas sa fonction dans l'œuf. Certains auteurs ont néanmoins suggéré qu'elle pourrait avoir des propriétés antibactériennes par sa capacité à inhiber des protéases microbiennes (Miyagawa *et al.*, 1994). Deux autres alpha-2 macroglobulines « similar to alpha2-macroglobulin » et « similar to MGC68875 » ont été identifiées dans l'œuf (Mann *et al.*, 2008, Farinazzo *et al.*, 2009). Ces deux protéines ont été prédites d'après l'analyse bioinformatique du génome de la poule et n'ont pas encore été caractérisées.

III
RESULTATS EXPERIMENTAUX

Article 1 :

Expression des Protéases et Antiprotéases Hépatiques lors de la Maturité Sexuelle de la Poule : Implication dans la Vitellogénèse Ovarienne.

Contexte et objectifs du travail

Les précurseurs du jaune d'œuf et notamment les protéines, sont synthétisés par le foie, à la maturité sexuelle des poules. Ces précurseurs sont ensuite secrétés dans le sang, pour être incorporés au niveau du follicule ovarien par endocytose, après fixation sur des récepteurs spécifiques. De nombreuses protéases et antiprotéases ont été identifiées dans le jaune, par le biais de récentes approches protéomiques. Comme mentionné dans le chapitre d'introduction, l'analyse fine de ces molécules a révélé que de nombreuses protéases et antiprotéases identifiées dans le jaune sont des protéines exprimées de manière basale par le foie de la poule ou d'autres espèces pour participer à différentes cascades plasmatiques vitales pour l'organisme (coagulation, inflammation). Ces protéases et antiprotéases sont en revanche des constituants mineurs du jaune et leur signification biologique dans ce compartiment reste donc à être démontrée.

L'étude de l'expression hépatique au moment de la mise en place de la fonction de reproduction chez la poule (maturité sexuelle, capacité à pondre des œufs) est une approche globale nous permettant d'identifier les protéines surexprimées au cours de l'acquisition de la maturité sexuelle et donc d'identifier des acteurs incontournables du jaune d'œuf (précurseurs de l'oocyte ou enzymes impliquées dans la maturation des précurseurs, dans leur transfert plasmatique et ovarien ou jouant un rôle dans le jaune d'œuf au cours du développement embryonnaire). Cette approche nous a permis d'évaluer quelles protéases et antiprotéases préalablement identifiées dans le jaune, par les approches protéomiques, étaient surexprimées

par le foie à la maturité sexuelle, suggérant une participation active de ces protéines à la formation du jaune d'œuf.

Résumé du travail

Introduction

Le jaune d'œuf constitue une source majeure de protéines, minéraux, vitamines et lipides pour l'embryon. La majeure partie des protéines du jaune d'œuf est synthétisée par le foie des poules au moment de l'acquisition de la maturité sexuelle. Ces précurseurs sont ensuite sécrétés dans le sang principalement sous la forme de VLDL (structure spécifique chez la poule) et de vitellogénines. Les précurseurs sont intégrés à l'oocyte ovarien en croissance par endocytose, suite à leur interaction avec des récepteurs spécifiques. Ces précurseurs sont ensuite maturés dans l'oocyte sous l'action des protéases endogènes, dont l'activité est régulée par des antiprotéases. Cette maturation aboutit à la génération des constituants définitifs du jaune d'œuf.

La grande variété des fonctions biologiques des protéases et antiprotéases dans le règne animal et végétal, suggère que les protéases et antiprotéases de l'œuf pourraient être impliquées dans de nombreux processus physiologiques au cours de la croissance folliculaire puis de l'incubation : maturation des protéines du jaune, défense innée, fertilisation dans l'infundibulum, l'angiogenèse ou l'hydrolyse et/ou activation de précurseurs au cours du développement embryonnaire.

En comparant l'expression des gènes dans le foie de poules sexuellement matures à celles dans le foie de poulettes sexuellement immatures, nous avons identifié des protéases et antiprotéases surexprimées au moment de la mise en place de la fonction de reproduction. Ces protéines sont en effet susceptibles d'être des protéines majeures de la formation du jaune d'œuf et/ou de la membrane vitelline, dont certains précurseurs sont également synthétisés par le foie.

Résultats et discussion

L'analyse statistique a révélé 582 gènes surexprimés dans le foie des poules sexuellement matures avec des ratios matures/immatures allant de 1,2 à 65. L'analyse des 10 gènes les plus surexprimés montre notamment que 6 d'entre eux codent des protéines spécifiques du jaune d'œuf et qu'une est spécifique de la membrane vitelline. Ces résultats valident le fait que de nombreuses molécules du jaune d'œuf et de la membrane vitelline sont effectivement surexprimées par le foie des poules au moment de la mise place de la fonction de reproduction.

L'utilisation de différents outils bioinformatiques de recherche de domaines spécifiques dans cette liste de gènes surexprimés, a mis en évidence 18 protéases et antiprotéases. Seules trois d'entre elles, la « similar to nothepsin », la « similar to porin » et la « similar to oviductin » ont également été identifiées soit dans les protéomes du jaune soit dans celui de la membrane vitelline (Mann, 2008, Mann *et al.*, 2008, Farinazzo *et al.*, 2009). Sur les 18 protéases et antiprotéases surexprimées dans le foie, 14 sont des protéines prédites possédant des homologues avec des protéines existantes dans d'autres organismes, 3 sont des protéines hypothétiques et une seulement a été décrite dans la littérature (« signal peptide peptidase-like 2A »). L'analyse fonctionnelle de ces molécules par « gene ontology » a mis en évidence que la plupart de ces gènes est associée au métabolisme des protéines, comme attendu du fait que les protéases et les antiprotéases sont impliquées dans la protéolyse et sa régulation. Cette analyse révèle également que par comparaison avec d'autres organismes, trois d'entre elles ont un rôle prédit dans le développement embryonnaire (« similar to PACE4A-II », « similar to aminopeptidase A ») et dans l'ovulation (« similar to ADAM metallopeptidase with thrombospondin type motif, 17 preproteïn »). Parmi les 18 protéases et antiprotéases surexprimées dans le foie des poules matures, 15 ont été validées par RT-qPCR. L'utilisation d'outils de prédiction a permis de mettre en évidence que parmi ces 15 protéases et antiprotéases, quatre possèdent un peptide signal classique de sécrétion (« similar to nothepsin, similar to oviductin, similar to chymotrypsin inhibitor, similar to ubiquitin specific proteinase 40) et sept seraient sécrétées via une voie de sécrétion alternative (translocation à travers la membrane plasmique, exocytose). Quatre des sept protéines potentiellement sécrétées par une voie alternative sont prédites pour être transmembranaires (similar to aminopeptidase A, similar to N-acetylated alpha-linked acidic peptidase 2, similar to inner

mitochondrial membrane peptidase 2 isoform 2) ou nucléaires (similar to ubiquitin specific peptidase 3). Si l'on intègre l'ensemble de ces données, outre les trois protéases/antiprotéases connues pour être des constituants soit du jaune (« similar to nothepsin », « similar to porin ») soit de la membrane vitelline (« similar to oviductin »), cette approche nous a permis d'identifier 4 nouvelles protéases/antiprotéases (ubiquitin specific peptidase 3, similar to PACE4A-II, similar to chymotrypsin inhibitor et une hypothetical protein) susceptibles d'être secrétées pour jouer un rôle dans la vitellogénèse ou dans la formation de la membrane vitelline.

Si l'on s'intéresse aux 37 protéases et antiprotéases présentes dans le jaune, 12 sont exprimées de manière non différentielle par le foie des poules matures et immatures (additional files, tableaux 2 et 3), deux sont surexprimées dans le foie de poules matures (« similar to nothepsin », « similar to porin ») et huit ont une expression plus importante dans le foie des poules immatures (ratio mature/immature < 0.77, additional files, tableaux 2 et 3). Parmi les 15 restantes, huit n'avaient pas d'oligonucléotide(s) correspondant sur la puce (pas de RIGG, additional files, tableaux 2 et 3), six autres étaient représentées sur la puce mais ne sont pas sorties statistiquement exprimées dans le modèle. Enfin, pour la « Complement factor B-like protease », le numéro IPI00588708 correspondant a disparu de la banque ENSEMBL et nous n'avons pas retrouvé d'information relative à cette protéine dans d'autres banques de données.

Quant à la membrane vitelline, 12 protéases et antiprotéases ont été identifiées par les approches protéomiques, dont 4 (« follistatin », « metalloproteinase inhibitor 3 » ou TIMP3, « similar to ovulatory protein 2 », « similar to oviductin ») ne sont pas retrouvées dans le jaune et apparaissent donc spécifiques de ce compartiment. Parmi ces protéines, la « similar to oviductin » est surexprimée par le foie de poules matures, TIMP3 est au contraire surexprimée par le foie de poules immatures (ratio mature/immature < 0.77) et la « follistatin » est exprimée de manière non différentielle par le foie de poules matures et immatures. La « similar to ovulatory protein 2 » n'était pas représentée sur la puce et nous n'avons de ce fait pas d'information concernant son expression dans le foie.

De plus amples analyses seront nécessaires pour s'assurer que les protéases et antiprotéases identifiées dans notre approche transcriptomique, et non dans les approches protéomiques, jouent un rôle dans la formation du jaune d'œuf et/ou de la membrane vitelline. Certaines d'entre elles telles que les ubiquitines hydrolases pourraient jouer un rôle local dans

le catabolisme hépatique pour contrebalancer l'anabolisme intense du foie au moment de la maturité sexuelle (similar to ubiquitin specific proteinase 40).

Parallèlement, le fait que seules deux des protéases et antiprotéases surexprimées dans notre modèle sont des constituants identifiés du jaune suggère que la plupart des autres protéases et antiprotéases de ce compartiment ne sont pas spécifiquement exprimées en relation avec la formation du jaune d'œuf. Nombre de ces molécules sont connues pour être des acteurs clés de diverses cascades plasmiques, exprimées de manière basale chez les poules immatures et les poules matures. Ces molécules pourraient être incorporées de manière passive dans les vésicules endocytiques au niveau de l'ovaire. Certaines d'entre elles pourraient également être incorporées dans le jaune d'œuf en interagissant directement avec les récepteurs membranaires ou indirectement après interaction avec des alpha-2 macroglobulines. Ces dernières sont des inhibiteurs de protéases capables d'inhiber les 4 classes principales de protéases (voir Introduction, 3.2.3). Le mécanisme d'inhibition de ces antiprotéases est unique puisque l'interaction de ces inhibiteurs avec leur protéase cible entraîne un réarrangement conformationnel qui piège la protéase et expose un domaine de liaison à des récepteurs membranaires. Il a été montré qu'après interaction avec les récepteurs de l'oocyte qui lient également les VLDL, l'alpha2 macroglobuline était internalisée voire dégradée dans les vésicules endocytiques, sous l'action probable de la cathepsine D. Les protéases associées sont également susceptibles d'être dégradées. Elles peuvent par ailleurs être libérées du complexe avec l'alpha-2 macroglobuline pour recouvrer une activité et jouer un rôle spécifique au cours de la vitellogenèse ou ultérieurement au cours du développement embryonnaire.

A l'heure actuelle, nous avons montré qu'au moins une des protéases et antiprotéases de la membrane vitelline (« la similar to oviductin ») est surexprimée par le foie au moment de la maturité sexuelle. Chez les mammifères, l'oviductine jouerait un rôle dans la fertilisation. Par ailleurs, il sera intéressant d'étudier l'expression de ces différentes protéases et antiprotéases de la membrane vitelline dans les cellules de la granulosa qui secrètent des protéines potentiellement incorporées dans la membrane vitelline et dans l'infundibulum, segment de l'oviducte responsable de la synthèse de la membrane vitelline externe, pour déterminer quelles protéases et antiprotéases de la membrane vitelline sont exprimées par le foie (membrane interne) ou les cellules de la granulosa et quelles sont celles exprimées par l'infundibulum (membrane externe).

Conclusions

Cette approche met en évidence au moins deux protéases (« similar to nothepsin » et « similar to oviductin ») et une antiprotéase (« similar to porin ») susceptibles de jouer un rôle majeur dans le jaune d'œuf, dans la maturation des protéines du jaune (« similar to nothepsin ») ou dans la membrane vitelline, au cours de la fertilisation (« similar to oviductin »). Elle fournit une première classification des molécules du jaune d'œuf qui ont probablement une signification biologique en relation avec la vitellogenèse.

Il s'agira d'analyser plus en détail l'origine tissulaire des protéases et antiprotéases du jaune non surexprimées par le foie à la maturité sexuelle. Certaines d'entre elles pourraient être exprimées localement par les tissus entourant l'oocyte (thèque, granulosa). Par ailleurs, la signification biologique de ces protéases et antiprotéases que l'on retrouve en quantités mineures dans le jaune reste à être explorée. Leur présence dans l'œuf est-elle fortuite ou ont-elles un rôle spécifique dans le jaune ? Sont-elles actives dans le follicule, dans le jaune ou au cours du développement embryonnaire ou sont elles utilisées uniquement comme source additionnelle de nutriments pour l'embryon?

Cet article est en préparation et sera soumis au journal BMC genomics

Impact Factor : 4.206

Classé « Excellent » dans la catégorie « Biotechnology and Applied Microbiology »

Transcriptomic profiling of proteases and antiproteases in the liver of sexually mature hens in relation to vitellogenesis

Marie Bourin (mcbourin@tours.inra.fr), Joël Gautron (jgautron@tours.inra.fr), Magali Berges (mberges@tours.inra.fr), Christelle Hennequet-Antier (christelle.hennequet@tours.inra.fr), Cédric Cabau (cedric.cabau@tours.inra.fr), Yves Nys (ynys@tours.inra.fr) and Sophie Réhault-Godbert (srehault@tours.inra.fr)

INRA, UR83 Recherches avicoles, F-37380 Nouzilly, France

***Corresponding author:**

E-mail: srehault@tours.inra.fr

Tel: +33 2 47 42 78 39

Fax: +33 2 47 42 77 78

Abstract

Background. Most egg yolk precursors, which constitute a major source of nutrients for the avian embryo, are synthesized by the liver and are secreted into the blood to be further transferred in ovarian oocytes. 260 distinct proteins have been identified in egg yolk including at least 37 proteases and antiproteases. Many of them are minor components of the egg yolk and their function in egg yolk has not yet been explored. However, as regulators of protein metabolism, these egg yolk proteases and antiproteases are likely to play a role in oocyte formation or later during embryonic development. We used a transcriptomic approach based on the comparison of the expression between the liver of sexually mature hens versus pre-laying pullets to better appreciate which hepatic proteases and antiproteases are specifically expressed in relation to the oocyte formation.

Results

Using a 20K chicken oligoarray corresponding to 12 595 different chicken genes, a total of 582 genes were shown to be over-expressed in the liver at sexual maturity of hens (1.2 to 67 fold- difference). Most of the top ten over-expressed genes are known components of egg yolk or of the perivitelline membrane. The combination of different bioinformatic tools reveals 12 proteases and 3 antiproteases amongst the over-expressed genes, including many predicted proteins with yet unknown functions. Surprisingly, “similar to porin”, an antiprotease and “similar to nothepsin”, a protease, are the only over-expressed candidates (21-fold difference and 35-fold difference, respectively) that are actually recovered in the egg yolk. We also showed that “similar to oviductin”, a vitelline membrane-specific protease is over-expressed by the liver at sexual maturity of hens (4-fold over-expression).

Conclusions

Our approach revealed that three proteases and antiproteases are likely to participate in the formation of the oocyte. The role of the other 12 proteases and antiproteases which are over-

expressed in the liver at sexual maturity of hens remains to be investigated. We have shown that at least 1/3 of proteases and antiproteases of egg yolk and vitelline membrane are expressed in the liver of both mature and immature hens. Interestingly, many of these have been initially identified in plasma as regulators of haemostasis and inflammatory events. Are they specifically incorporated into the oocyte by receptor-mediated endocytosis like major egg yolk components or passively, through non-specific engulfment by the endocytic vesicles? These results raise the question of the biological significance of egg yolk proteases and antiproteases, and more generally of all minor proteins that have been identified in the egg yolk by proteomic approaches.

Background

Egg yolk constitutes a major source of proteins, minerals, vitamins and lipids for the developing embryo. It is well assumed that the major proteins of the egg yolk, with the exception of immunoglobulins, are synthesized by the liver of laying hens. Protein synthesis and lipogenesis are highly stimulated at sexual maturity in hens (15 to 20 fold) for the yolk exportation of 0.75 kg proteins and 1.5 kg of triglycerides in one year of production (300 eggs). The production of estrogen and at a lower magnitude of testosterone by the theca of the growing follicle increased 2 to 3 weeks before the production of the first egg and contribute to the development of reproductive organs and the synthesis of egg constituents [1-6]. Once secreted into the blood, egg yolk precursors are further transported to the ovarian follicle, which consist of an oocyte surrounded by several layers of supportive tissues namely the theca externa and the theca interna containing embedded capillaries and which are separated from the granulosa layer by a thick basal lamina [7, 8].

The transfer of VLDL, vitellogenins and some other plasmatic proteins from the blood to the interstitial fluid of the thecae is possible thanks to the presence of broad discontinuities in the capillary endothelium. The fluid composing the theca spaces is then “filtered” by the basal lamina, which selectively permits the passage of particles depending on their size and their molecular charge [9]. These particles will then pass between the cells composing the granulosa layer. The size of this intercellular space is rearranged depending on the stage of the follicular growth [10] and thereby may at this point also selectively control the uptake of specific plasmatic molecules. The relatively narrow intercellular space accompanying the primordial follicle allows the crossing of ferritin and possibly other molecules of similar size, whereas in the late stages of rapid follicular growth, cellular shape of granulosa cells must accommodate the increasing flow of egg yolk precursors that accumulate at the surface of the plasma membrane of the follicle [7]. Egg yolk precursors finally diffuse through the zona

pellucida to reach multifunctional oocyte-specific receptors, which achieve the specific uptake of plasmatic precursors into the forming yolk [11].

Egg yolk precursors are further processed within the oocyte upon the action of proteases, and their regulation by proteases inhibitors (antiproteases), to produce final yolk constituents. The essential role of cathepsin D, an aspartate protease, in the generation of mature products of the egg yolk has been reported in many publications [12, 13]. Recently, the combined efforts of Mann *et al.* and Farinazzo *et al.* [14] [15] to propose an exhaustive list of the proteins constituting the egg yolk revealed the presence of at least 37 proteases and proteases inhibitors in the egg yolk. Most of these are minor yolk components and the pathway analysis associated with egg yolk proteins has underlined the presence of numerous proteases and antiproteases associated with coagulation and inflammatory processes [16]. These molecules are basically recovered in blood and the significance of the presence of such molecules in egg yolk has not yet been investigated. The wide range of physiological functions of proteases and antiproteases in animal and vegetal kingdoms suggests that egg yolk proteases and antiproteases may be involved in many different biological processes including tissue remodeling, fertilization, angiogenesis, haemostasis, morphogenesis and protein maturation. These processes might occur in the oocyte during the process of follicular growth or in the egg during the embryonic development. To gain insight into the characterization of the proteases and antiproteases that are specifically associated with vitellogenesis, we analyzed the expression of proteases and antiproteases in the liver of laying hens. Based on the postulate that most egg yolk proteins are secreted by the liver at sexual maturity of hens and to get rid of all the proteins which are basically secreted by the liver and that are unrelated to egg yolk formation (factors in hemostasis, carrier proteins, immune effectors...), we compared their expression in the liver of sexually mature hens (laying hens) with that occurring in the liver of sexually immature pullets.

The present study provides an original overview of hepatic proteases and antiproteases that might be involved in the formation of the egg yolk and the perivitelline membrane, in fertilization or that could play a significant role during embryonic development as key components of the egg yolk. It also emphasizes the complementarities of both proteomic and transcriptomic strategies to better define the relevance of proteins which are associated with a specific milieu, and sheds lights on new approaches that can be implemented to answer questions related to their predicted biological significance.

Methods

Animals handling and housing. Animals were bred at the experimental unit Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours according to the European legislation on 'the protection of animals used for experimental and other scientific purposes' set by the European Community Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and under the supervision of two authorized scientists S. Réhault-Godbert and J. Gautron (Authorizations # 7323 and 37-144, respectively). Animals were housed and fed according to the recommendations defined by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Eight ten-week old pre-laying pullets and eight thirty-eight-week old laying hens (ISA brown, Hendrix Genetics, St-Brieuc, France) were euthanized to collect the livers that were quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until further use.

RNA isolation. Total RNA was extracted from frozen tissue samples using a commercial kit RNA-L (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's procedure, and simultaneously treated with DNase. RNA concentrations were measured at 260 nm and the integrity of RNA was evaluated on agarose 1% and with an Agilent 2100 Bioanalyzer

(Agilent Technologies, Massy, France). RNA samples were kept frozen at -80°C until further use.

Oligoarray hybridization. Only RNA samples with a 28S/18S ratio > 1.3 were considered for labeling and hybridization. A balanced block design was used for hybridization where thirty micrograms of total RNA were labeled with Alexa[®] 555 fluorescent dye and another thirty micrograms of total RNA with Alexa[®] 647 (Fisher Scientific BioBlock, Illkirch, France) using the Superscript[®] Plus Indirect cDNA Labelling System (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). After synthesis and purification, the efficiency the cDNA sample labeling as well as the quantity of labeled cDNA was determined using a Nanodrop ND 1000 (Nanodrop, Nyxor Biotech, Palaiseau, France) by measuring absorbance at 260, 320, 554, 650 and 750 nm. Samples were then hybridized on a micro-array ggallus_ARK-Genomics_20K (GEO: GPL6049) produced by Centre de Ressources Biologiques GADIE (INRA, Jouy-en-Josas, France). The features corresponding to the oligo-array are as follows. This 20.7 K chicken oligo array contains 20,676 features that include 20,460 70mer oligos and 216 control spots of the Operon Production Tracking Oligo opHsV04NC000001. 12595 different genes have been identified (Chicken oligo annotation, version 5 released on Oct 27th, 2009 by SIGENAE (Information System of Analysis of Breeding Animals' Genome)). The hybridization was performed as previously described [17] and microarray slides were scanned using a GenePix 4000 B microarray scanner (Axon Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The GenePix Pro 6.0 software was used to acquire the fluorescent pictures, align the spots, quantify their intensity and finally export the GenePix Reports (GPR) files containing raw spot intensity. A total of eight microarrays slides corresponding to 16 samples (eight livers from immature pullets and eight livers from mature hens) were hybridized. The GPR

files were stored in the BioArray Software Environment (BASE) of SIGENAE until further analysis.

Quantitative Reverse Transcriptase PCR

Quantitative Reverse Transcriptase PCR (qRT-PCR) was performed as following. Five µg of total RNA samples that were used for microarrays experiments were reverse-transcribed using the superscript II kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and random hexamers (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).. Classical PCR was performed using primers for proteases and antiproteases (Additional file 1) for 30 cycles at 60°C. Alternatively, cDNA sequences were amplified in real time using Sybr Green I Master kit (Roche, Mannheim, Germany) with the LightCycler 480 apparatus (Roche Diagnostics, Meylan, France). A melting curve program was carried out from 65 to 95°C in 1 min for each individual sample. Each run included triplicates of control cDNA corresponding to a pool of cDNA from all tissues. The control cDNA was diluted from 1:6.25 to 1:25,600 and relative arbitrary quantities were defined.

The threshold cycle (Ct), defined as the cycle at which fluorescence rises above a defined base line, was determined for each sample and control cDNA. A calibration curve was calculated using the Ct values of the control cDNA samples and relative amount of unknown samples were deduced from this curve. To account for variations in mRNA extraction and reverse transcription reaction between samples, probes mRNA levels were corrected relative to Tata Binding Protein (**TBP**) for expression of the livers of sexual mature and immature hens. Levels of Tata box binding mRNA were determined using Sybr Green reaction and the following primers 5'GCGTTTTGCTGCTGTTATTATGAG3' (forward) and 5'TCCTTGCTGCCAGTCTGGAC3' (backward).

Statistical data analysis.

Oligoarray: The profiling of differentially expressed genes was determined using Anapuce package (http://www.inapg.fr/ens_rech/math/outil.html). Spot intensities were calculated using the median value that was logarithm transformed (\log_2). A normalization consisting of global locally-weighted regression (LOWESS) was applied on the overall intensity log ratio to remove the bias due to fluorescence incorporation. A block effect was also corrected by subtracting the median value of the block. We performed statistical tests using VarMixt model assuming various group of variance for all genes [18]. P-values were adjusted by a Benjamini-Hochberg (BH) multiple testing procedure, taking into account that all tests were simultaneous.

Q RT-PCR: The log of the ratio sample/TBP RNA was used for statistical analysis using StatView version 5, software (SAS Institute Inc. Cary, NC). A one-way analysis of variance was performed to detect differences ($P < 0.05$) in gene expression between livers of laying hens and livers of pre-laying pullets

Bioinformatics analysis of overexpressed genes. Annotation of differentially expressed transcripts was performed using the BioMart tool related to chicken contigs present in the SIGENAE database (www.sigenae.org) [19], Ensembl, AGBASE and EntrezGene databases. SIGENAE assemblies were carried out using chicken cDNA and EST sequences available in public databases. The functional annotation to identify proteases and antiproteases was performed using GO terms accessions (<http://www.geneontology.org/>), Interpro database (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) and Uniprot (<http://www.uniprot.org/>).

Results/Discussion

Hepatic transcriptomic profiling of laying hens versus prelaying pullets.

At sexual maturity of hens, hepatic expression of genes is highly stimulated to support many metabolic changes associated with the development of reproductive organs. In fact, sexual maturity is partly characterized by the expression of pre-existing genes and the neo-expression of specific proteins in the liver, to sustain vitellogenesis. It is therefore not surprising that the statistical analysis of the results revealed that 582 genes ($P < 0.01$) are over-expressed in livers of laying hens compared with livers of pre-laying pullets, with ratios ranging from 1.2 to 65. When analyzing the 582 over-expressed genes, we found that 70% of them were known, 18% have homologous in other species and 12% are unknown (locus location available) or none characterized (Fig.1). The functional annotation of all these over-expressed genes, using gene ontology annotation, text mining, pathway and network analyses will be the subject of a complementary article, in which we will integrate all these data to provide a unified view of the predicted biological functions of these proteins (Réhault-Godbert *et al.*, in preparation). Although this in-depth integration of the complete list of the over-expressed genes has not yet been completed, the analysis of the top-ten over-expressed genes corroborates the relevance of our approach: most of these ten genes are yolk components, one is recovered in the perivitelline membrane, which surrounds the egg yolk and one is clearly associated with lipogenesis, which occurs exclusively in the liver in birds (Table 1). Thus, six of these ten over-expressed genes are involved in the synthesis of yolk precursors and/or are egg yolk-specific components. The gene with the highest over-expression is ascribed to riboflavin-binding protein precursor (67-fold over-expression), which stores and transports the ribloflavin vitamin into the yolk. Previous studies have reported that the expression of this gene is estrogen-dependent and that the riboflavin-binding

protein is taken from the blood to enter the growing oocyte by receptor-mediated endocytosis, together with vitellogenins [20]. It has been shown that fertilized eggs from laying hens that are deficient in riboflavin-binding protein are unable to develop into viable embryos due to a severe impairment of fatty acid oxidation occurring after 10 days of incubation [21]. The list also includes two vitellogenins, which are the precursors of lipovitellins and phosvitin. These two vitellogenin-derived products result from an intramolecular processing of vitellogenins by cathepsin D, after their transfer into the yolk [12]. Phosvitin is believed to store calcium, iron and other cations for the developing embryo [3]. We also identified apovitellenin-1 (Table 1), a low-density lipoprotein lipase inhibitor of egg yolk [22]. This apoprotein is specific to laying hens and prevents any alteration of the highly specific hen very low density lipoproteins (VLDL) from lipase activity during their transfer from the liver to the oocyte. Interestingly, we also found two proteins with potential protease and protease inhibitor activity: “similar to nothepsin” and “WAP four-disulfide core domain protein 3 precursor” (Putative protease inhibitor WAP14). Both proteins have been previously identified in the two proteomics surveys of the egg yolk as “similar to aspartic protease/similar to nothepsin” and “similar to porin”, respectively [14, 15]. The function of these proteins has not yet been explored.

This list contains also the membrane-bound O-acyltransferase domain-containing protein 2 (51-fold over-expression), the activity of which is associated with phospholipid biosynthesis. This protein has been identified in chicken bursal lymphocytes [23]. By similarity, the membrane-bound O-acyltransferase domain-containing protein 2 is assumed to be integral to membrane and thus should not be secreted in the blood stream to be a constituent of the egg yolk. However, its predicted activity is consistent with the striking increased lipogenesis (15 to 20 fold) that comes along with sexual maturation. In this report, we show for the first time that the expression of this protein is under the control of sex-steroids in the liver of hens.

We also revealed the presence of two predicted proteins, “Similar to phosphodiesterase 11A” and “Similar to hypothetical protein”, which are highly expressed in the liver at sexual maturity of hens (21-fold increase) and which function remains to be explored (Table 1). By similarity to mammals, “Similar to phosphodiesterase 11A” would have a role in signal transduction. The last constituent of this list is Zona Pellucida glycoprotein 1 (ZP1), which is over-expressed more than 15 fold in livers at sexual maturity of hens (Table 1). This hepatic protein is a known component of the perivitelline membrane, which is deposited in the ovary [24] and is believed to play a major role in the initial interactions between spermatozoa and the oocyte [25].

Hepatic proteases and antiproteases in laying hens

The analyses of the over-expressed genes related to proteases and antiproteases using Gene Ontology, Interpro and Uniprot databases revealed 18 genes (Table 2), which represent about 3% of the total over-expressed genes. This list includes 15 genes encoding proteases/peptidases and three genes encoding antiproteases (“similar to porin”, “similar to papilin” and “similar to chymotrypsin inhibitor”). The expression of these 18 candidate genes was further assessed by real-time quantitative RT-PCR to verify the over-expression that was observed using the oligo-array. Log₂ ratios of gene expression were used to perform the comparison between both approaches. As illustrated in Table 3, the over-expression was confirmed for 15 of the 18 candidates genes ($P < 0.05$). Two genes, PREDICTED: similar to aggrecanase-2 ($P = 0.11$), PREDICTED: similar to OMA1 homolog ($P = 0.23$) and “Signal peptide peptidase-like 2A” ($P = 0.46$) were not significantly over-expressed in the liver of laying hens, when compared to the liver of pre-laying pullets by qRT-PCR. Two of these three genes (“similar to OMA1 homolog”, a mitochondrial membrane protein, and “Signal peptide peptidase-like 2A”) encode proteins, which are predicted to be integral to membrane

[26, 27] and that should not be secreted into the blood to participate in egg yolk formation. From these results, we decided to focus on the 15 genes that were shown to be over-expressed in the liver of laying hens in both oligoarray study and qRT-PCR analysis. The first striking remark when considering this table is that 12 out of the 15 genes correspond to predicted proteins displaying homologies with other species (“similar to”) and 3/15 are hypothetical proteins. The gene ontology annotation of all these genes was therefore moderately informative (Table 4): most of these genes are associated with protein metabolism, as expected with regards to molecules involved in proteolysis (protease) and its regulation (antiproteases). Interestingly enough, three of them are predicted to have putative function in embryonic development (similar to PACE4A-II, similar to aminopeptidase A) and in ovulation (“similar to ADAM metallopeptidase with thrombospondin type motif”, ADAMTS-17). In fact, in vertebrates, specification of anteroposterior (A/P) and left-right (L/R) axes depends on TGFbeta-related signals and their endoproteolytic maturation by the pro-protein convertase SPC1/Furin and by related proteins such as PACE4 [28, 29]. The identification of an ADAMTS in the ovary, together with its abnormal expression in anovulatory PR knockout mice, suggests that it plays a critical role in follicular rupture [30]. In fact, in hens, ovulation depends on many proteases locally present in the follicle such as metalloproteinases and plasminogen activators. These proteases are secreted by granulosa cells and theca to contribute to tissue remodelling by degrading components of the extracellular matrix [31, 32]. The involvement of “similar to PACE4A-II”, “similar to aminopeptidase A” and “similar to ADAM metallopeptidase with thrombospondin type motif”, in the sub-cited biological functions in *Gallus gallus* has to be confirmed.

To better appreciate which of these proteases and antiproteases are actual components of the egg, we compared this list of 15 candidates with proteases and antiproteases identified in the egg yolk by proteomics [14, 15]. Results show that only two of them are recovered in egg

yolk (Fig. 2, additional files 2 and 3). These two proteins correspond to “Similar to nothepsin” and “similar to porin”, the highest over-expressed proteins from the list of 15 candidates (Table 2). These proteins are also included in the top-ten over-expressed genes of the global analysis (Table 1). “Similar to nothepsin” shares a high protein sequence similarity with cathepsin D [14], another aspartic protease that is involved in the maturation of oocyte precursors [12]. Interestingly, some have shown that in Antarctic fish, nothepsin is uniquely expressed by the liver of females [33]. The function of similar to nothepsin in *Gallus gallus* and its homologous has not yet been explored, but as an aspartic protease it might assist cathepsin D in the processing of egg yolk precursors. “Similar to porin” is a predicted antiprotease containing one kunitz domain and nine whey-acidic protein domains. The presence of these multiple domains with potential inhibitory activities towards serine proteases suggests that this “similar to porin” could constitute a potent regulator of proteolytic activities within the egg yolk. This protein is related to “WAP four-disulfide core domain proteins”. Members of this family include elafin and secretory leucocyte protease inhibitor, which are involved in various aspects of mucosal immunity [34]. Another hypothesis is that “similar to porin” could be associated with some egg yolk precursors to protect them from proteolytic activities/inactivation in the plasma, similarly to apovitellenin-1 that inhibits lipase activities preventing the loss of triglycerides from VLDL, on their way from the liver to the growing oocytes [22].

As some proteins from the perivitelline membrane are expressed by the liver at sexual maturity of hen [24], we also compared the list of candidates with that of proteases and antiproteases identified in the vitelline membrane’s proteome [35]. Results revealed that “similar to oviductin”, which is over-expressed by the liver of laying hens (four-fold difference) is a protease that is specific to the vitelline membrane, as compared with the other

egg compartments [35] (Additional Table 2). This protease has been reported to be a key factor mediating sperm-binding to the oocyte, in *Xenopus* [36] and mammals [37]. It is responsible for the maturation/proteolysis of major glycoproteins composing the zona pellucida [37] but also proteins from the inner layer of the vitelline membrane of avian oocytes [38]. We show for the first time that the avian homologous to oviductin is expressed by the liver of laying hens and that its expression is likely to be sex-steroids dependant.

Thus, in the list of the 15 proteases and antiproteases over-expressed by the liver of laying hens by both oligoarray and qRT-PCR, only three of them were actually known components of the egg yolk or the vitelline membrane. Further analyses were therefore needed to better appreciate the respective role of the other 12 enzymes and inhibitors in the process of egg yolk formation or the vitelline membrane.

To predict which of this list of proteases and antiproteases that are secreted into the blood stream, we searched for the presence of signal peptides (SignalP, v4.0, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Only four of them were predicted to be secreted through the classical secretory pathway (similar to nothepsin, similar to oviductin, similar to chymotrypsin inhibitor, similar to ubiquitin specific proteinase 40). However, it is noteworthy that some egg proteins do not possess a conventional signal peptide (the best example is probably ovalbumin, the major egg white protein) meaning that the restricted list of four potential secreted proteins as determined by SignalP might be slightly underestimated. Protein can also be secreted through unconventional pathways including direct translocation across plasma membranes and vesicle-mediated exocytosis [39]. Such unconventional pathways can be predicted using SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>), a software that has been initially designed to predict protein secretion essentially in mammals and bacteria. The use of this program to predict non classical secretory pathways in others vertebrates, including *Gallus gallus*, has not been yet validated. However, when considering ovalbumin, a

protein which does not possess a classical signal peptide and which is unambiguously secreted into the egg, it is predicted to be secreted through an unconventional secretory pathway using SecretomeP (NNscore = 0.59, considering that non-classically secreted proteins should obtain an NN-score exceeding the normal threshold of 0.5, but not at the same time be predicted to contain a signal peptide). Similarly, « similar to porin », that is over-expressed by the liver of laying hens and that has been identified in the egg yolk (see above) does not possess classical signal peptide but is predicted to be secreted through an unconventional pathway (NNscore = 0.64). These results suggest that SecretomeP can be informative to predict some non-classical secreted proteins in *Gallus gallus*. Using this approach applied to the list of 15 genes, four have a signal peptide (see above), and seven would be secreted through an unconventional pathway (similar to putative porin, similar to PCAE4A-II, similar to aminopeptidase A, similar to N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2, similar to inner mitochondrial membrane peptidase 2 isoform 2, Hypothetical protein). Four of these 15 proteins are predicted to be integral to membrane by homology with their human counterpart (similar to inner mitochondrial membrane peptidase 2 isoform 2) and using tools for predicting transmembrane domains (similar to aminopeptidase A, similar to ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 17 preproprotein and N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Additionally, one of them is potentially localized in the nucleus (similar to ubiquitin specific peptidase 3). By combining both the literature on mammalian homologous and predictive tools for secretion and for transmembrane domains, we can propose a list of seven proteins that could potentially be secreted to be incorporated in the egg yolk or the vitelline membrane. These include “similar to nothepsin”, “similar to putative porin” that were identified in the egg yolk and “similar to oviductin” which was found to be a component of the vitelline membrane. To summarize, our approach revealed at least 4 relevant new candidates (similar

to PACE4A-II, similar to chymotrypsin inhibitor, similar to ubiquitin specific proteinase 40, and a hypothetical protein) that are over-expressed by the liver of sexually mature hens and that would be potentially secreted into the blood stream to play a role during egg yolk or vitelline membrane formation.

Additional studies will be needed to better appreciate the biological relevance of these 4 proteases and antiproteases in the process of egg formation. Some of these components might not be involved in vitellogenesis and rather contribute to liver homeostasis in response to the increased lipogenesis and protein biosynthesis observed in liver at sexual maturity. At least one protein of this limited list of four new candidates could have a role in hepatic protein catabolism as an ubiquityl hydrolase (similar to ubiquitin specific proteinase 40). In fact, it has been shown that ubiquitin specific peptidases are involved in the maintenance of genome integrity [40] and in the homeostasis of cellular proteins [41].

From the comparative analyses between the present transcriptomic approach and the published proteomic data, we also emphasised the fact that the majority of egg yolk proteases and antiproteases are not differentially expressed by the liver between mature hens and immature pullets. Thirty-seven proteases and antiproteases were identified in egg yolk [14, 15]. Twenty-nine of the corresponding genes out of the thirty-seven genes were actually spotted on the oligo-array (See additional files 2 and 3) and 13 were expressed by the liver of both mature and immature hens (See additional files 2 and 3, $0.77 < \text{Oligoarray ratio} < 1.3$). Most of these 13 egg yolk proteases and antiproteases were initially defined as blood components playing a role in various plasmatic cascades including coagulation and fibrinolysis (thrombin, factors IX, anticoagulant protein C, hepatocyte growth factor like, hepatocyte growth factor activator, plasminogen, similar to, similar to alpha 2 plasmin inhibitor and similar to angiotensinogen) [16, 42-44]). This consideration suggests that all

these components which are minor components of egg yolk, might not necessarily be actively incorporated into the yolk but rather be non-selectively engulfed by endocytic vesicles after interaction of specific egg yolk components with their oocyte-receptor (Very low density lipoproteins, vitellogenins, immunoglobulins Y, etc.). In fact, it has been shown that plasma alpha-2 macroglobulin, an antiprotease displaying broad inhibitory activity, can interact with oocyte-receptors [45]. Therefore, most plasmatic proteases which are entrapped in a complex with alpha-2 macroglobulin could be internalized into the yolk together with the antiprotease and consequently, alpha-2 macroglobulin could serve as a carrier for plasmatic proteases into the yolk [46]. Six of the thirteen were not found to be statistically expressed by the liver regardless the sexual maturity (See additional files 2 and 3, ^(a)). These results suggest that these egg yolk components might be expressed by other tissues than the liver, i.e., theca or granulosa cells.

Regarding the vitelline membrane, twelve proteases and antiproteases were identified in this compartment and eight of them were found to be spotted on the oligoarray (Additional files 2 and 3). As we mentioned before, one of them is over-expressed by the liver at sexual maturity (“similar to oviductin”). One other (Follistatin) is expressed equally by the liver of laying and prelaying pullets (additional file 3). The conclusion is that most proteases and antiproteases that were identified in the vitelline membrane are not expressed by the liver (See additional files 2 and 3). These results are consistent with the fact that the vitelline membrane is sequentially formed first, within the ovary and second, in the oviducal region called infundibulum [47]. Next study will consist of analyzing the expression profiling of proteases and antiproteases in infundibulum but also in granulosa cells which secrete some proteins that are incorporated into the vitelline membrane [48, 49] to better appreciate which of the liver or the granulosa cells or the infundibulum is responsible for proteases or antiproteases identified in the vitelline membrane [35].

Conclusions

In the last decade, the development of high throughput methods including proteomics combined to the considerable enrichment of chicken databases, thanks to the *Gallus gallus* genome sequencing, have completely changed the protein biochemistry of the egg. About 50 different proteins had been identified before the advent of all these new approaches. To date, several hundreds of new egg constituents have been predicted in egg. When considering the unique egg yolk compartment, 260 distinct gene products have been identified. This list includes about ten major components (serum albumin, apovitellenin, ovalbumin, vitellogenins, immunoglobulins, apolipoprotein and an avidin homologous) and many minor components, the function of which is not known [14, 15]. Egg yolk proteins result from the expression of their precursors by the liver. These precursors are secreted into the blood prior to their uptake by the oocyte in the ovarian follicle. However, the liver expresses many various proteins which are not related to vitellogenesis (factors in hemostasis and fibrinolysis, carrier proteins, immune effectors) and which can be unselectively incorporated into the egg yolk together with the endocytosis of egg yolk-specific proteins. In fact, the functional annotation of egg yolk proteins have revealed that many proteases and antiproteases identified in the egg yolk are known actors of coagulation/fibrinolysis cascades [16]. The biological significance of the presence of such molecules in the egg yolk is not known and with regards to their low concentration in this compartment, it is necessary to better assess whether their presence is fortuitous or necessary for the functional properties of the egg yolk. To address some point of this question, we focused on the expression of egg yolk proteases and antiproteases in the liver of laying hens. And, to get rid of all the proteins unrelated to egg yolk formation, we compared this expression with that of the liver of prelaying pullets (unable to form an egg), using a transcriptomic approach. Results revealed 15 proteases and

antiproteases, which are over-expressed by the liver at sexual maturity of hens. Only two of them are known constituents of the egg yolk (“similar to nothepsin” and “similar to porin”) and one of them (“similar to oviductin”) was identified in the proteomic analysis of the vitelline membrane. Further studies will be needed to assess the mechanism by which “similar to nothepsin” and “similar to porin”, and “similar to oviductin” are incorporated into the egg yolk and the vitelline membrane, respectively. The next challenge will consist of characterizing the biological activities of these three relevant proteins in the process of egg yolk formation/maturation and fertilization or later on after oviposition, to assist embryonic development. In addition, we have shown that most proteases and antiproteases which have been identified in egg yolk by proteomics are not specifically expressed by the liver in relation to the egg yolk formation. Altogether, this work emphasises the complementarities of proteomics, transcriptomics and predictive tools to investigate the biological significance of proteins related to egg formation.

List of abbreviations used (if any)

Authors' details

¹INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France

²Division of Genetics and Genomics, The Roslin Institute and Royal Dick School of Veterinary Studies, University of Edinburgh, Roslin, Midlothian, United Kingdom

Email addresses: mcbourin@tours.inra.fr, jgautron@tours.inra.fr, mberges@tours.inra.fr, christelle.hennequet@tours.inra.fr, cedric.cabau@tours.inra.fr, ian.dunn@roslin.ed.ac.uk, ynys@tours.inra.fr, srehaul@tours.inra.fr

Authors' contributions

MCB was involved in designing and planning the study, collecting the tissues, in oligoarray hybridization, data analysis and in the writing of the manuscript. JG participated in the

experimental design, collection of samples, data analysis and as an expert in transcriptomics. MB was involved in the RNA extraction and qRT-PCR experiments. CHA performed the statistical analyses of the data. CC was requested for his expertise in the use of bioinformatic tools to cross chicken databases and to perform the functional annotation of the genes. ID participated in the writing and critical review of the manuscript based on his expertise in transcriptomics and his good knowledge of the *Gallus gallus* model. YN contributed to the design of the experiment, scientific analyses and discussions and actively participated in the writing of the paper. SRG was involved in the coordination of the study, in data analyses and in the writing of the paper. All authors read the manuscript and contributed to the critical revision of the paper.

Acknowledgements and Funding

This research was supported by the French National Research Agency (OVO-mining, ANR-09-BLAN-0136), Region Centre and INRA, Physiologie Animale et Système d'élevage division for the financial support of M. Bourin's PhD.

We also acknowledge the experimental unit PEAT (INRA, UE1295 Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours, F-37380 Nouzilly, France), and more particularly Frédéric Mercierand for breeding and providing birds and Harold Rigoreau for his assistance in collecting tissues.

We thank Julie Dalifard, (UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France) for the excellent quality of her technical support.

References

1. Etches RJ: Reproduction in Poultry. Wallingford: CAB International; 1996.
2. Nys Y, Guyot N: Egg formation and chemistry. In: *Improving the safety and quality of egg and egg products*. Edited by Nys Y, Bain M, Van Immerseel F, vol. 1. Cambridge, United Kingdom: Woodhead publishing Ltd 2011 183-208.
3. Deeley RG, Mullinix DP, Wetekam W, Kronenberg HM, Meyers M, Eldridge JD, Goldberger RF: Vitellogenin synthesis in the avian liver. Vitellogenin is the precursor of the egg yolk phosphoproteins. *J Biol Chem* 1975, 250(23):9060-9066.
4. Wiskocil R, Bensky P, Dower W, Goldberger RF, Gordon JI, Deeley RG: Coordinate regulation of two estrogen-dependent genes in avian liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980, 77(8):4474-4478.
5. Wiskocil R, Goldman P, Deeley RG: Cloning and structural characterization of an estrogen-dependent apolipoprotein gene. *J Biol Chem* 1981, 256(18):9662-9667.
6. Lee DC, McKnight GS, Palmiter RD: The action of estrogen and progesterone on the expression of the transferrin gene. A comparison of the response in chick liver and oviduct. *J Biol Chem* 1978, 253(10):3494-3503.
7. Griffin HD, Perry MM, Gilbert AB: Yolk formation. In *Physiology and Biochemistry of the domestic fowl* 1984, Volume 5(Edited by Freeman B. M. London : Academic Press.):345-380.
8. Perry MM, Gilbert AB, Evans AJ: The structure of the germinal disc region of the hen's ovarian follicle during the rapid growth phase. *J Anat* 1978, 127(Pt 2):379-392.
9. Evans AJ, Perry MM, Gilbert AB: The demonstration of very low density lipoprotein in the basal lamina of the granulosa layer in the hen's ovarian follicle. *Biochim Biophys Acta* 1979, 573(1):184-195.

10. Perry MM, Gilbert AB, Evans AJ: Electron microscope observations on the ovarian follicle of the domestic fowl during the rapid growth phase. *J Anat* 1978, 125(Pt 3):481-497.
11. Schneider WJ: Receptor-mediated mechanisms in ovarian follicle and oocyte development. *Gen Comp Endocrinol* 2009, 163(1-2):18-23.
12. Retzek H, Steyrer E, Sanders EJ, Nimpf J, Schneider WJ: Molecular cloning and functional characterization of chicken cathepsin D, a key enzyme for yolk formation. *DNA Cell Biol* 1992, 11(9):661-672.
13. Carnevali O, Cionna C, Tosti L, Lubzens E, Maradonna F: Role of cathepsins in ovarian follicle growth and maturation. *Gen Comp Endocrinol* 2006, 146(3):195-203.
14. Mann K, Mann M: The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. *Proteomics* 2008, 8(1):178-191.
15. 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(8):1241-1252.
16. D'Alessandro A, Righetti PG, Fasoli E, Zolla L: The egg white and yolk interactomes as gleaned from extensive proteomic data. *Journal of Proteomics* 2010, 73(5):1028-1042.
17. Jonchere V, Rehault-Godbert S, Hennequet-Antier C, Cabau C, Sibut V, Cogburn LA, Nys Y, Gautron J: Gene expression profiling to identify eggshell proteins involved in physical defense of the chicken egg. *BMC Genomics* 2010, 11:57.
18. Delmar P, Robin S, Daudin JJ: VarMixt: efficient variance modelling for the differential analysis of replicated gene expression data. *Bioinformatics* 2005, 21(4):502-508.

19. Casel P, Moreews F, Lagarrigue S, Klopp C: sigReannot: an oligo-set re-annotation pipeline based on similarities with the Ensembl transcripts and Unigene clusters. *BMC Proc* 2009, 3 Suppl 4:S3.
20. Mac Lachlan I, Nimpf J, Schneider WJ: Avian riboflavin binding protein binds to lipoprotein receptors in association with vitellogenin. *J Biol Chem* 1994, 269(39):24127-24132.
21. White HB, 3rd: Sudden death of chicken embryos with hereditary riboflavin deficiency. *J Nutr* 1996, 126(4 Suppl):1303S-1307S.
22. Schneider WJ, Carroll R, Severson DL, Nimpf J: Apolipoprotein VLDL-II inhibits lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins in the laying hen. *J Lipid Res* 1990, 31(3):507-513.
23. Caldwell RB, Kierzek AM, Arakawa H, Bezzubov Y, Zaim J, Fiedler P, Kutter S, Blagodatski A, Kostovska D, Koter M *et al*: Full-length cDNAs from chicken bursal lymphocytes to facilitate gene function analysis. *Genome Biol* 2005, 6(1):R6.
24. Bausek N, Waclawek M, Schneider WJ, Wohlrab F: The major chicken egg envelope protein ZP1 is different from ZPB and is synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2000, 275(37):28866-28872.
25. Bausek N, Ruckenbauer HH, Pfeifer S, Schneider WJ, Wohlrab F: Interaction of sperm with purified native chicken ZP1 and ZPC proteins. *Biol Reprod* 2004, 71(2):684-690.
26. Kaser M, Kambacheld M, Kisters-Woike B, Langer T: Oma1, a novel membrane-bound metallopeptidase in mitochondria with activities overlapping with the m-AAA protease. *J Biol Chem* 2003, 278(47):46414-46423.

27. Behnke J, Schneppenheim J, Koch-Nolte F, Haag F, Saftig P, Schroder B: Signal-peptide-peptidase-like 2a (SPPL2a) is targeted to lysosomes/late endosomes by a tyrosine motif in its C-terminal tail. *FEBS Lett* 2011, 585(19):2951-2957.
28. Mesnard D, Donnison M, Fuerer C, Pfeffer PL, Constam DB: The microenvironment patterns the pluripotent mouse epiblast through paracrine Furin and Pace4 proteolytic activities. *Genes Dev*, 25(17):1871-1880.
29. Constam DB, Robertson EJ: SPC4/PACE4 regulates a TGFbeta signaling network during axis formation. *Genes Dev* 2000, 14(9):1146-1155.
30. Robker RL, Russell DL, Espey LL, Lydon JP, O'Malley BW, Richards JS: Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97(9):4689-4694.
31. Politis I, Wang L, Turner JD, Tsang BK: Changes in tissue-type plasminogen activator-like and plasminogen activator inhibitor activities in granulosa and theca layers during ovarian follicle development in the domestic hen. *Biol Reprod* 1990, 42(5-6):747-754.
32. Liu YX: Plasminogen activator/plasminogen activator inhibitors in ovarian physiology. *Front Biosci* 2004, 9:3356-3373.
33. Riggio M, Scudiero R, Filosa S, Parisi E: Sex- and tissue-specific expression of aspartic proteinases in *Danio rerio* (zebrafish). *Gene* 2000, 260(1-2):67-75.
34. Wilkinson TS, Roghanian A, Simpson AJ, Sallenave JM: WAP domain proteins as modulators of mucosal immunity. *Biochem Soc Trans* 2011, 39(5):1409-1415.
35. Mann K: Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. *Proteomics* 2008, 8(11):2322-2332.
36. 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(4):989-995.
37. Boatman DE: Responses of gametes to the oviductal environment. *Hum Reprod* 1997, 12(11 Suppl):133-149.
 38. Pan J, Sasanami T, Nakajima S, Kido S, Doi Y, Mori M: Characterization of progressive changes in ZPC of the vitelline membrane of quail oocyte following oviductal transport. *Mol Reprod Dev* 2000, 55(2):175-181.
 39. Nickel W: Pathways of unconventional protein secretion. *Curr Opin Biotechnol* 2010, 21(5):621-626.
 40. Nicassio F, Corrado N, Vissers JH, Areces LB, Bergink S, Marteijn JA, Geverts B, Houtsmuller AB, Vermeulen W, Di Fiore PP *et al*: Human USP3 is a chromatin modifier required for S phase progression and genome stability. *Curr Biol* 2007, 17(22):1972-1977.
 41. Baek KH: Conjugation and deconjugation of ubiquitin regulating the destiny of proteins. *Exp Mol Med* 2003, 35(1):1-7.
 42. Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC: Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2007, 5 Suppl 1:102-115.
 43. Walsh PN, Ahmad SS: Proteases in blood clotting. *Essays Biochem* 2002, 38:95-111.
 44. Miyazawa K: Hepatocyte growth factor activator (HGFA): a serine protease that links tissue injury to activation of hepatocyte growth factor. *FEBS J* 2010, 277(10):2208-2214.
 45. Borth W: Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *FASEB J* 1992, 6(15):3345-3353.

46. Jacobsen L, Hermann M, Vieira PM, Schneider WJ, Nimpf J: The chicken oocyte receptor for lipoprotein deposition recognizes alpha 2-macroglobulin. *J Biol Chem* 1995, 270(12):6468-6475.
47. Nys Y, Guyot N: Egg formation and chemistry. In: *Improving the safety and quality of eggs and egg products*. Edited by Nys Y, Bain M, Immersel FV, vol. 1. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited; 2011: 83-132.
48. Waclawek M, Foisner R, Nimpf J, Schneider WJ: The chicken homologue of zona pellucida protein-3 is synthesized by granulosa cells. *Biol Reprod* 1998, 59(5):1230-1239.
49. Takeuchi Y, Nishimura K, Aoki N, Adachi T, Sato C, Kitajima K, Matsuda T: 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* 1999, 260(3):736-742.

Figure legends

Figure 1 Distribution of genes that are over-expressed in the liver of laying hens versus pre-laying pullets. Numbers illustrate the numbers of genes that are known, unknown/uncharacterized or having homologous in other species (similar to). Their relative percentages are indicated in parenthesis.

Figure 2 Venn diagram of over-expressed proteases and antiproteases in the liver of laying hens (by both oligoarray and q-RT-PCR), compared to proteases and antiproteases identified in the yolk and the vitelline membrane (VM) and which have a corresponding RIGG on the oligoarray (additional files 2 and 3).

Tables and captions

Table 1. Top 10 over-expressed genes in livers of laying hens

Table 2. List of over-expressed proteases and antiproteases

Table 3. Verification of over-expressed proteases and antiproteases by q-RT-PCR. Comparison with oligoarray data.

Table 4. Functional annotation of proteases and antiproteases over-expressed in the liver of laying hens.

Description of additional data files (if any)

Additional Table 1: List of primers used to analyse the expression of hepatic proteases and antiproteases by q-RT-PCR in laying versus prelaying hens.

Additional Table 2: List of proteases identified in the egg yolk [14, 15] and the vitelline membrane (VM) [35]

Additional Table 3: List of antiproteases identified in the egg yolk [14, 15] and the vitelline membrane (VM) [35]

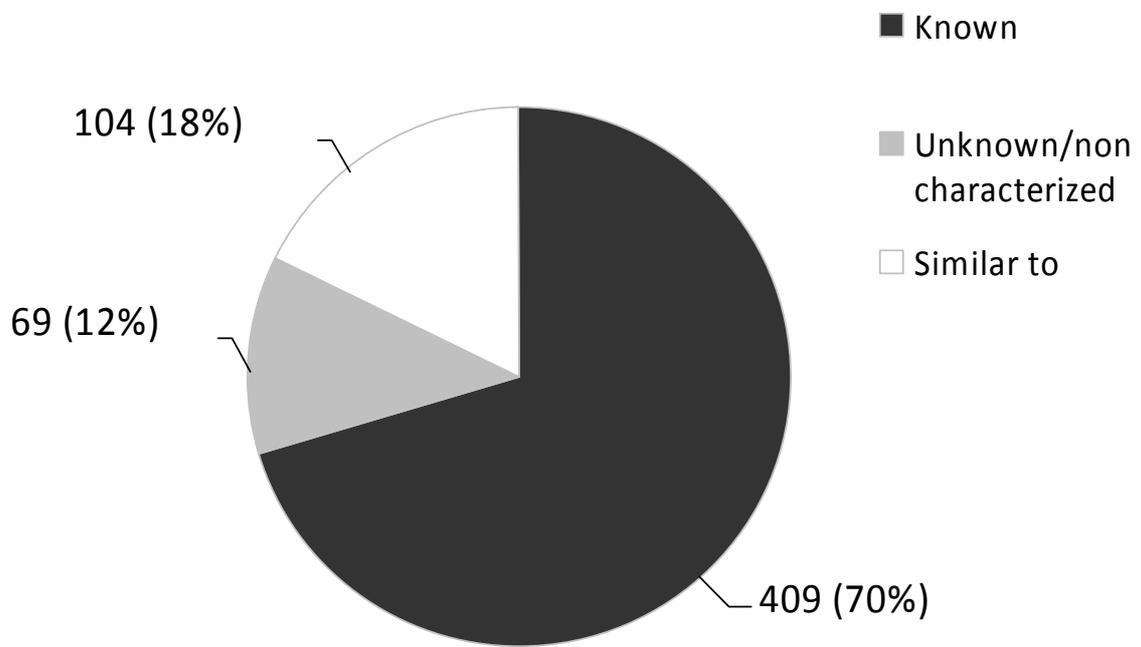


Fig. 1

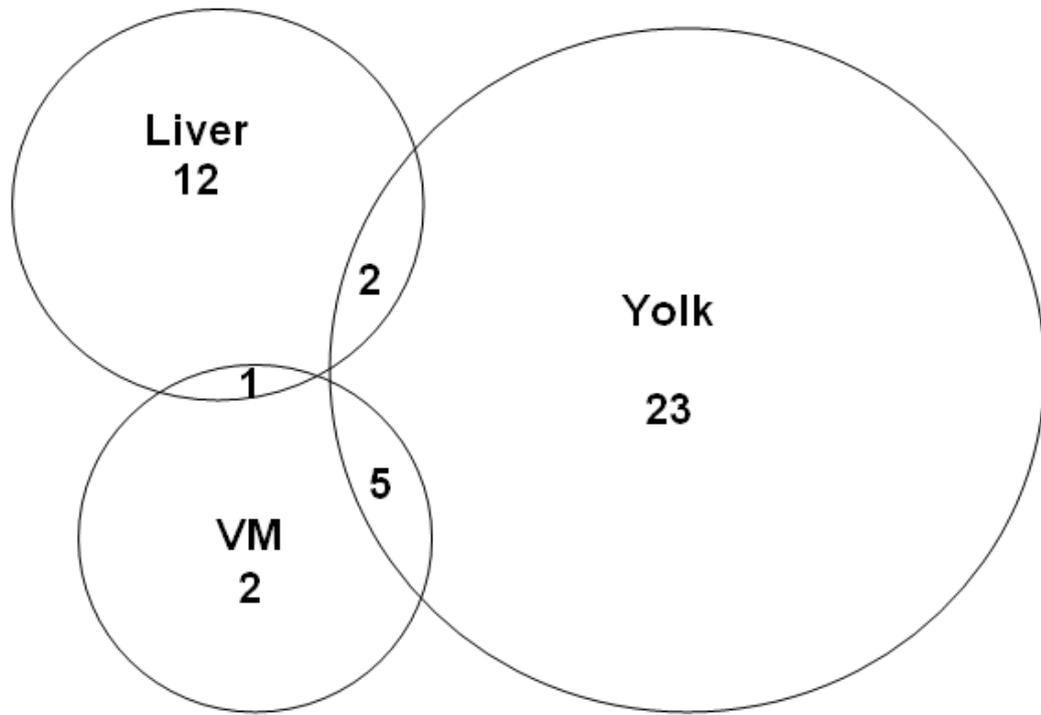


Fig. 2

Table 1

Name (<i>Gallus gallus</i>)	GeneID	Ratio L/PL	Function (Uniprot)
Riboflavin-binding protein precursor	396449	66.9	Required for the transport of riboflavin to the developing oocyte (future yolk)
Membrane-bound O-acyltransferase domain-containing protein 2	421925	50.7	Phospholipid biosynthetic process: Lysophospholipid acyltransferases catalyze the reacylation step of the phospholipid remodeling pathway also known as the Lands cycle
Vitellogenin-3 precursor	424534	45.9	Precursor of the egg-yolk proteins that are sources of nutrients during early development of oviparous organisms
Apovitellenin-1 precursor	396476	42.4	Protein component of the very low density lipoprotein (VLDL) of egg-laying females. Potent lipoprotein lipase inhibitor, preventing the loss of triglycerides from VLDL on their way from the liver to the growing oocytes
PREDICTED: Similar to nothepsin	417848	34.8	Unknown
Vitellogenin-1 precursor	424547	33.8	Precursor of the egg-yolk proteins that are sources of nutrients during early development of oviparous organisms
PREDICTED: similar to phosphodiesterase 11A	424133	24.1	Signal transduction
PREDICTED: similar to hypothetical protein	423899	21.1	Unknown
PREDICTED: similar to putative porin	419301	20.9	Unknown
Zona pellucida glycoprotein 1	395418	15.1	Major component of the peri-vitelline membrane

L: livers of laying hens; PL, livers of prelaying pullets

Table 2.

Name [Gallus gallus]	Gene ID/Ensembl transcript	Ratio L/PL	Superfamily /domains	Activity
PREDICTED: similar to nothepsin	417848/ENSGALT00000016271	34.8	Peptidase A1	Aspartate protease
PREDICTED: similar to putative porin	419301/ENSGALT00000011045	20.9	Kunitz	Serine protease inhibitor
PREDICTED: similar to papilin	428873/ENSGALT00000015156	2.7	Kunitz	Serine protease inhibitor
PREDICTED: similar to oviductin	769290/ENSGALT00000008522	4.0	Peptidase S1	Serine protease
PREDICTED: similar to ubiquitin specific peptidase 3	415369/ENSGALT00000005420	2.7	Peptidase C19	Ubiquitinyl hydrolase
PREDICTED: hypothetical protein RCJMB04_12e24	427467/ENSGALT00000020596	2.1	Peptidase M1	Aminopeptidase
PREDICTED: similar to ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 17 preproprotein	415515/ENSGALT00000011448	2.1	Peptidase M12B	Zinc metallopeptidase
PREDICTED: similar to PACE4A-II	395454/ENSGALT00000011615	2.0	Peptidases S8, S53	Serine protease
PREDICTED: similar to aminopeptidase A	429156/ENSGALT00000019779	1.9	Peptidase M1	Aminopeptidase
PREDICTED: similar to N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2	428771/ENSGALT00000014775	1.9	Peptidase M28	Glutamate carboxypeptidase II (GCP II)-like
PREDICTED: similar to aggrecanase-2	427971/ENSGALT00000025470	1.7	Peptidase M12B	Zinc metalloprotease
PREDICTED: similar to chymotrypsin inhibitor	768734/ENSGALT00000035386	1.7	Kazal	Serine protease inhibitor
PREDICTED: hypothetical protein	426746/ENSGALT00000022924	1.6	Peptidase C65	Cysteine protease
PREDICTED: similar to ubiquitin specific proteinase 40	424029/ENSGALT00000006731	1.5	Peptidase C19	Ubiquitinyl hydrolase
PREDICTED: similar to OMA1 homolog	424670/ENSGALT00000017659	1.4	Peptidase M48	Zinc Metalloprotease
PREDICTED: similar to inner mitochondrial membrane peptidase 2 isoform 2	417780/ENSGALT00000015446	1.4	Peptidase S24/S26	LexA-related/ type I signal peptidase
PREDICTED: hypothetical protein	770448/ENSGALT00000019464	1.4	DUF862/ PPPDE domain	Predicted thiol peptidase
Signal peptide peptidase-like 2A	415450/ENSGALT00000038799	1.3	Peptidase A22B	Signal peptide peptidase

Table 3

Name [Gallus gallus]	Entrez Gene ID	Microarray ID	Oligoarray	qRT-PCR	
			log2 ratio	log2 ratio	P-value
PREDICTED: similar to nothepsin	417848	RIGG15447	5,12	4,96	<0,0001
PREDICTED: similar to putative porin	419301	RIGG05232	4,38	6,11	<0,0001
PREDICTED: similar to oviductin	769290	RIGG08201	2,00	2,65	<0,005
PREDICTED: similar to papilin	428873	RIGG08713	1,45	1,96	<0,05
PREDICTED: similar to ubiquitin specific peptidase 3	415369	RIGG07977	1,42	1,23	<0,001
PREDICTED: hypothetical protein RCJMB04_12e24	427467	RIGG01898	1,08	0,83	<0,05
PREDICTED: similar to ADAM metallopeptidase with tthrombospondin type 1 motif	415515	RIGG13714	1,06	1,35	<0,05
PREDICTED: similar to PACE4A-II	395454	RIGG05201	1,03	1,54	<0,005
PREDICTED: similar to N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2	428771	RIGG16663	0,99	1,64	<0,05
PREDICTED: similar to aminopeptidase A	429156	RIGG14889	0,98	0,77	<0,001
PREDICTED: similar to aggrecanase-2	427971	RIGG18751	0,77	0,66	NS
PREDICTED: similar to chymotrypsin inhibitor	768734	RIGG04817	0,76	0,69	<0,05
PREDICTED: hypothetical protein	426746	RIGG05811	0,69	0,91	<0,001
PREDICTED: similar to ubiquitin specific proteinase 40	424029	RIGG08062	0,63	0,70	<0,001
PREDICTED: similar to OMA1 homolog	424670	RIGG15950	0,48	0,27	NS
PREDICTED: similar to inner mitochondrial membrane peptidase 2 isoform 2	417780	RIGG02846	0,45	1,04	<0,005
PREDICTED: hypothetical protein	770448	RIGG16560	0,45	0,61	<0,01
Signal peptide peptidase-like 2A	415450	RIGG13000	0,36	-0,09	NS

Table 4

Biological process	Protein accession number	Protein Name	Related GO terms	Biological activity
Protein metabolism	E1BVJ0	PREDICTED: similar to inner mitochondrial membrane peptidase 2 isoform 2	GO:0006508	proteolysis
	XP_001231898	PREDICTED: Hypothetical protein RCJMB04_12e24	GO:0006508	proteolysis
	XP_416090	PREDICTED: similar to nothepsin	GO:0006508	proteolysis
	XP_416687	PREDICTED: similar to ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif	GO:0006508	proteolysis
	XP_421884	PREDICTED: similar to ubiquitin specific proteinase 40	GO:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process
	XP_422503	PREDICTED: similar to OMA1 homolog	GO:0006508	proteolysis
	XP_425541	PREDICTED: similar to aggrecanase-2	GO:0006508	proteolysis
	XP_426327	PREDICTED: similar to aminopeptidase A	GO:0006508	proteolysis
Multicellular organismal development, cell growth and proliferation	XP_413892	PREDICTED: similar to PACE4A-II	GO:0007354 GO:0007368	zygotic determination of anterior/posterior axis, embryo; determination of left/right symmetry
	XP_416687	PREDICTED: similar to ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif	GO:0001542 GO:0001822	ovulation from ovarian follicle; kidney development
	XP_426327	PREDICTED: similar to aminopeptidase A	GO:0016477 GO:0008283	cell migration; cell proliferation
Signal transduction	XP_426327	PREDICTED: similar to aminopeptidase A	GO:0007267	cell-cell signaling

Additional Table 1

Name (<i>Gallus gallus</i>)	Entrez Gene ID	Oligoarray ID	Forward primers	Backward primers
PREDICTED: similar to nothepsin	417848	RIGG15447	CCACATCAGCTTCACCATTG	CGTCCCTGTGAGCAGATTTT
PREDICTED: similar to putative porin	419301	RIGG05232	TGTGGAGGAGTGTGAGAGTGA	AGAGAGGCAGGCATGCAGAT
PREDICTED: similar to papilin	428873	RIGG08713	TGCAGAGTTTGATGGGACAG	GCACTTGTCCCTCCTTCTTGG
PREDICTED: similar to ubiquitin specific peptidase 3	415369	RIGG07977	GTTGTGCATCATGGTTCAGG	TGTGTCCCGTGGACTTGATA
PREDICTED: hypothetical protein RCJMB04_12e24	427467	RIGG01898	CGGTTCTGGCAAGTACATTA	GCCAGAAGTGTCAAGCCAAT
PREDICTED: similar to ADAM metallopeptidase with tthrombospondin type 1 motif	415515	RIGG13714	CAGACAGAGGAAATGCGACA	CCCAGTGGAGAGCAGAAAAG
PREDICTED: similar to PACE4A-II	395454	RIGG05201	CTGCTCCTGTGATGGCTACA	GGTGACAATTTTCCGCTCAT
PREDICTED: similar to N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2	429156	RIGG14889	ACTGGAATGGGACATGGAAA	GGTGGCTCTTTGGTACTGT
PREDICTED: similar to aminopeptidase A	428771	RIGG16663	GATTCTGGAAGCCATTTGGA	ATTGCCTGAATTCTGCATCC
PREDICTED: similar to aggrecanase-2	427971	RIGG18751	GGGACCATATGCTCTCCTGA	CAAGGCTTGGAAAGCATCAAT
PREDICTED: similar to chymotrypsin inhibitor	768734	RIGG04817	AAGCTGGAAGAGGGGAACAG	TGACACTCCCCATCACTCAA
PREDICTED: hypothetical protein	426746	RIGG05811	CCAGGAGACGGTGGAAATACA	TGTCAGTGCCTTGAATCTGC
PREDICTED: similar to ubiquitin specific proteinase 40	424029	RIGG08062	TCTCTCCAGTGCCTGAGGAT	TGCCAGCTGTCACCTGATAA
PREDICTED: similar to OMA1 homolog	424670	RIGG15950	ACTGTTGGTGTTCGGAAAGG	ATGGATAGCCCAGGTGAGTG
PREDICTED: similar to inner mitochondrial membrane peptidase 2 isoform 2	417780	RIGG02846	GCATATTTGGGTGGAAGGTG	TGCTCTCTCTGGAGAGGTTTG
PREDICTED: hypothetical protein	770448	RIGG16560	TCTTTCTTCCTTGGGGGAGT	GCCGTAAAGCTTGTCCAAAA
Signal peptide peptidase-like 2A	415450	RIGG13000	GATGCAGCTCCTGGAATAGC	ACTTCTCATCCCCACCTCT

Additional Table 2



Proteases name (<i>Gallus gallus</i>)	Ensembl Transcript ID	Oligoarray ID	Oligoarray Ratio Liver L/PL	Yolk	Vitelline membrane
56 kDa protein	ENSGALT00000011138	RIGG00309	0.691	+	
Aminopeptidase N (Ey)	ENSGALT00000013470	RIGG14412	0.929	+	
Anticoagulant protein C	ENSGALT00000002745	RIGG07767	1.084	+	
Coagulation factor IX	ENSGALT00000010525	RIGG13402	1.020	+	
Coagulation factor X	ENSGALT00000027175	Missing		+	
Complement factor B-like protease	-(b)	?		+	
Hepatocyte growth factor like	ENSGALT00000036285	RIGG07902	0.829	+	
Similar to aspartic protease nothepsin	ENSGALT00000016271	RIGG15447	34.846	+	
Similar to carboxypeptidase D	ENSGALT00000006838	RIGG12160	0.916	+	
Similar to complement component C2	ENSGALT00000041167	Missing		+	
Similar to Hepatocyte growth factor activator	ENSGALT00000025185	RIGG09473	1.169	+	
Similar to oviductin	ENSGALT00000008522	RIGG08201	4.014		+
Similar to plasminogen	ENSGALT00000006829	RIGG08074	0.896	+	
Similar to thrombin-activable fibrinolysis inhibitor	ENSGALT00000027441	RIGG09638	1.018	+	
Similar to transmembrane protease serine 13	ENSGALT00000011876	RIGG05703	-(a)	+	
Similar to transmembrane protease serine 9	ENSGALT00000000620	RIGG07595	-(a)	+	+
Similar to ubiquitin specific protease 42	ENSGALT00000005338	RIGG11623	-(a)	+	
Thrombin	ENSGALT00000013559	RIGG14442	0.978	+	

(a) There is no statistical evidence of expression of these genes in our experimental design

L, liver of laying hens; PL, liver of prelaying hens

(b) No ensembl transcript could be identified for this protein. The corresponding Ensembl ID IPI00588708 as reported in [2] could not be found in the Ensembl database.

Additional Table 3

Antiproteases name (<i>Gallus gallus</i>)	Ensembl Transcript ID	Oligoarray ID	Oligoarray Ratio Liver L/PL	Yolk	Vitelline membrane
39 kDa protein	ENSGALT00000014597	RIGG05083	0.736	+	
52 kDa protein	ENSGALT00000017871	RIGG16020	0.745	+	
Cystatin	ENSGALT00000014109	Missing		+	+
Follistatin	ENSGALT00000024043	RIGG18223	0.979		+
Heparin cofactor II	ENSGALT00000002123	Missing		+	
Metalloproteinase inhibitor 3	ENSGALT00000020523	RIGG02367	0.389		+
Ovalbumin related protein Y	ENSGALT00000037191	RIGG09162	-(a)	+	+
Ovalbumin X	ENSGALT00000020997	Missing		+	+
Ovoinhibitor	ENSGALT00000005545	RIGG11698	0.442	+	+
Ovostatin	ENSGALT00000037194	Missing		+	+
Similar to alpha-1 antitrypsin	ENSGALT00000037577	RIGG01149	-(a)	+	
Similar to alpha-2 plasmin inhibitor	ENSGALT00000004728	RIGG11419	0.900	+	
Similar to alpha2-macroglobulin	ENSGALT00000023051	RIGG17868	0.761	+	+
Similar to angiotensinogen	ENSGALT00000018111	RIGG16106	1.092	+	
Similar to antithrombin	ENSGALT00000007304	Missing		+	
Similar to fetuin	ENSGALT00000014007	RIGG14593	0.480	+	
Similar to MGC68875	ENSGALT00000000384	RIGG01854	0.220	+	
Similar to mouse counterpart for human pigment epithelium derived factor	ENSGALT00000004762	RIGG11435	0.802	+	
Similar to ovomucoid	ENSGALT00000005554	RIGG11701	-(a)	+	+
Similar to ovulatory protein 2	ENSGALT00000011044	Missing			+
Similar to plasma protease C1 inhibitor	ENSGALT00000011936	Missing		+	
Similar to prekininogen	ENSGALT00000014125	RIGG08639	1.160	+	
Similar to putative porin	ENSGALT00000011045	RIGG05232	20.869	+	

^(a)There is no statistical evidence of expression of these genes in our experimental design
L, liver of laying hens; PL, liver of prelaying hens

Article 2 :

Les Protéases Acides du Jaune d'œuf de Poule : Expression en Fonction du Sexe et Spécificité Tissulaire de la « Similar to Nothepsin » et de la Cathepsine D, en Relation avec la Formation du Jaune d'œuf.

Contexte et objectifs du travail

La cathepsine D est une protéase clef de la maturation des précurseurs du jaune au niveau du follicule ovarien. Cette protéase acide a été initialement identifiée chez les mammifères dans les fractions lysosomales et joue un rôle déterminant dans la dégradation des protéines exogènes et l'activation des protéines de l'hôte pour limiter l'effet délétère des pathogènes. La « similar to nothepsin » est également une protéase acide qui, d'une part a été identifiée pour la première fois, lors des récentes approches protéomiques réalisées par Karlheinz Mann (Mann *et al.*, 2008) et Alessandra Farinazzo (Farinazzo *et al.*, 2009), et d'autre part ressort de notre approche transcriptomique comme étant une des 10 protéines les plus surexprimées par le foie des poules sexuellement matures (Article 1). C'est la protéase la plus surexprimée, avec un différentiel d'expression très élevé (> 35). Les données bibliographiques sur la « similar to nothepsin » sont quasi inexistantes, cependant il est reconnu qu'elle possède une forte similarité de séquence avec la cathepsine D. Contrairement à la « similar to nothepsin », les fonctions biologiques de la cathepsine D ont été extrêmement étudiées dans de nombreux organismes, y compris le poulet.

Notre objectif était dans un premier temps d'analyser l'expression de la « similar to nothepsin », comparée à celle de la cathepsine D, afin de déterminer dans quelle mesure cette

nouvelle protéine pouvait être spécifiquement exprimée en relation avec la formation du jaune et jouer un rôle dans ce compartiment, au même titre que la cathepsine D.

Résumé du travail

Introduction

Les protéines du jaune d'œuf sont essentiellement synthétisées par le foie sous forme de précurseurs. La synthèse hépatique de ces protéines est fortement stimulée au moment de l'acquisition de la maturité sexuelle et est sous la dépendance des œstrogènes. Ces précurseurs du jaune d'œuf (VLDL, vitellogénines) sont incorporés dans l'oocyte en croissance au niveau de l'ovaire où ils sont hydrolysés pour libérer les lipoprotéines et lipides constitutifs du jaune d'œuf assimilables par l'embryon. La cathepsine D, une protéase acide, est connue pour jouer un rôle essentiel dans la maturation de ces précurseurs dans l'oocyte en croissance.

Chez les mammifères, les protéases acides sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que l'hématopoïèse, la défense immunitaire et les réponses inflammatoires. Ce sont surtout des enzymes lysosomales, actives à pH acide. La cathepsine D est une protéase ubiquiste, synthétisée sous une forme pro-peptide inactive. Son activation dans le jaune est réalisée par autolyse à pH acide. La cathepsine D a été identifiée dans les oocytes en croissance mais n'est pas retrouvée dans le jaune mature (après oviposition). En revanche, la « similar to nothepsin » a été identifiée lors des 2 récentes approches protéomiques dans le jaune des œufs pondus.

Chez les poissons antarctiques, son homologue, la nothepsine, n'est exprimé que dans le foie des femelles et son expression est sous la dépendance des oestrogènes. Ces informations suggèrent que cette protéine pourrait jouer un rôle déterminant dans l'œuf des poissons. En revanche, chez le lézard, elle est exprimée dans le foie des mâles et des femelles. La recherche d'homologues dans d'autres espèces a mis en évidence la présence d'un pseudogène « nothepsine » chez *Gallus gallus*. Les analyses phylogénétiques menées dans ce même travail ont abouti à la conclusion que le gène de la nothepsine était très probablement inactif ou avait disparu chez le poulet. L'identification d'une protéine homologue « similar to nothepsin » dans le protéome du jaune en 2008 a permis de « ressusciter » cette protéine. Par ailleurs, les résultats obtenus dans l'article précédent où l'on montre que le gène de cette

protéine est surexprimé par le foie de poules matures, ont confirmé l'importance de cette protéine chez la poule pondeuse.

Dans cette étude, nous avons donc exploré la spécificité d'expression de la « similar to nothepsin » en comparaison avec celle de la cathepsine D, sachant que ces deux protéines sont très similaires au regard de la prédiction de leur activité et à leur séquence protéique. Nous avons également analysé leur expression dans le foie de poulettes au cours de l'acquisition de la maturité sexuelle et leur expression dans le foie de poules, comparée aux coqs, afin de déterminer si leur profil d'expression était identique à celui des poissons ou au contraire, à celui du lézard.

Résultats et discussion

La « similar to nothepsin » et la cathepsine D sont très similaires puisqu'elles partagent 46% d'identité de séquence protéique. Elles possèdent toutes les deux un peptide signal et 2 sites spécifiques des protéases à aspartate. La cathepsine D est impliquée dans l'hydrolyse des précurseurs du jaune d'œuf. Nous n'avons par contre aucune indication sur le rôle biologique de la « similar to nothepsin ».

Nous avons montré que l'expression de la cathepsine D était ubiquitaire dans les différents tissus testés (foie, infundibulum, magnum, isthme blanc, utérus, rein et duodenum), ce qui est cohérent avec la présence de la cathepsine D, décrite comme une enzyme lysosomale, dans des cellules et des tissus très variés. Son expression ne varie pas au cours de l'acquisition de la maturité sexuelle chez la poule mais est, au contraire, plus forte dans le foie des coqs que celui des poules. L'expression de la cathepsine D n'apparaît donc pas régulée par les œstrogènes.

A l'inverse, l'expression de la « similar to nothepsin » est spécifique du foie. Aucune expression de la « similar to nothepsin » n'est observée dans les foies de coqs. Par contre, son expression augmente graduellement dans les foies de poulettes au cours de l'acquisition de la maturité sexuelle qui coïncide avec l'augmentation de la concentration plasmatique des œstrogènes. Ce niveau d'expression reste extrêmement élevé dans les foies de poules

sexuellement matures. L'expression de la « similar to nothepsin » apparaît donc dépendante des stéroïdes sexuels.

Conclusions

Nos résultats montrent que la « similar to nothepsin » présente le même profil et la même spécificité expressionnelle que la nothepsine du poisson antarctique. Ces résultats, combinés au fait que cette protéine a été effectivement identifiée dans le jaune d'œuf, suggèrent que la « similar to nothepsin » joue un rôle important dans ce compartiment. De plus amples études de caractérisation fonctionnelle de cette protéine seront nécessaires pour déterminer si la « similar to nothepsin » assiste la cathepsine D dans la maturation des protéines du jaune et dans quelle mesure elle est impliquée dans la défense innée de l'œuf au cours de la croissance folliculaire et/ou au cours du développement embryonnaire.

Article soumis au journal Poultry Sciences, le 03 octobre 2011

Facteur d'impact : 1.582

Classé « Excellent » dans la catégorie « Agriculture, Dairy & Animal Science »



**Sex and tissue-specific expression of "similar to nothepsin"
and cathepsin D in relation to egg yolk formation in Gallus
Gallus**

Journal:	<i>Poultry Science</i>
Manuscript ID:	PS-11-01910
Manuscript Type:	Full-Length Article
Key Words:	Liver, Chicken, Aspartic proteinase, Egg yolk

SCHOLARONE™
Manuscripts

PHYSIOLOGY, ENDOCRINOLOGY AND REPRODUCTION

ASPARTIC PROTEASES OF HEN EGG YOLK

**Sex and tissue-specific expression of “similar to nothepsin” and cathepsin D in relation
to egg yolk formation in *Gallus Gallus***

M. Bourin, J. Gautron, M. Berges, Y. Nys, S. Rehault-Godbert¹

Institut National de la Recherche Agronomique, UR83 Recherches Avicoles, F-37380
Nouzilly, France

¹Corresponding author: srehault@tours.inra.fr

Institut National de la Recherche Agronomique

UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France

Tel: +33 2 47 42 78 39

Fax: +33 2 47 42 77 78

ABSTRACT

Egg yolk constitutes the main storage compartment of the avian egg and the first nutritional source that supports growth of the embryo. Most egg yolk components are synthesised by the liver of laying hens at sexual maturity and are secreted into the blood to be further transferred into the ovarian oocyte, by receptor-mediated endocytosis. The hydrolysis of egg yolk proteins is a prerequisite for absorption by the embryo while many others are secreted as precursors and must undergo proteolytic processing to be bioactive. It is assumed that chicken cathepsin D, an aspartic protease is a key enzyme in these processes. Very recently, a novel aspartic protease namely “similar to nothepsin” has been identified in the egg yolk. This protein shares a high protein sequence similarity with cathepsin D, but its function remains to be explored. Previous experiments conducted in Antarctic fish have shown that the expression of nothepsin is tissue and sex-specific. To gain insight into the specificities of expression of both cathepsin D and “similar to nothepsin” in *Gallus gallus*, we compared their distribution in various tissues, in male and females. Cathepsin D was ubiquitously expressed in all tissues examined including liver of both male and female adults and its expression was stable during sexual maturation. In contrast, “similar to nothepsin” expression is unique to the liver of adult females and its expression was sex steroid-dependant as it increased gradually in the liver of hens during sexual maturation. The sexual dimorphic expression of the “similar to nothepsin” gene suggests that the activity of this protein is regulated by the steroid environment of laying hens and is specifically adapted for inclusion in the yolk. Further studies are needed to assess whether “similar to nothepsin” assists cathepsin D in the proteolytic processing of egg yolk proteins during follicular growth or if it has a role during the chick embryonic development.

Key words: liver, chicken, aspartic proteinases, egg yolk

INTRODUCTION

The extra-uterine development of a chicken embryo requires that the egg must supply all the nutrients, protective systems and bioactive molecules which are required to ensure the development of the embryo until it hatches. The yolk constitutes the main reservoir of lipids, proteins, minerals and vitamins whereas the egg white and the eggshell are essentially major protective barriers that prevent microbial penetration. Most yolk proteins including vitellogenins and triglyceride-rich lipoproteins (very low density lipoproteins) are synthesized in the liver in response to the estrogen stimulation which occurs at sexual maturity in hens and are then secreted into the blood to be transported to the ovary (Griffin et al., 1984; Nys and Guyot, 2011). These precursors are imported into the growing oocytes (yolky follicles) by receptor-mediated endocytosis which results in quasi-lysosomal compartments that are termed “light yolk platelets” (Nimpf and Schneider, 1998). Egg yolk precursors need to be further processed to provide the embryo with essential nutrients and bioactive proteins (Carnevali et al., 2006). In fact, most egg yolk proteins and lipids are derived from the intra-oocyte cleavage of these precursors and there is increasing evidence that cathepsin D, an aspartic protease, plays a major role in this process (Carnevali et al., 1999; Carnevali et al., 2006; Elkin et al., 1995; Gerhartz et al., 1999; Retzek et al., 1992). This proteins maturation by partial hydrolysis is achieved in the endocytic compartments of the oocyte at mildly acidic conditions (Retzek et al., 1992).

Aspartic proteases are ubiquitous in animal and plant kingdoms. They possess multiple physiological roles as they participate in hematopoiesis, protective immunity and inflammatory responses (Benes et al., 2008). These endopeptidases are related to lysosomal digestive enzymes and are commonly active in the acidic pH range (Benes et al., 2008) and include some cathepsins, renins, pepsins and chymosins. In chickens, besides its involvement

in egg yolk hydrolysis, cathepsin D activity has been associated with muscular dystrophy (Iodice, 1976) and coccidiosis (Rostislav et al., 2001). Cathepsin D is first synthesized as an inactive pre-pro-peptide (398 amino-acid residues) that is proteolytically processed into mature cathepsin D. In mammals, its conversion to active cathepsin D is triggered firstly by autolysis at acidic pH to remove the propeptide, then this active intermediate of 48 kDa form is further processed by cathepsin B or L, two cysteine proteinases to produce a two-chain active molecule (Zaidi et al., 2008). Like its mammalian counterpart, chicken cathepsin D is likely to be secreted as an inactive form, which is further processed into an active intermediate by autocatalytic cleavage of its propeptide (Retzek et al., 1992). The proteases which are responsible for the processing of chicken cathepsin D into the ultimate two-chain form are not known. In Seabream, the highest activities of cathepsin D were found in early vitellogenesis, when a particularly intense deposit of yolk proteins occurs within the follicle (Carnevali et al., 1999). Similarly, in lizard, a large amount of the proenzyme is accumulated in egg yolk at an early stage of oocyte development and appear to be activated at a specific stage of follicular growth to achieve the proteolytic processing of vitellogenins (De Stasio et al., 1999). Although the presence of cathepsin D in growing follicles and in liver of laying hens has been clearly stated (Retzek et al., 1992), cathepsin D is not recovered in the hen egg yolk according the two recent proteomic surveys (Farinazzo et al., 2009; Mann and Mann, 2008). These results suggest that cathepsin D is potentially degraded following activation at the follicular site (Lah and Turk, 1982). Interestingly, both proteomic studies revealed the presence of another aspartic protease in egg yolk. This protease is related to nothepsin ("similar to nothepsin"). Nothepsin was first identified in the female liver of zebrafish *Danio rerio* (Riggio et al., 2000). In Antarctic fish, nothepsin has been found to be exclusively expressed by the liver of females (Riggio et al., 2000) whereas it is constitutively expressed by both males and female lizards (Borrelli et al., 2006). The screening of various databases to

identify nothepsin-like sequences in other species revealed the presence of a pseudogene related to nothepsin in *Gallus gallus* (named “similar to nothepsin”) whereas no similar form was apparently present in other tetrapods, including mammals (human, monkey, mouse, pig, guinea pig), *Xenopus*, bullfrog and salmon trout (Borrelli et al., 2006). In this context, we investigated whether the expression pattern of the “similar to nothepsin” gene is tissue and sex-specific as observed in fish. We compared the expression pattern of “similar to nothepsin” with that of cathepsin D since both proteins are highly similar in terms of predicted activity and protein sequence and seem to both have a role in the egg as constituents of the yolk.

MATERIALS AND METHODS

Chickens Handling and Housing

Pullets, hens and cocks were bred at the experimental unit Pôle d’Expérimentation Avicole de Tours according to the European legislation on ‘the protection of animals used for experimental and other scientific purposes’ set by the European Community Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and under the supervision of two authorized scientists S. Réhault-Godbert and J. Gautron (Authorizations # 7323 and 37-144, respectively). Animals were housed and fed according to conventional recommendations defined by the Institut National de la Recherche Agronomique, France (**INRA**). Thirty-two growing pullets at 13, 14, 15, 16 weeks of age, eight 41-week old laying hens and eight 40-week old males (ISA Brown, Hendrix Genetics, St-Brieuc, France) were euthanized to collect tissues that were quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80 C until further use.

RNA Extraction and cDNAs Preparation

Tissues were harvested from the oviduct (infundibulum, white isthmus, magnum and uterus) and other organs (liver, kidney and duodenum) from eight 41-week old laying hens. Additionally, livers from 40-week old cocks and from 13, 14, 15, 16, 41-week old prelaying/laying hens were sampled. Total RNA was extracted from frozen tissues using a commercial kit, Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) for infundibulum, magnum, white isthmus, kidney and duodenum and the RNA NOW method (Biogentex, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) for livers samples. All samples were treated with DNase I (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). RNA concentrations were obtained by measuring absorbance at 260 nm, and the quality of RNA was assessed using the Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Massy, France). Five µg of total RNA were reverse-transcribed using the superscript II kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and random hexamers (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

Real Time- Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

The following primers were designed: 5'CTCTTATCACCGGTCCCTCA3' (forward) and 5'AGCCACTCATGCAGAAGGTT3' (backward) for "Similar to Nothepsin" (ENSGALT00000016271) and 5'CCCCACAGAAGTTCACTGT3' (forward) and 5'CCCGAAGATCTGGTTCTTGA3' (backward) for cathepsin D (ENSGALT00000010676), and then were diluted at 0.4 µM in UptiTherm buffer 1X (Interchim, Montluçon, France). cDNAs from RT products was amplified in real time using Sybr Green I Master kit (Roche, Mannheim, Germany) with the LightCycler 480 apparatus (Roche Diagnostics, Meylan, France). A melting curve program was carried out from 65 to 95°C in 1 min for each individual sample. Each run included triplicates of control cDNA corresponding to a pool of cDNA from all tissues. The control cDNA was diluted from 1:6.25 to 1:25,600 and relative

arbitrary quantities were defined. The threshold cycle (**CT**), defined as the cycle at which fluorescence rises above a defined baseline, was determined for each sample and control cDNA. A calibration curve was calculated using the CT values of the control cDNA samples and relative amount of unknown samples were deduced from this curve. To account for variations in mRNA extraction and reverse transcription reaction between samples, “similar to nothepsin” and cathepsin D mRNA levels were corrected relative to ribosomal 18 S rRNA levels for expression in the different tissues of the hens, and relative to Tata Binding Protein (**TBP**) for expression of the livers of male and female, and the livers of pullets during the sexual maturation. Levels of 18 S rRNA in each sample were measured using existing TaqMan assay reagents (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and levels of Tata box binding mRNA were determined using Sybr Green reaction and the following primers 5’GCGTTTTGCTGCTGTTATTATGAG3’ (forward) and 5’TCCTTGCTGCCAGTCTGGAC3’ (backward).

Statistical Analysis

The ratio value was calculated for each sample as “similar to nothepsin” or cathepsin D/ 18S RNA or TBP rRNA. The log of the ratio was used for statistical analysis using StatView software (SAS Institute Inc. version 5). A one way analysis of variance was performed to detect statistically significant differences between “similar to nothepsin” and “cathepsin D” expression in various tissues or physiological stages (means \pm SEM).

RESULTS

Tissue Distribution of “Similar to Nothepsin” and Cathepsin D in Laying Hens

Expressions of “similar to nothepsin” and cathepsin D genes were analyzed by real-time qPCR in different tissues involved in the egg formation (liver for the yolk; infundibulum for vitelline membranes; magnum for the egg white; white isthmus for shell membranes, uterus for the eggshell), and in the kidney and the duodenum. Levels of “similar to nothepsin” and cathepsin D expression were normalized by 18 S rRNA to control for possible variation in RNA extraction yield and reverse transcription efficiencies between samples.

Results reveal that cathepsin D expression is ubiquitous in all tissues tested (Fig. 1A). We observed a high heterogeneity between liver samples and when considering the log ratio of the expression, no statistical differences could be found between tissues. However, significantly lower expression was observed in the magnum compared with the other oviducal tissues when the liver was removed from the analysis ($P < 0.001$).

In contrast, the relative normalized “similar to nothepsin” mean expression was considerably higher in the liver compared with all the other tissues analyzed (Fig. 1B; $P < 0.001$). Its expression in other tissues was found to negligible compared to the liver.

Expression of “Similar to Nothepsin” and Cathepsin D in the Liver of Cocks and Hens

The expression of “similar to nothepsin” and cathepsin D was analyzed in the liver of sexually mature cocks and hens. The relative normalized cathepsin D expression is significantly higher in the liver of males than in the liver of females ($P < 0.01$) (Fig. 2A). On the other hand, the “similar to nothepsin” gene (Fig. 2B) is found to be exclusively expressed by the liver of laying hens ($P < 0.001$).

Expression of “Similar to Nothepsin” and Cathepsin D in the Liver of Hens during Sexual Maturation

To assess whether the expressions of “similar to nothepsin” and cathepsin D were regulated by sex steroids, we analyzed the kinetic of expression of both genes in the liver of prelaying pullets during sexual maturation (13-16 weeks) and in the liver of mature hens (41-week old).

As shown in Fig. 3A, the relative normalized expression of cathepsin D in liver doesn't show any significant statistical differences from 13 weeks to 41 weeks of age.

In contrast, the relative normalized “similar to nothepsin” expression increased strongly from 13 weeks of age to reach its maximum expression from 16 weeks of age onwards ($P < 0.001$) (Fig. 3B).

DISCUSSION

Until recently, chicken cathepsin D was thought to be the major aspartic protease of egg yolk (Elkin et al., 1995; Gerhartz et al., 1999; Retzek et al., 1992). However, “similar to nothepsin”, a novel predicted aspartic protease, has been recently identified in egg yolk by proteomic analyses (Farinazzo et al., 2009; Mann and Mann, 2008). Protein sequences of these two aspartic proteases are very similar (Fig. 4). “Similar to nothepsin” and chicken cathepsin D share 46% of identities and 63% similarity and possess a signal peptide with a predicted cleavage site between position 16-17 and 20-21, respectively (Fig. 4). Both proteases possess 2 eukaryotic and viral aspartyl proteases active signatures (Fig. 4, PS00141

ASP_PROTEASE Eukaryotic and viral aspartyl proteases active site). The first is predicted at positions 96-107 for “similar to nothepsin” and is at position 93-104 for chicken cathepsin D, and includes the first active site of the protease. The second is predicted at positions 281-292 for “similar to nothepsin” and at position 280-291 for chicken cathepsin D

and includes the second active site. Both proteins belong to the peptidase A1 family. While the involvement of cathepsin D in the hydrolysis of yolk precursors (very low density lipoproteins and vitellogenins) during oocyte's growth is well established (Carnevali et al., 2006; Retzek et al., 1992), there is no information related to the functional specificities of "similar to nothepsin" as the protein has not been yet studied.

We have shown that chicken cathepsin D is expressed in all the tissues tested (Fig. 1A). In mammals, cathepsin D was initially described as a lysosomal enzyme that is therefore present in several kinds of cells. It is involved in numerous biological processes (Tsukuba et al., 2000; Benes et al., 2008) and more importantly in chickens, cathepsin D is involved in the intra oocytic processing of egg yolk precursors (De Stasio et al., 1999). Cathepsin D has been shown to be expressed by both the liver of laying hens and the ovarian follicle (Retzek et al., 1992). In this report, we show additionally that cathepsin D is expressed by the liver of sexually mature cocks and that its expression is higher when compared to that of laying hen's livers (Fig. 2A). These results suggest that its synthesis might be stimulated by testosterone. In contrast, the fact that the expression of chicken cathepsin D is stable during the sexual maturation of pullets (Fig. 3A) indicates that the hepatic expression of cathepsin D is not regulated by estrogens. We thus hypothesize that the expression of cathepsin D by the ovarian follicle is probably more relevant in the process of egg yolk formation than that of the liver. In fact, although cathepsins D from both sources have similar activity on egg yolk precursors (Retzek et al., 1992), it is possible that the cathepsin D from the hepatic source is not transferred to the follicle oocyte but rather has other physiological functions. Altogether, these data corroborate the likelihood cathepsin D as various functions in the physiology of both female and male chickens.

In contrast, the expression of "similar to nothepsin" is very specific to the liver of laying hens (Fig. 1B, Fig. 2B). The expression of "similar to nothepsin" increases gradually during sexual

maturation of pullets (Fig. 3B) and increases rapidly coincident with the increase of oestradiol plasma concentration during the two weeks preceding the onset of egg laying. The expression of “similar to nothepsin” in *Gallus gallus* is therefore estrogen-dependant. These results confirm previous studies, where the authors showed that the expression of “similar to nothepsin” in liver of zebrafish males could be stimulated after estrogen treatment (Riggio et al., 2002).

Our data clearly indicate that the nothepsin gene has not been lost or inactivated in chicken during evolution, as it has been suggested from phylogenetic studies (Borrelli et al., 2006). In fact, our results reveal that when considering this specific gene, *Gallus gallus* is closer to fish than to lizard in terms of egg physiology, although *Gallus gallus* and lizard are more phylogenetically related than *Gallus gallus* and fish (Borrelli et al., 2006). It might therefore be interesting to investigate the presence of estrogen responsive-elements (ERE) located in the upstream region of the gene. Phylogenetic analysis of these ERE linked to “similar to nothepsin” gene might explain the origin of the different sensibility to estrogen between species.

Further studies will be also needed to explore the role of “similar to nothepsin” in egg yolk. The protein sequence analysis of “similar to nothepsin” indicates that this protein is expressed as a precursor (Fig.4) that needs further activation, similarly to its cathepsin D homologous. In mammals, lysosomal cathepsin D is processed by two cysteine proteinases, cathepsin B and L (Zaidi et al., 2008). The absence of cathepsins B and L in egg yolk suggest another mechanism of activation for yolk cathepsin D and “similar to nothepsin” than that observed for lysosomal cathepsin D (Benes et al., 2008; Tsukuba et al., 2000). Further studies on purified proteins will be needed to answer this question. Both cathepsin D and “similar to nothepsin” could act in a synergistic manner to process egg yolk proteins in endocytic vesicles since they are both presumably active at acidic pH. As an aspartic protease, “similar

to nothepsin” should be inhibited by pepstatin. This property of aspartic proteases has been used to purify cathepsin D from the liver and follicles using pepstatin-affinity chromatography (Barrett, 1970; Retzek et al., 1992). Surprisingly, it seems that only cathepsin D, but not “similar to nothepsin”, could be recovered in the fraction retained by the affinity-chromatography (Retzek et al., 1992). Comparable results were obtained when we used this pepstatin-affinity chromatography on egg yolks collected from freshly laid eggs (data not shown). In fact, in our preliminary study (one single experiment), we found only trace of cathepsin D bound to pepstatin-sepharose and we could not identify “similar to nothepsin” in this fraction. We hypothesize that chicken cathepsin D plays a role in the early stages of the yolk formation i.e. in the small growing follicles, which accumulate egg yolk precursors and that thereafter cathepsin D is further degraded into smaller inactive fragments (Lah and Turk, 1982) in more mature follicles. This hypothesis could explain why Mann et al. and Farrinazzo et al., could not identify cathepsin D in egg yolk proteomes (Farinazzo et al., 2009; Mann and Mann, 2008) and why only a minor quantity of cathepsin D from egg yolk could bind to pepstatin-chromatography.

The fact that “similar to nothepsin” from liver, follicles (Retzek et al., 1992) and egg yolk (data not shown) does not bind to pepstatin-sepharose suggest that pepstatin is not an inhibitor of “similar to nothepsin”, or more interestingly, that “similar to nothepsin” is still present as a inactive precursor form in these various tissue and egg yolk samples. Indeed, most protease precursors (zymogens) cannot interact with their cognate inhibitor or substrate since their active site is inaccessible, due to the presence of an aminoterminal-propeptide (Masa et al., 2006). We are currently exploring the feasibility of purifying “similar to nothepsin” from egg yolk using other strategies than pepstatin-sepharose to investigate whether it is present as an activated form or as a zymogen in the egg yolk. The presence of the precursor of “similar to nothepsin” in laid eggs could imply that this protein is activated later during incubation, to

play a role at a specific stage of embryonic development, whereas cathepsin D would rather be associated with follicular growth and processing of egg yolk precursors within the oocyte.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the French National Research Agency (OVO-mining, ANR-09-BLAN-0136), Region Centre and INRA, Physiologie Animale et Système d'élevage division for the financial support of M. Bourin's PhD.

We also acknowledge the experimental unit PEAT (INRA, UE1295 Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours, F-37380 Nouzilly, France), and more particularly Frédéric Mercierand for breeding and providing birds and Harold Rigoreau for his assistance in collecting tissues.

We thank Julie Dalifard, (UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France) for the excellent quality of her technical support.

We are grateful to Ian Dunn (Division of Genetics and Genomics, The Roslin Institute and Royal Dick School of Veterinary Studies, University of Edinburgh, Roslin, Midlothian, UK) for his corrections and the critical review of this article.

REFERENCES

- Barrett, A. J. 1970. Cathepsin D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver. *Biochem. J.* 117:601-607.
- Benes, P., V. Vetvicka, and M. Fusek. 2008. Cathepsin D--many functions of one aspartic protease. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 68:12-28.

- Borrelli, L., R. De Stasio, S. Filosa, E. Parisi, M. Riggio, R. Scudiero, and F. Trinchella. 2006. Evolutionary fate of duplicate genes encoding aspartic proteinases. Nothepsin case study. *Gene*. 368:101-109.
- Carnevali, O., R. Carletta, A. Cambi, A. Vita, and N. Bromage. 1999. Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*: Involvement of two lysosomal proteinases. *Biol. Reprod.* 60:140-146.
- Carnevali, O., C. Cionna, L. Tosti, E. Lubzens, and F. Maradonna. 2006. Role of cathepsins in ovarian follicle growth and maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 146:195-203.
- De Stasio, R., L. Borrelli, P. Kille, E. Parisi, and S. Filosa. 1999. Isolation, characterization and molecular cloning of cathepsin D from lizard ovary: Changes in enzyme activity and mRNA expression throughout ovarian cycle. *Mol. Reprod. Dev.* 52:126-134.
- Elkin, R. G., M. B. Freed, S. A. Danetz, and C. A. Bidwell. 1995. Proteolysis of Japanese quail and chicken plasma apolipoprotein B and vitellogenin by cathepsin D: similarity of the resulting protein fragments with egg yolk polypeptides. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 112:191-196.
- Farinazzo, A., U. Restuccia, A. Bachi, L. Guerrier, F. Fortis, E. Boschetti, E. Rasoli, A. Citterio, and P. G. Righetti. 2009. Chicken egg yolk cytoplasmic proteome, mined via combinatorial peptide ligand libraries. *J. Chromatogr. A.* 1216:1241-1252.
- Gerhartz, B., H. J. Kolb, and J. Wittmann. 1999. Proteolytic activity in the yolk sac membrane of quail eggs. *Comp. Biochem. Physiol. A-Mol. Integr. Physiol.* 123:1-8.
- Griffin, H. D., M. M. Perry, and A. B. Gilbert. 1984. Yolk formation. In *Physiology and Biochemistry of the domestic fowl*. Volume 5:345-380.
- Iodice, A. A. 1976. The inhibition by pepstatin of cathepsin D and autolysis of dystrophic muscle. *Life Sci.* 19:1351-1358.

- Lah, T., and V. Turk. 1982. Autolysis studies of cathepsin D. *Hoppe Seylers Z Physiol. Chem.* 363:247-254.
- Mann, K., and M. Mann. 2008. The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. *Proteomics.* 8:178-191.
- Masa, M., L. Maresova, J. Vondrasek, M. Horn, J. Jezek, and M. Mares. 2006. Cathepsin D propeptide: mechanism and regulation of its interaction with the catalytic core. *Biochemistry.* 45:15474-15482.
- Nimpf, J., and W. J. Schneider. 1998. The VLDL receptor: an LDL receptor relative with eight ligand binding repeats, LR8. *Atherosclerosis.* 141:191-202.
- Nys, Y., and N. Guyot. 2011. Egg formation and chemistry. Pages 83-132 in *Improving the safety and quality of egg and egg products.* Y. Nys, M. Bain, and F. Van Immerseel eds. Woodhead Publishing.
- 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.* 11:661-672.
- Riggio, M., R. Scudiero, S. Filosa, and E. Parisi. 2000. Sex- and tissue-specific expression of aspartic proteinases in *Danio rerio* (zebrafish). *Gene.* 260:67-75.
- Riggio, M., R. Scudiero, S. Filosa, and E. Parisi. 2002. Oestrogen-induced expression of a novel liver-specific aspartic proteinase in *Danio rerio* (zebrafish). *Gene.* 295:241-246.
- Rostislav, K., B. Petr, C. Frantisek, and K. Oldrich. 2001. The cathepsin-D expression in the cyto-invasive stages of coccidia in intestinal mucosa of chickens, and the relevance of this proteinase for intracellular penetration and spreading of coccidia in host tissues. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 145:21-22.
- Tsukuba, T., K. Okamoto, Y. Yasuda, W. Morikawa, H. Nakanishi, and K. Yamamoto. 2000. New functional aspects of cathepsin D and cathepsin E. *Molecules and Cells.* 10:601-611.

Zaidi, N., A. Maurer, S. Nieke, and H. Kalbacher. 2008. Cathepsin D: A cellular roadmap.
Biochemic. Biophys. Res. Comm. 376:5-9.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Tissue expression of cathepsin D and “similar to nothepsin in laying hens (mean \pm SEM). A. Tissue distribution of cathepsin D (**catD**). B. Tissue distribution of “similar to nothepsin” (**SimNot**). Duod., duodenum; Kid., kidney; Li., liver; Inf., infundibulum; WI, white isthmus; Mag., magnum; Ut., uterus. Real-time qPCR was conducted as described in Material and Methods. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.001$; $n = 8$; **)

Figure 2. Expression of cathepsin D and “similar to nothepsin” in the liver of cocks and females. A. Cathepsin D (**catD**). B. “Similar to nothepsin” (**SimNot**). Real-time qPCR was conducted as described in Material and Methods. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.01$; $n = 8$; ** or $P < 0.001$; $n = 8$; ***).

Figure 3. Expression of cathepsin D and “similar to nothepsin” in the liver of pullets during sexual maturation (mean \pm SEM). A. Cathepsin D (**catD**). B. “Similar to nothepsin” (**SimNot**). Real-time qPCR was conducted as described in Material and Methods. Means that do not share a common letter are significantly different ($P < 0.01$; $n = 8$).

Figure 4. Sequence alignment of “PREDICTED: similar to nothepsin *Gallus gallus*” (**SimNot** *Gallus*, XP_416090) and cathepsin D precursor *Gallus gallus* (**CatD** *Gallus*, NP_990508). Identical residues and homologous residues are shaded black and grey, respectively. This alignment was performed using CLUSTAL W (1.8) and BOXSHADE (3.21). Signal peptides were predicted using SignalP 3.0. The arrow illustrates the cleavage site of the cathepsin D propeptide. Asterisks indicate aspartate active sites (D) related to aspartic proteases. These active residues are included in two specific signatures of aspartate proteases as defined in PROSITE entry PS00141 (<http://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite>).

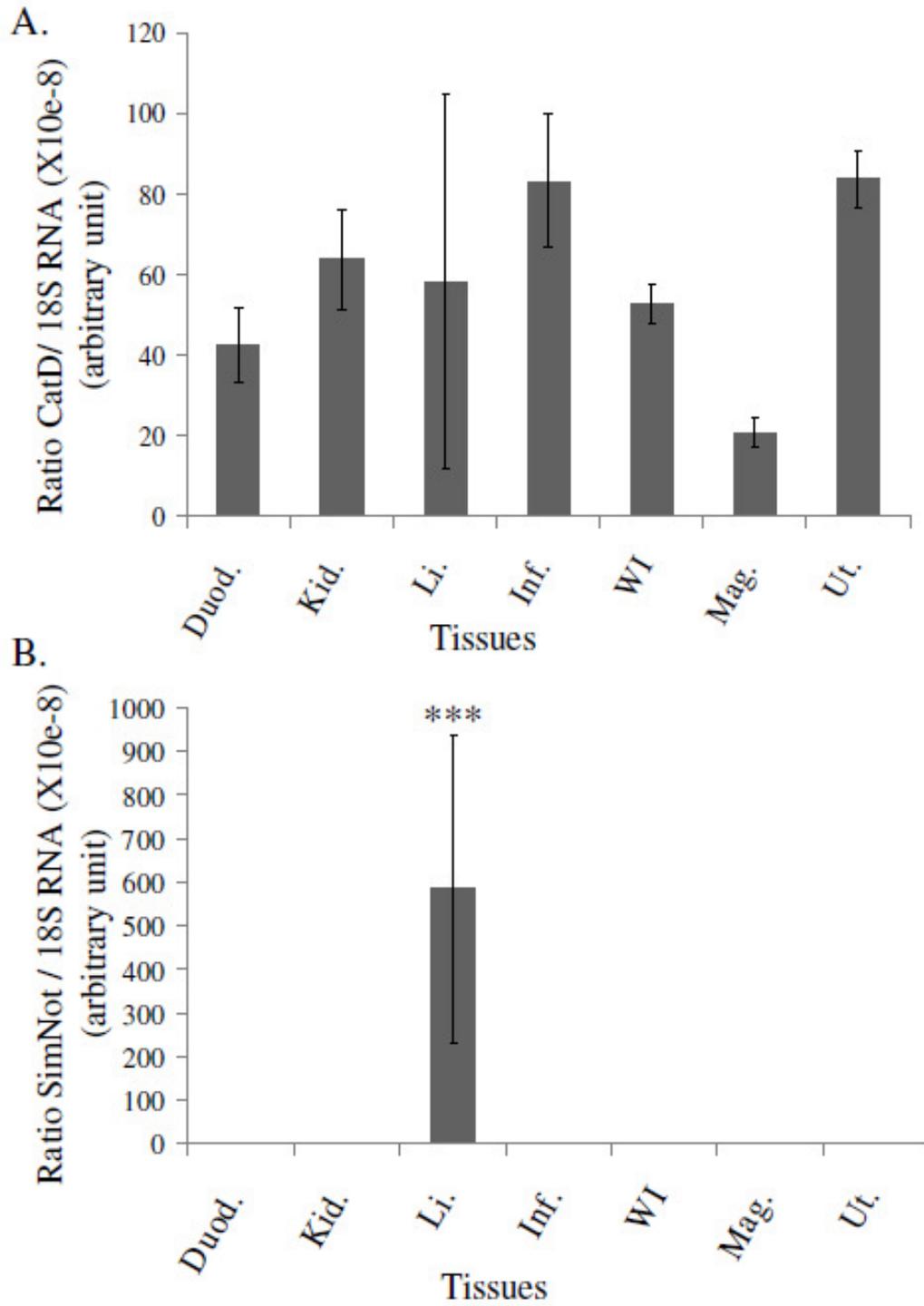
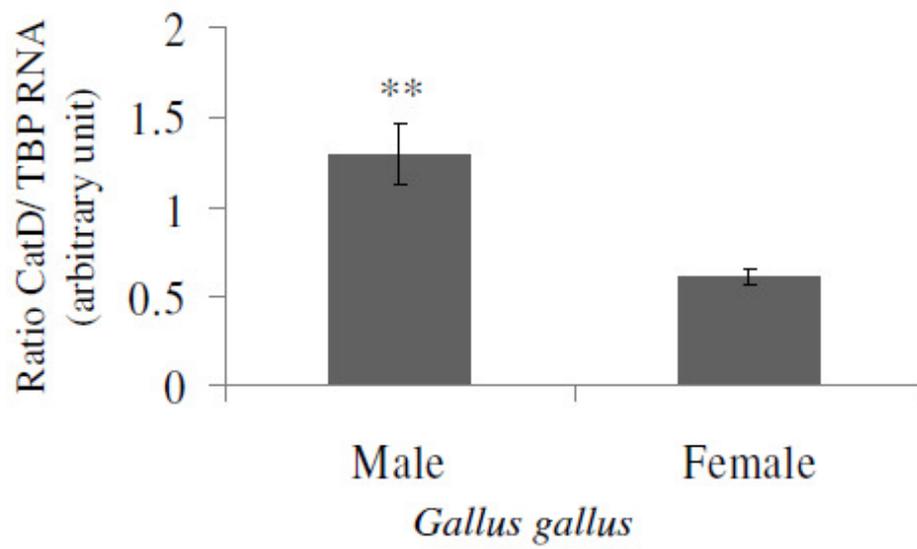


Fig. 1

A.



B.

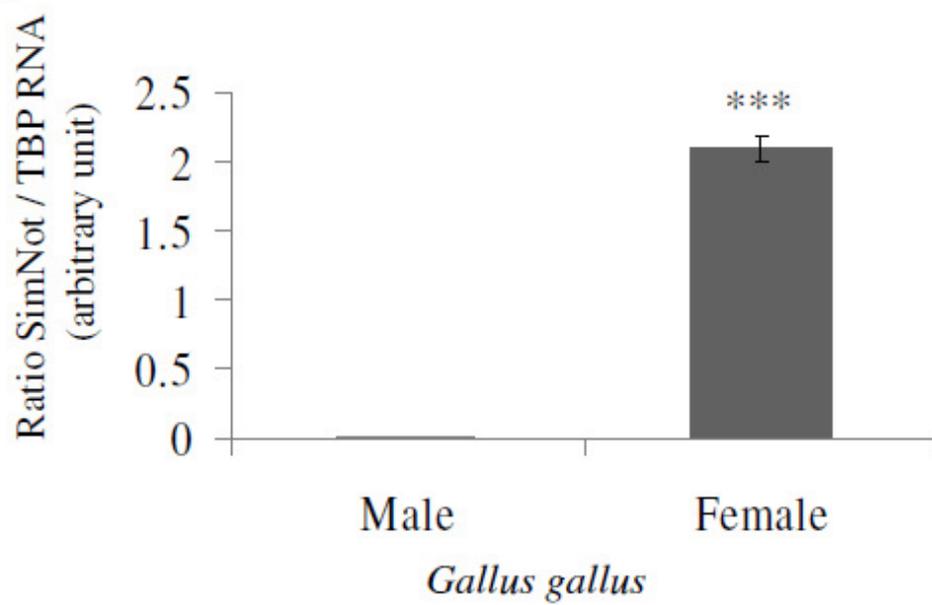


Fig. 2

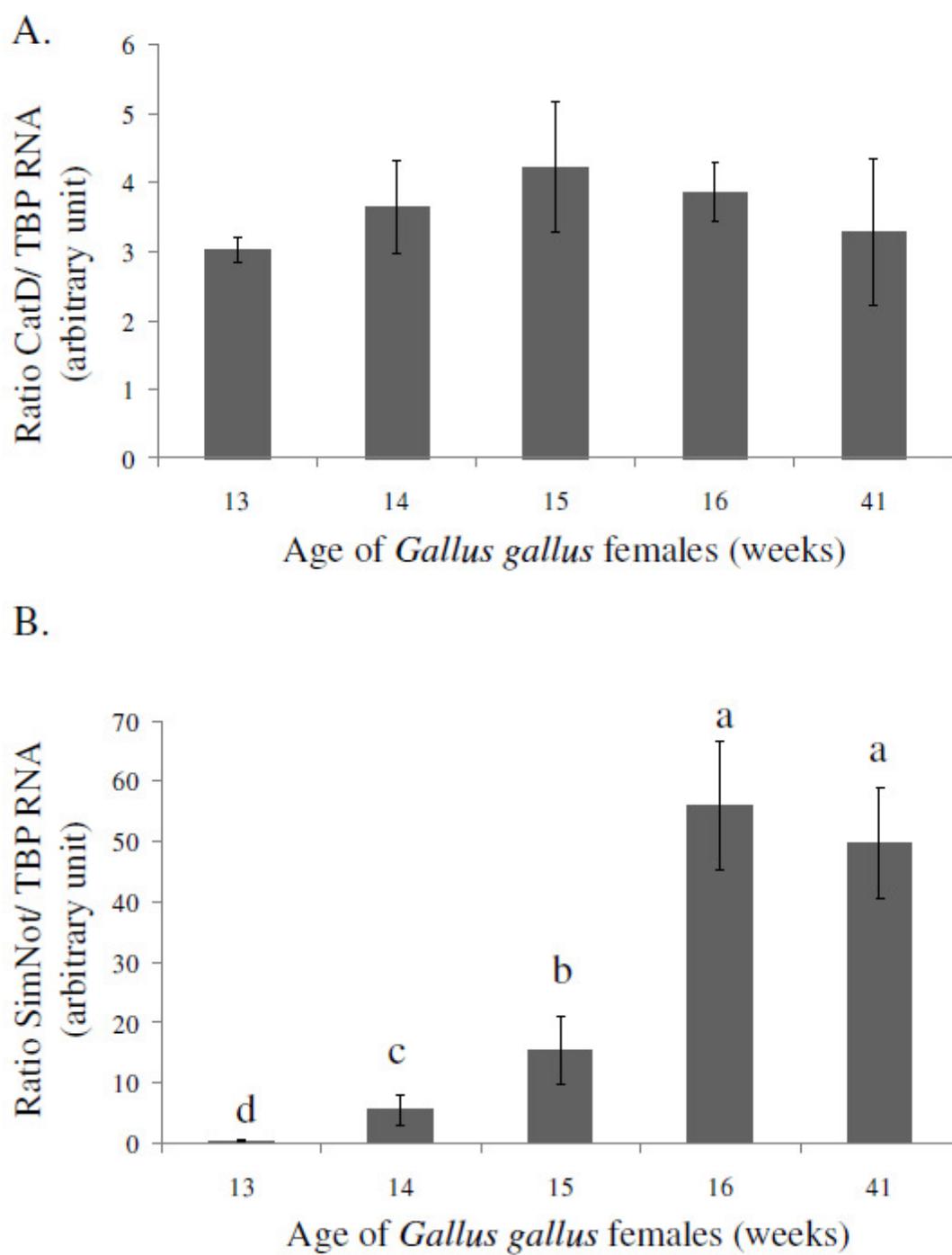


Fig. 3

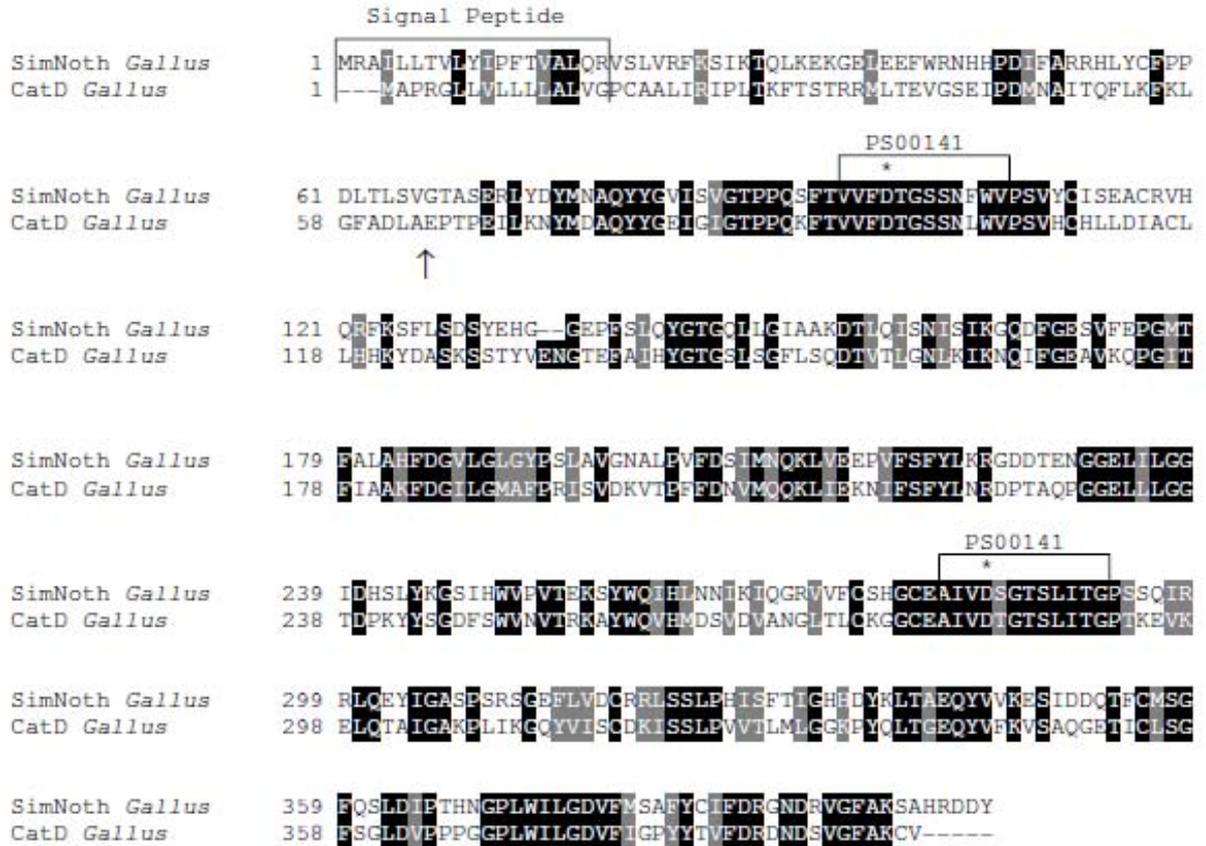


Fig. 4

Article 3 :

Potentiel Antimicrobien de l'Ovoinhibiteur du Jaune, un Inhibiteur Multidomaine de Type Kazal

Objectifs du travail

Le deuxième candidat auquel nous nous sommes intéressés est l'ovoinhibiteur. Cette antiprotéase est retrouvée dans tous les compartiments y compris le blanc, le jaune, les membranes vitellines et la coquille. L'ovoinhibiteur possède sept domaines inhibiteurs de type Kazal ce qui lui confère la capacité d'inhiber des protéases à sérine telles que la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase pancréatique.

La synthèse bibliographique montre que les inhibiteurs possédant un(des) domaine(s) de type Kazal sont très largement distribués dans les différents règnes vivants, et possèdent un large éventail de fonctions physiologiques. Ils sont supposés, entre autre, être impliqués dans la réponse immunitaire innée. La spécificité de leur activité antimicrobienne dépend de leur capacité à inhiber les protéases microbiennes. En effet, les protéases secrétées par les pathogènes contribuent essentiellement au pouvoir invasif de ces derniers, en leur permettant de pénétrer et de proliférer dans les tissus de l'hôte.

L'objectif de notre travail était de caractériser l'ovoinhibiteur de manière fonctionnelle. Cette caractérisation inclut l'étude de sa spécificité tissulaire et de son niveau d'expression dans les différents tissus. Nous nous sommes également intéressés à sa capacité à inhiber les protéases et à son potentiel antimicrobien, afin de mieux appréhender son rôle biologique dans le jaune d'œuf. Ce volet a nécessité la mise en place d'une stratégie de purification de cette molécule à partir du jaune d'œuf.

Résumé du travail

Introduction

Parmi les antiprotéases identifiées dans les différents compartiments de l'œuf, deux possèdent des domaines de type Kazal et sont ubiquitaires dans l'œuf : l'ovomucoïde et l'ovoinhibiteur. Nous nous sommes focalisés sur les fonctions biologiques de l'ovoinhibiteur, et plus particulièrement à son implication éventuelle dans la défense de l'œuf par l'étude de son pouvoir antimicrobien.

Dans un premier temps, nous avons étudié la spécificité tissulaire de l'ovoinhibiteur dans les différents segments de l'oviducte, le foie, le rein et le duodénum afin de vérifier son expression dans les organes responsables de la formation des différents compartiments de l'œuf. Comme l'expression du gène de l'ovoinhibiteur est sous la dépendance des œstrogènes, nous avons étudié le profil de son expression chez les poulettes au cours de l'acquisition de la maturité sexuelle, et chez les poules sexuellement matures, ceci afin de confirmer la relation entre la synthèse de cette protéine et le processus de formation de l'œuf.

Dans un second temps, nous avons mis au point une nouvelle stratégie de purification de l'ovoinhibiteur à partir du jaune d'œuf. Nous avons ensuite vérifié, d'une part, l'activité inhibitrice de l'ovoinhibiteur pur contre plusieurs protéases à sérine, et d'autre part, évalué son activité antimicrobienne contre différentes souches bactériennes connues pour sécréter des protéases telles que *Pseudomonas aeruginosas*, *Staphylococcus aureus* et plusieurs *Bacillus* sp.

Résultats et discussion

L'analyse de l'expression du gène de l'ovoinhibiteur a mis en évidence qu'il est exprimé dans les tissus impliqués dans la formation des différents compartiments de l'œuf. Il est très fortement exprimé dans le magnum (lieu de la formation du blanc), le foie (lieu de la formation du jaune) et dans une moindre mesure dans l'utérus (lieu de la formation de la coquille). L'expression du gène de l'ovoinhibiteur est négligeable dans les autres tissus testés (infundibulum, isthme blanc, rein et duodénum) comparée à celle observée dans le magnum et

le foie. Nos résultats ont montré que l'expression du gène de l'ovoinhibiteur était stimulée ponctuellement au cours de l'acquisition de la maturité sexuelle dans le foie des poulettes : son niveau d'expression augmente entre la 13^{ème} et 16^{ème} semaine d'âge, pour revenir à un niveau plus faible dans le foie des poules sexuellement matures.

L'ovoinhibiteur a été purifié à partir de la fraction plasmatique du jaune d'œuf. Cet ovoinhibiteur purifié possède une activité inhibitrice forte contre la trypsine et la subtilisine mais plus faible envers la chymotrypsine. Ces résultats ont validé notre technique de purification puisque l'ovoinhibiteur était pur et biologiquement actif.

La littérature suggère que les antiprotéases capables d'inhiber la subtilisine pourraient avoir une activité bactériostatique contre les *Bacillus* sp. ou d'autres souches sécrétant des protéases à sérine. De par la présence de ses 7 domaines inhibiteurs de type Kazal, l'ovoinhibiteur est un excellent candidat antimicrobien. Notre étude a révélé qu'en effet, l'ovoinhibiteur purifié était actif contre *Bacillus thuringiensis*. Il sera intéressant d'une part d'explorer l'activité de l'ovoinhibiteur contre d'autres souches bactériennes mais aussi de déterminer lesquels de ses 7 domaines inhibiteurs sont actifs (production de chacun des domaines en système hétérologue) et quelle protéase cible du pathogène est inhibée.

Conclusion

L'ovoinhibiteur est fortement exprimé dans le magnum et le foie et inhibe la croissance de *Bacillus* sp.. Cette antiprotéase jouerait donc un rôle significatif dans la défense antimicrobienne du blanc d'œuf et du jaune d'œuf. La stratégie de purification à partir du jaune d'œuf a été validée et la disponibilité de l'ovoinhibiteur à l'état pur permettra d'explorer ses activités vis-à-vis d'autres microorganismes que les bactéries, tels que les virus ou les parasites, dont la virulence est dépendante de protéases sécrétées par ces pathogènes.

Article publié dans Journal of Agricultural and Food Chemistry (JAFC)

Facteur d'impact : 2.816

Classé « Exceptionnel » dans la catégorie « agriculture, multidisciplinary »

Antimicrobial Potential of Egg Yolk Ovoinhibitor, a Multidomain Kazal-like Inhibitor of Chicken Egg

Marie Bourin,^{*,†} Joël Gautron,[†] Magali Berges,[†] Sylvie Attucci,[§] Gwenaëlle Le Blay,[#] Valérie Labas,[△] Yves Nys,[†] and Sophie Rehault-Godbert^{*,†}

[†]Institut National de la Recherche Agronomique, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France

[§]INSERM U618, Protéases et Vectorisation Pulmonaires, Faculté de Médecine, 37032 Tours Cedex, France

[#]Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (EA3882), IFR 148 ScInBioS, Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, ESMISAB Technopôle Brest-Iroise, Parvis Blaise Pascal, 29280 Plouzané, France

[△]Institut National de la Recherche Agronomique, UMR85 Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomarqueurs, laboratoire de spectrométrie de masse, F-37380 Nouzilly, France

ABSTRACT: Chicken egg ovoinhibitor is a multidomain Kazal-type serine protease inhibitor with unknown function. Comparison of expression between different tissues indicated that ovoinhibitor is highly expressed in the magnum and liver followed by the uterus, which secrete egg white, egg yolk, and eggshell precursors, respectively. The results also revealed that ovoinhibitor expression is increased in the liver during sexual maturation followed by a subsequent decrease in mature hens. Ovoinhibitor was purified from the egg yolk plasma from nonfertilized eggs using two consecutive affinity chromatographies and gel filtration. Purified egg yolk ovoinhibitor was shown to inhibit trypsin and subtilisin. It was shown that purified egg yolk ovoinhibitor exhibited antimicrobial activities against *Bacillus thuringiensis*. The results suggest that this anti-protease plays a significant role in antibacterial egg defense against *Bacillus* spp., preventing contamination of table eggs (nonfertilized eggs) and protecting the chick embryo (fertilized eggs).

KEYWORDS: chicken egg, anti-protease, expression, sexual maturation, antibacterial activity

■ INTRODUCTION

Kazal-type inhibitors are canonical serine proteinase inhibitors that interact with their cognate enzymes through their reactive site.¹ These inhibitors are widely distributed in all kingdoms of life and have various physiological functions. The reactive site of Kazal-type inhibitors is extremely variable, but this domain is structurally conserved. A Kazal domain is characterized by the presence of six well-conserved cysteine residues forming three intradomain disulfide bridges. Several of these inhibitors are believed to be involved in innate immune response.^{2–4} The specificity of their antimicrobial activity would rely on their ability to inhibit microbial proteases, which are essential to pathogens to invade host tissues. Such inhibitors have been identified in the metazoan Hydra that display potent in vitro bactericidal activity against *Staphylococcus aureus*.⁴ In crustaceans, Kazal-type serine proteinase inhibitors in the hemolymph are suggested to function as regulators of host-defense reactions.²

Many Kazal-like inhibitors have been identified in egg. Among them there are two well-known inhibitors, ovoinhibitor and ovomucoid, which are major egg proteins.⁵ Additionally in egg, numerous (one to nine) Kazal-like domains have been recently identified in Flik protein, SPARC, trypsin inhibitor CITI-1, complement component C6, agrin, follistatin, and follistatin-related protein 1.^{6–12} The biological activities of these various proteins have not yet been explored.

In this study, we focused on ovoinhibitor, which has been identified in all egg compartments including egg white, egg yolk, vitelline membranes, and eggshell. This anti-protease possesses several Kazal-like domains that display potent anti-protease activity.^{5,13}

We first analyzed the expression of ovoinhibitor in various tissues of laying hens by quantitative RT-PCR. Egg yolk ovoinhibitor is expressed by the liver and is secreted into the blood to reach the follicle, whereas the ovoinhibitor found in the other egg compartments is expressed by the oviduct. In fact, it has been shown that egg yolk ovoinhibitor, also named vitelloinhibitor, is derived from a plasmatic precursor form.¹⁴ This precursor form was previously named $\alpha 2$ -proteinase inhibitor and consists of two components related to ovoinhibitor that contain different post-translational modifications.¹⁴ As the egg yolk ovoinhibitor gene is an estrogen-responsive gene¹⁵ that is secreted by the liver to be further incorporated in growing follicles, we analyzed its expression in livers of laying and prelaying hens to better appreciate the temporal expression of this anti-protease during sexual maturation.

In a second approach, we developed a new strategy of purification of this anti-protease from freshly laid eggs (unfertilized) to further explore its functional activities and more particularly its antimicrobial potential. Ovoinhibitor is commonly purified from egg white ovomucoid preparation using gel filtration and ion-exchange chromatography.^{16,17} Some have suggested that preparations of ovoinhibitor from egg white are contaminated with egg white lysozyme, which displays potent antibacterial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria.¹⁸ Because ovoinhibitor is also present in egg yolk, which contains less lysozyme than egg white,

Received: August 19, 2011

Revised: October 18, 2011

Accepted: October 19, 2011

Published: October 19, 2011

we developed a process of purification of ovoinhibitor from egg yolk plasma using two affinity chromatographies followed by gel filtration. The antimicrobial activity of pure ovoinhibitor was then assessed against several bacterial strains secreting proteases including *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, and *Bacillus* spp.

MATERIALS AND METHODS

Tissue Specificity. Tissues (eight samples for each organ) of the oviduct (infundibulum, white isthmus, magnum, and uterus) and other organs (liver, kidney, and duodenum) were harvested from 41-week-old hens. Additionally, livers of 13-, 14-, 15-, and 16-week-old prelaying hens and 41-week-old laying hens were collected. Total RNA was extracted from frozen tissues using the commercial kit Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) for the infundibulum, magnum, white isthmus, kidney, and duodenum and the RNA NOW method (Biogentex, Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) followed by a treatment with DNase I (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) for the liver. RNA concentrations were obtained by measuring absorbance at 260 nm, and the quality of RNA was controlled using the Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Massy, France). Five micrograms of total RNA was reverse-transcribed using the Superscript II kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and random hexamers (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Primers for ovoinhibitor were 5'-TAAG-GATGGCAGGACTTTGG-3' (forward) and 5'-GAGTTTGCCAC-CAGTGGTTT-3' (backward) at 0.4 μ M in UptiTherm buffer 1 \times (Interchim, Montluçon, France). Quantitative RT-PCR was used to evaluate tissue expression of ovoinhibitor in infundibulum, white isthmus, magnum, uterus, liver, kidney, and duodenum and in livers of hens at 13, 14, 15, 16, and 41 weeks of age. cDNA was amplified in real time using the qPCR Master mix plus for Sybr Green I (Eurogentec, Seraing, Belgium) with a LightCycler 480 apparatus (Roche Diagnostics, Meylan, France). A melting curve program was carried out from 65 to 95 °C in 1 min for each individual sample amplified with Sybr Green. Each run included triplicates of control cDNA corresponding to a pool of cDNA from all tissues. The control cDNA was diluted from 1:6.25 to 1:102,400, and relative arbitrary quantities were defined. The threshold cycle (CT), defined as the cycle at which fluorescence rises above a defined baseline, was determined for each sample and control cDNA. A calibration curve was calculated using the CT values of the control cDNA samples, and relative amounts of unknown samples were deduced from this curve. The PCR efficiency was calculated. To account for variations due to mRNA extraction and reverse transcription reaction, ovoinhibitor mRNA levels were normalized by two different methods. Levels of 18S rRNA in each sample were first measured using a predeveloped TaqMan assay reagent (Applied Biosystems). Additionally, TATA box binding mRNA levels were determined using Sybr Green reaction and the following primers: 5'-GCGTTTTGCTGCTG-TTATTATGAG-3' (forward) and 5'-TCCTTGCTGCCAGTCTG-GAC-3' (backward). The ratio value was calculated for each sample as ovoinhibitor/18S rRNA or TBP RNA. The log of the ratio was used for statistical analysis using StatView software (SAS Institute Inc., version 5). A one-way analysis of variance was performed to detect statistically significant differences in ovoinhibitor expression in various tissues and in livers during sexual maturation of hens.

Purification of Egg Yolk Ovoinhibitor. A pool of 10 egg yolks collected from nonfertilized freshly laid eggs (table eggs) was diluted to 1:10 in ultrapure deionized water and acidified to pH 5 with HCl according to the method of Ahn et al.¹⁹ The resulting egg yolk was then centrifuged at 10000g for 60 min at 4 °C. The supernatant was considered as the hydrosoluble fraction of the egg yolk (plasma) and was used for all experiments. Purification of ovoinhibitor was performed using a three-step procedure. Heparin-Sepharose beads (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) were first equilibrated with 50 mM

Tris and 50 mM NaCl, pH 7.4, and incubated with egg yolk hydrosoluble fraction overnight at 4 °C. This step allowed the removal of some major egg yolk proteins. Ovoinhibitor was recovered in the unbound fraction to heparin. Trypsin-Sepharose beads were obtained after coupling bovine trypsin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) to CNBr-activated Sepharose according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare Bio-Sciences AB). They were first equilibrated in 50 mM Tris and 50 mM NaCl, pH 7.4, and incubated with the unbound fraction to heparin-Sepharose chromatography overnight at 4 °C. Trypsin-Sepharose beads were washed in 50 mM Tris and 150 mM NaCl, pH 7.4, and elution was performed using 100 mM glycine and 0.5 M NaCl, pH 2. Eluted samples were immediately neutralized with 1 M Tris and concentrated. Ovoinhibitor contained in eluted concentrated samples was further purified by gel filtration (Sephacryl S-100 High Resolution, Hi-prep 16/60, GE Healthcare) and concentrated. The protein concentration was determined using a Protein Dc Assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), using bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) as the standard. Samples were then analyzed by SDS-PAGE under denaturing but nonreducing conditions using a 12.5% acrylamide-bisacrylamide gel, followed by Coomassie blue staining.

In-Gel Digestion and Identification by Nano LC-Q-TOF Mass Spectrometry. The SDS-PAGE band corresponding to 50–60 kDa was cut from the gel after Coomassie blue staining and further rinsed with water and acetonitrile. It was 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.²⁰ The tryptic fragments were extracted, dried, reconstituted with 0.1% formic acid, sonicated for 10 min, and sequenced by nanoscale capillary liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using a linear ion trap mass spectrometer.

The Ettan MDLC controlled by UNICORN software (GE Healthcare, Germany) was used for desalting and separation of tryptic peptides prior to online MS and MS/MS analyses. Ten microliters of digested sample was injected using microliter-pickup mode. Each sample was automatically desalted and preconcentrated using a Zorbax 300-SB C₁₈ trap column, 300 μ m i.d. \times 5 mm (Agilent Technologies, Germany). Peptide separations were conducted on a Zorbax 300-SB C₁₈ column, 75 μ m i.d. \times 150 mm (Agilent Technologies). Buffer A consisted of water with 0.1% formic acid, whereas buffer B was 84% acetonitrile with 0.1% formic acid. Separation was performed at a flow rate of 350 nL/min by applying a gradient of 15–55% B for 30 min. Eluted peptides were online analyzed with an LTQ Linear Ion Trap mass spectrometer (Thermo Electron) using a Thermo Electron dynamic nanospray probe interface. Ionization was performed (1.8–2.1 kV) with liquid junction and noncoated fused-silica nano ESI 25 μ m i.d. emitters (New Objective, Woburn, MA). The ion transfer capillary was set to 200 °C. Each scan cycle consisted of one full-scan mass spectrum (m/z 500–2000) collected in enhanced mode followed by three MS/MS events in centroid mode ($Q_z = 0.25$, activation time = 40 ms). For CID spectra (MS^2), the isolation width was 2 m/z units and the normalized collision energy was 40%. Dynamic exclusion was active during 30 s with a repeat count of 1. Raw data files were converted to mzXML with Bioworks 3.3.1 software (Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA). To identify the proteins, the peptide and fragment masses obtained were matched automatically against a locally maintained copy of the nonredundant nr NCBI database (downloaded January 10, 2010). MS/MS ion searches were performed using MASCOT Daemon and a search engine (Matrix Science, U.K.) against the *Chordata* section (10299319 sequences). Enzyme specificity was set to trypsin with two missed cleavages using carbamidomethylcysteine (+57 Da), methionine oxidation (+16 Da), and propionamide cysteine (+71) as variable modifications. The tolerance of the ions was set to 1.4 Da for parent and 1.0 Da for fragment ion matches. Proteins detected with a P value of <0.05 were considered to be

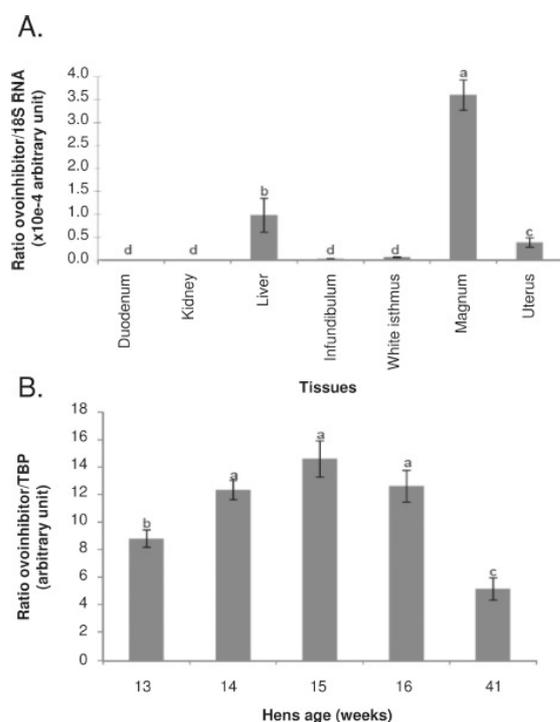


Figure 1. Tissue expression of ovoinhibitor in chicken females: (A) tissue distribution of ovoinhibitor; (B) temporal expression of ovoinhibitor in liver during sexual maturation. TBP, Tata binding protein. Means that do not share a common letter are significantly different ($P < 0.05$; $n = 8$).

positively identified with one peptide when the presence of five consecutive fragment ions was confirmed.

Inhibition Assays. Subtilisin A type VIII, elastase from porcine pancreas type IV, trypsin from bovine pancreas TPCK treated, α -chymotrypsin from bovine pancreas type II, *N*-succinyl-ala-ala-ala-*p*-nitroanilide, *N*-succinyl-ala-ala-pro-phe *p*-nitroanilide, and *N*-(*p*-tosyl)-gly pro-arg *p*-nitroanilide were all purchased from Sigma-Aldrich. The inhibitory activity of purified egg yolk ovoinhibitor was assayed in 0.1 M Tris-HCl and 0.1 M NaCl, pH 8. The reaction mixture consisted of 0.3 mM *N*-succinyl-ala-ala-ala-*p*-nitroanilide, *N*-succinyl-ala-ala-pro-phe *p*-nitroanilide, and *N*-(*p*-tosyl)-gly pro-arg *p*-nitroanilide for elastase (17 nM), chymotrypsin (2 nM), subtilisin (1 nM), and trypsin (2 nM), respectively. Proteinases were independently incubated with increasing concentrations of purified ovoinhibitor (1–200 nM) in the buffer for 30 min at 37 °C. The remaining activity of proteases was evaluated after addition of their respective substrates by measuring the absorbance at 410 nm during 15 min at 37 °C. Each reaction was performed in triplicate using a microplate reader (Tecan, Infinite M200, Tecan France S.A.S., Lyon, France).

Antimicrobial Assays. *P. aeruginosa* PAO1 and *S. aureus* CIP 103 811 were provided by S. Attucci (Inserm U618, Proteases et vectorisation pulmonaires, Tours, France). *Bacillus cereus* ATCC 6464, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, and *Bacillus thuringiensis* LMSA 3.06.004 were from the American Type Culture Collection (ATCC) and from the “Souchothèque de Bretagne” culture collection (Université de Brest, Plouzané, France), respectively. Bacteria were grown to mid-logarithmic phase in 9 mL of brain–heart infusion (BHI) broth (AES Chemunex,

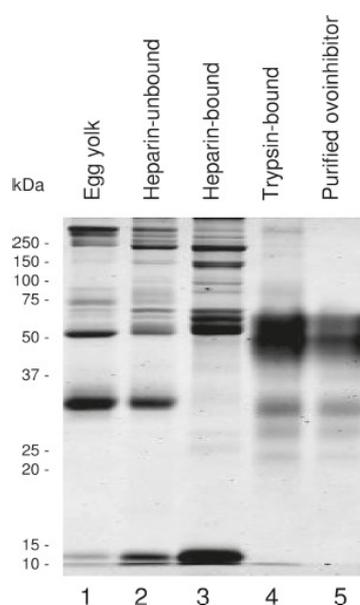


Figure 2. Purification of ovoinhibitor from egg yolk. Lanes: 1, egg yolk; 2, egg yolk fraction that does not bind to heparin-Sepharose (unbound fraction); 3, egg yolk fraction that does bind to heparin-Sepharose (bound fraction); 4, fraction eluted from trypsin-Sepharose; 5, egg yolk ovoinhibitor after gel filtration and concentration. Protein samples (5 μ g) were analyzed by SDS-PAGE under nonreducing conditions after Coomassie blue staining.

Bruz, France). They were then washed twice in modified Dulbecco's phosphate-buffered saline without calcium chloride and magnesium chloride (buffer A, Sigma-Aldrich) and centrifuged for 10 min at 10000g. Antimicrobial tests were conducted in 96-well low-binding plates (Corning 3355, Sigma-Aldrich) in a 150 μ L final volume. Bacteria (3×10^5 cfu/150 μ L) were incubated with various concentrations of ovoinhibitor (0.47, 0.94, and 1.88 μ M) diluted in buffer A for 3 h at room temperature. Twenty microliters of the mix bacteria–ovoinhibitor was then sampled and serially diluted. The different dilutions were plated onto tryptic soy agar (TSA) (Biomérieux, Craponne, France) and incubated overnight at 30 °C to count colonies and determine bacterial concentrations.

RESULTS

Tissue Distribution and Sequential Expression of Ovoinhibitor in Hens. The expression of ovoinhibitor gene was analyzed by quantitative RT-PCR in different tissues involved in egg formation (liver for the yolk; infundibulum for vitelline membranes; magnum for the egg white; white isthmus for shell membranes), in the kidney and in the duodenum. Levels of ovoinhibitor expression were normalized by 18S RNA to control for possible differences in RNA extraction and reverse transcription efficiencies between samples. The relative normalized ovoinhibitor expression was higher in the magnum compared with all other tissues tested (Figure 1A; $P < 0.001$). In the liver, the expression was 27% of that expressed in the magnum and was significantly higher than that detected in all other tissues (Figure 1A; $P < 0.05$). Ovoinhibitor expression was also revealed in the uterus but at a lower magnitude (Figure 1A).

Table 1. Characteristics of Ovoinhibitor Peptides Identified by Mass Spectrometry

protein accession, description	sequence coverage	precursor mass		peptide score	peptide sequence
		observed	theoretical		
gi 71895337, ovoinhibitor precursor [<i>Gallus gallus</i>]	30.1	1078.2586	1078.5151	28.03	TLNLVSM AAC
		1715.8192	1715.8487	50.33	HVMIDCS PYLQVVR
		1762.6205	1762.7832	82.07	QEIPEIDCDQYPTR
		1869.0589	1868.919	51.17	LEIGSVDCSKYPSTVSK
		1891.1715	1890.8782	50.55	QEIPEIDCDQYPTRK
		2078.9304	2078.915	70.36	CRQEIPEIDCDQYPTR
		2197.5155	2197.0685	56.17	LEIGSVDCSKYPSTVSKDGR
		2205.6597	2207.0099	28.89	CRQEIPEIDCDQYPTRK
		2628.4579	2628.1407	60.21	VSPIC TMEYVPHCGSDGVITYSNR
		2709.6046	2708.2786	41.82	LHDGECKLEIGSVDCSKYPSTVSK
		2776.8539	2777.2207	68.38	NLKPVC GTD GSTYSNECGICLYNR
		3083.018	3083.3172	102.5	ILSPVCGTDGFTYDNECGICAHNAEQR

MRTARQFVQVALALCCFADIAFGIEV**NCS**LYASGIGKDGTSWVACPR**NLKP**VC**GT**DG**ST**
SNECGICLYNR**EH**GANVEKEYDGE**CR**PK**HVM**IDCS**PYLQ**VVR**DG**NT**MV**ACPRIL**KP**VC**GS**
DSFTYDNECGICAYNAEHHT**NISK**LHDGECKLEIGSVDCSKYPSTVSKDGR**TLV**ACPR**IL**
SPVCGTDGFTYDNECGICAHNAEQ**R**THVSKKHGDKCR**QEIPE**LD**CDQ**Y**TRK**TTGGKLLV
RCPRI**LLP**VC**GT**DGFTYDNECGICAHNAQ**HTE**VK**SHD**GRCKR**STPL**DC**TQ**YLS**NT**Q**N**
GEAI**TAC**PFIL**Q**EVCGTDGFTY**SN**DCSLCAHNI**ELG**TSVAKKHGDKR**CEE**VE**PE**LDC**SKY**
TSTLKDGRQ**VV**AC**TM**YDPV**CA**TNGV**TYA**SE**CT**LCAH**LEQ**R**TLN**LK**R**K**NGR**CE**DI**TK**E**
HCRE**FQ**K**V**SPIC**T**MEY**V**PHCGSDGV**TY**SNR**CF**FC**NAY**V**Q**S**NRT**LNLV**S**MA**AC**

Figure 3. Mass spectrometry coverage of ovoinhibitor sequence (IOV7_CHICK, P10184). Peptides identified by mass spectrometry are shaded in gray, glycosylation sites are shown in bold, and the signal peptide is underlined.

The expression of ovoinhibitor was analyzed in the liver of prelaying and laying hens during sexual maturation. As shown in Figure 1B, the relative normalized ovoinhibitor expression increased gradually from 13 weeks of age to reach its maximum of expression at 15 weeks of age. A significant decrease in expression was observed in livers of 41-week-old hens ($P < 0.0001$) to return to a level that is significantly lower than initially measured in livers of 13-week-old pullets ($P < 0.0005$).

Purification of Egg Yolk Ovoinhibitor Using Affinity Chromatography. SDS-PAGE analysis of various purification steps is presented in Figure 2. Purified ovoinhibitor consists of a major heterogeneous band (Figure 2, lane 5) with an apparent molecular weight ranging from 50 to 65 kDa, in accordance with its theoretical molecular weight (49.4 kDa). As shown in Figure 2, lane 3, heparin-Sepharose chromatography allowed the removal of numerous proteins from the unbound fraction (Figure 2, lane 2). In fact, we have shown by mass spectrometry analysis that heparin-Sepharose allowed the binding of apovitellenin, similar to avidin, apolipoprotein B, and vitellogenins II and III (data not shown). Ovoinhibitor was identified by mass spectrometry with 12 unique peptides (Table 1) corresponding to 30.8% sequence coverage of the mature form (without the signal peptide) (Figure 3).

Anti-protease Activity of Purified Ovoinhibitor. The inhibitory activity of purified ovoinhibitor was assayed toward four proteases, trypsin, subtilisin, chymotrypsin, and pancreatic elastase. The results indicate that the purified ovoinhibitor displayed activities against trypsin and subtilisin (Figure 4). Ovoinhibitor exhibited a weak activity toward chymotrypsin, and no activity could be detected against pancreatic elastase in our conditions (data not shown).

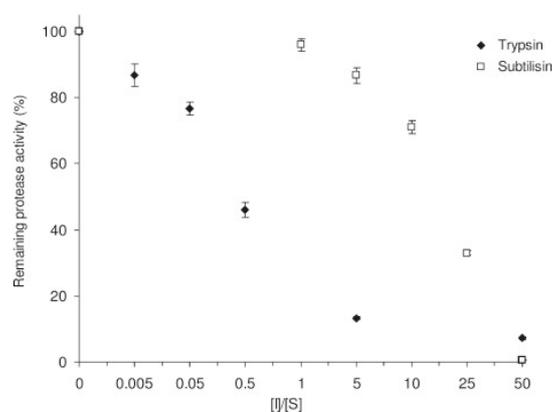


Figure 4. Protease inhibition assay of purified egg yolk ovoinhibitor. The inhibitor was incubated with subtilisin and trypsin, 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 8, at 37 °C for 30 min before the addition of their respective substrate (see Material and Methods). Substrate hydrolysis was monitored during 15 min. Results are expressed as a percentage of inhibition related to the control (substrate + protease). The molar ratios of ovoinhibitor [I]/trypsin or subtilisin [E] are indicated on the x-axis.

Antimicrobial Assays. The antibacterial activity of purified ovoinhibitor was investigated against *S. aureus* CIP 103 811, *P. aeruginosa* PAO1, *B. cereus* ATCC 6464, *B. subtilis* ATCC 6633, and *B. thuringiensis* LMSA 3.06.004. It was found that the purified ovoinhibitor was able to inhibit *B. thuringiensis* (Table 2).

DISCUSSION

The hens export in the egg a large range of nutrients but also protective systems against microbial invasion to ensure the extrauterine development of the embryo. These characteristics are at the origin of the high nutritional value of eggs for human and of its long storage ability at room temperature without alterations. At least 40 different protease inhibitors have been identified in chicken egg¹² including two well-known and ubiquitous Kazal-like proteins, ovoinhibitor and ovomucoid.

Table 2. Antimicrobial Activity of Purified Ovoinhibitor

bacterial strain	antimicrobial activity (MIC, μ M)
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 103 811	nd ^a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	nd
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 6464	nd
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	nd
<i>Bacillus thuringiensis</i> LMSA3.06.004	3.8

^a nd, not detected.

The physiological roles of these inhibitors in egg remain unexplored. Some of them, including ovoinhibitor, are likely to contribute to regulation of proteolytic degradation of egg yolk proteins during embryonic development.¹⁴ Alternatively, there is increasing evidence in the literature that Kazal-type inhibitors might play a role in innate immunity to inhibit proteases that are secreted by invading pathogens. In this study, we investigated the antimicrobial potential of egg yolk ovoinhibitor, which contains seven Kazal-like domains capable of inhibiting various proteases with different enzymatic specificities. We first showed that the expression of ovoinhibitor is specific to tissues which participate in the formation of the chicken egg, particularly in the magnum and liver (Figure 1A), which secrete egg white proteins and egg yolk proteins, respectively. The transcription rate of the ovoinhibitor gene in liver is stimulated during sexual maturation of pullets (Figure 1). These results are in agreement with the increase of the expression induced in chicks treated with estrogen¹⁵ and the observation that ovoinhibitor expression is highly induced at sexual maturity in geese.²¹ The expression of ovoinhibitor coincides with estradiol plasma concentration because the highest concentration of estradiol is reached during the two weeks preceding the onset of egg laying (15 and 16 weeks of age, when the ovoinhibitor expression was highest, Figure 1B) and with a subsequent decrease observed in laying hens (16 and 41 weeks, Figure 1B). From our results, it seems that ovoinhibitor expression in the livers of mature hens is significantly lower than in the livers of 13-week-old pullets (Figure 1B). However, we have shown elsewhere that the expression of ovoinhibitor is not significantly different between 10-week-old pullets and 41-week-old hens in a transcriptomic approach applied to liver (unpublished data). These results indicate that the expression of ovoinhibitor is increased during sexual maturation of pullets and decreases subsequently to reach a level that is similar to that found in immature hens (10 weeks old). It would be interesting to determine whether changes in the ovoinhibitor expression in the liver during sexual maturation coincide with an increase in ovoinhibitor concentrations in blood, in which all yolk precursors are secreted prior to their transfer into the ovary. In fact, an ovoinhibitor analogue has been identified in the serum of laying hens.^{14,22}

A new technique of purification was developed to isolate ovoinhibitor from egg yolk plasma from nonfertilized eggs and to further explore its antimicrobial potential. The strategy chosen was based on two affinity chromatographies followed by a gel filtration. We have taken egg yolk plasma as the starting material because ovoinhibitor is mainly recovered in the hydrosoluble fraction of egg yolk.¹¹ The first step of purification consisted of heparin-Sepharose that was used to remove lipoproteins from ovoinhibitor preparations (Figure 2, lane 3). Then, we used a

trypsin-Sepharose to specifically target trypsin anti-proteases contained in this lipoprotein-depleted fraction, considering that ovoinhibitor is a potent trypsin-like anti-protease. Pure ovoinhibitor was finally recovered after gel filtration. The electrophoretic profile of the resulting sample revealed a large band with an apparent molecular weight ranging from 50 to 65 kDa as well as smaller bands around 35 and 32 kDa. After mass spectrometry analysis, it was confirmed that the major band as well as these lower bands corresponded to the ovoinhibitor. The 35 and 32 kDa bands might result from proteolytic degradation of ovoinhibitor during the process of purification (elution performed at pH 2). The apparent heterogeneity of native ovoinhibitor on SDS-PAGE (50–65 kDa) has been previously described^{23, 14} and can be explained by the presence of three glycosylation sites²⁴ as indicated in Figure 3.

Ovoinhibitor possesses seven Kazal-type domains that favor inhibition of various serine proteases including trypsin, subtilisin, and, to a lesser extent, chymotrypsin and elastase.¹³ Purified egg yolk ovoinhibitor exhibited potent inhibitory activity against trypsin and subtilisin, as previously shown.¹⁴ In contrast, the inhibitory activity of purified ovoinhibitor against chymotrypsin was weak, and no inhibition of pancreatic elastase could be detected (data not shown). Former publications suggest that anti-proteases with inhibitory activity against subtilisin could potentially be bacteriostatic against some *Bacillus* spp. or other serine protease(s) secreting strains.^{4,25,26} In fact, protease inhibitors are widely used in several therapeutic strategies to overcome bacterial and viral infections.²⁷ Most microorganisms secrete proteases that can hydrolyze host proteins to inactivate them or to facilitate their assimilation by microorganisms as nutrients. These microbial proteases can thereby limit the immune response and induce tissue damages that favor pathogen dissemination. However, host organisms possess an arsenal of anti-proteases that regulate and interfere with the deleterious activities of exogenous proteases.²⁸ Because of the presence of seven different inhibitory sites, ovoinhibitor constitutes a potent antimicrobial candidate. Our results indicate that the purified ovoinhibitor displayed antimicrobial activity against *B. thuringiensis*. These results are consistent with previous data that indicate a similar antimicrobial spectrum for other Kazal-like proteins.^{2,26} Thus, hcPCSP12 from the red swamp crayfish is a three Kazal-like inhibitor with inhibitory activity against subtilisin A and trypsin, which have been shown to exhibit bacteriostatic activity against *B. thuringiensis* and *B. subtilis* to a lesser extent,²⁶ but none against the other *Bacillus* strains tested. Analysis of the *B. thuringiensis* genome revealed at least seven different protease genes including five serine proteases potentially inhibited by ovoinhibitor, some of them being intracellular, extracellular, or membrane-associated.²⁹ Analysis of the antimicrobial potential of each Kazal domain produced independently as recombinant molecules would give additional information regarding the enzymatic specificity of the *Bacillus* protease(s) which is (are) actually inhibited by ovoinhibitor. The antibacterial activity of ovoinhibitor against *B. thuringiensis* may also depend on a synergistic action of some or all of its inhibitory domains.

Ovoinhibitor together with cystatin is the second anti-protease from egg that has been described as an antimicrobial agent.^{30–33} As many serine protease inhibitors are up-regulated following infection,^{34–36} it will be also informative to study how ovoinhibitor expression is regulated in the various chicken female tissues upon bacterial or viral challenges. All of these data will help to increase our appreciation of the role of ovoinhibitor in

innate response of hens and the possible exportation of anti-microbial anti-proteases into eggs to ensure the hygienic quality of table eggs and the protection of developing embryos.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: srehault@tours.inra.fr. Phone: +33 2 47 42 78 39. Fax: +33 2 47 42 77 78.

Funding Sources

This research was supported by the French National Research Agency (OVO-mining, ANR-09-BLAN-0136) and the European Community (RESCAPE Project FOOD CT 2006-03018). M.B. acknowledges Region Centre for financial support.

ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge the experimental unit PEAT (INRA, UE1295 Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours, Nouzilly, France) and more particularly Frédéric Mercierand and Jean-Didier Terlot-Bryssine for providing birds and eggs. We thank Marie Le Bras (LUBEM, France), Loïc Castrec (LUBEM, France), Franck Deniel (LUBEM, France), Danielle Arzur (LUBEM, France), Sylvie Treguer (LUBEM, France), Christophe Lemeur (LUBEM, France), Deborah Bréa (INSERM U618, France), and Alice Dubois (INSERM U618, France) for their help in realizing antimicrobial assays.

REFERENCES

- Laskowski, M.; Kato, I. Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* **1980**, *49*, 593–626.
- Li, X. C.; Wang, X. W.; Wang, Z. H.; Zhao, X. F.; Wang, J. X. A three-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor exhibiting domain inhibitory and bacteriostatic activities from freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Dev. Comp. Immunol.* **2009**, *33* (12), 1229–1238.
- Somprasong, N.; Rimphanitchayakit, V.; Tassanakajon, A. A five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its inhibitory activities. *Dev. Comp. Immunol.* **2006**, *30* (11), 998–1008.
- Augustin, R.; Siebert, S.; Bosch, T. C. G. Identification of a Kazal-type serine protease inhibitor with potent anti-staphylococcal activity as part of Hydra's innate immune system. *Dev. Comp. Immunol.* **2009**, *33* (7), 830–837.
- Saxena, I.; Tayyab, S. Protein proteinase inhibitors from avian egg whites. *Cell Mol. Life Sci.* **1997**, *53* (1), 13–23.
- D'Ambrosio, C.; Arena, S.; Scaloni, A.; Guerrier, L.; Boschetti, E.; Mendieta, M. E.; Citterio, A.; Righetti, P. G. Exploring the chicken egg white proteome with combinatorial peptide ligand libraries. *J. Proteome Res.* **2008**, *7* (8), 3461–3474.
- Farinazzo, A.; Restuccia, U.; Bachi, A.; Guerrier, L.; Fortis, F.; Boschetti, E.; Fasoli, E.; Citterio, A.; Righetti, P. G. Chicken egg yolk cytoplasmic proteome, mined via combinatorial peptide ligand libraries. *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216* (8), 1241–1252.
- Mann, K. The chicken egg white proteome. *Proteomics* **2007**, *7* (19), 3558–3568.
- Mann, K. Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. *Proteomics* **2008**, *8* (11), 2322–2332.
- Mann, K.; Macek, B.; Olsen, J. V. Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer. *Proteomics* **2006**, *6* (13), 3801–3810.
- Mann, K.; Mann, M. The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. *Proteomics* **2008**, *8* (1), 178–191.
- Réhault-Godbert, S.; Hervé-Grépinet, V.; Gautron, J.; Cabau, C.; Nys, Y.; Hincke, M. T. Molecules involved in chemical defence of the chicken egg. In *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products*; Nys, Y., Bain, M., Van Immersel, F., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, U.K., 2011; Vol. 1, pp 183–208.
- Gertler, A.; Bernalid, I. Stoichiometry of interaction of chicken ovomucoid with pancreatic trypsin, chymotrypsin and elastase-I. *Eur. J. Biochem.* **1980**, *110* (2), 571–577.
- Sugimoto, Y.; Kusakabe, T.; Nagaoka, S.; Nirasawa, T.; Tatsuguchi, K.; Fujii, M.; Aoki, T.; Koga, K. A proteinase inhibitor from egg yolk of hen is an ovomucoid analog. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1295* (1), 96–102.
- Zhu, Y. F.; Wang, M.; Lin, H.; Li, Z.; Luo, J. Identification of estrogen-responsive genes in chick liver. *Cell Tissue Res.* **2001**, *305* (3), 357–363.
- Lineweaver, H.; Murray, C. W. Identification of the trypsin inhibitor of egg white with ovomucoid. *J. Biol. Chem.* **1947**, *171* (2), 565–581.
- Feeney, R. E.; Stevens, F. C.; Osuga, D. T. The specificities of chicken ovomucoid and ovomucoid. *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 1415–1418.
- Pellegrini, A.; Grob, K.; Vonfellenberg, R. Identification of a bactericidal component active against Gram-positive and Gram-negative bacteria in commercial ovomucoid and ovomucoid as lysozyme. *Letts. Appl. Microbiol.* **1990**, *10* (5), 201–204.
- Ahn, D. U.; Lee, S. H.; Singam, H.; Lee, E. J.; Kim, J. C. Sequential separation of main components from chicken egg yolk. *Food Sci. Biotechnol.* **2006**, *15* (2), 189–195.
- Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **1996**, *68* (5), 850–858.
- Yen, C. F.; Lin, E. C.; Wang, Y. H.; Wang, P. H.; Lin, H. W.; Hsu, J. C.; Wu, L. S.; Jiang, Y. N.; Ding, S. T. Abundantly expressed hepatic genes and their differential expression in liver of prelaying and laying geese. *Poult. Sci.* **2009**, *88* (9), 1955–1962.
- Barrett, A. J. Chicken $\alpha 2$ -proteinase inhibitor: a serum protein homologous with ovomucoid of egg white. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *371* (1), 52–62.
- 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* (11), 3901–3910.
- Yet, M. G.; Wold, F. The distribution of glycan structures in individual N-glycosylation sites in animal and plant glycoproteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *278* (2), 356–364.
- Donpuksa, S.; Tassanakajon, A.; Rimphanitchayakit, V. Domain inhibitory and bacteriostatic activities of the five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* **2009**, *33* (4), 481–488.
- Li, X. C.; Zhang, R. R.; Sun, R. R.; Lan, J. F.; Zhao, X. F.; Wang, J. X. Three Kazal-type serine proteinase inhibitors from the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* and the characterization, function analysis of hcPcSPI2. *Fish Shellfish Immunol.* **2010**, *28* (5–6), 942–951.
- Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Clare, B. W. Bacterial protease inhibitors. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22* (4), 329–372.
- Armstrong, P. B. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host–pathogen interaction. *Immunobiology* **2006**, *211* (4), 263–281.
- Chen, F. C.; Shen, L. F.; Chak, K. F. A facile analytical method for the identification of protease gene profiles from *Bacillus thuringiensis* strains. *J. Microbiol. Methods* **2004**, *56* (1), 125–132.
- Blankenvoorde, M. F.; van't Hof, W.; Walgreen-Weterings, E.; van Steenberghe, T. J.; Brand, H. S.; Veerman, E. C.; Nieuw Amerongen, A. V. Cystatin and cystatin-derived peptides have antibacterial activity against the pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Biol. Chem.* **1998**, *379* (11), 1371–1375.
- Kolaczowska, A.; Kolaczowski, M.; Sokolowska, A.; Miecznikowska, H.; Kubiak, A.; Rolka, K.; Polanowski, A. The antifungal properties of chicken egg cystatin against *Candida* yeast isolates showing different levels of azole resistance. *Mycoses* **2010**, *53* (4), 314–320.

(32) Korant, B. D.; Towatari, T.; Ivanoff, L.; Petteway, S., Jr.; Brzin, J.; Lenarcic, B.; Turk, V. Viral therapy: prospects for protease inhibitors. *J. Cell Biochem.* 1986, 32 (2), 91–95.

(33) Serveau, C.; Lalmanach, G.; Juliano, M. A.; Scharfstein, J.; Juliano, L.; Gauthier, F. Investigation of the substrate specificity of Cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, through the use of cystatin-derived substrates and inhibitors. *Biochem. J.* 1996, 313 (Part 3), 951–956.

(34) Yang, A. F.; Zhou, Z. C.; Dong, Y.; Jiang, B.; Wang, X. Y.; Chen, Z.; Guan, X. Y.; Wang, B.; Sun, D. P. Expression of immune-related genes in embryos and larvae of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 2010, 29 (5), 839–845.

(35) He, N.; Yakiyama, M.; Fujii, H.; Banno, Y.; Yamamoto, K. Genomic structure and expression analysis of the gene encoding a silkworm basic Kunitz-type chymotrypsin inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta—Gene Struct. Exp.* 2003, 1628 (1), 71–77.

(36) Wang, B.; Zhao, J. M.; Song, L. S.; Zhang, H.; Wang, L. L.; Li, C. H.; Zheng, P. L.; Zhu, L.; Qiu, L. M.; Xing, K. Z. Molecular cloning and expression of a novel Kazal-type serine proteinase inhibitor gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri*, and the inhibitory activity of its recombinant domain. *Fish Shellfish Immunol.* 2008, 24 (5), 629–637.

IV
DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'œuf se compose d'une grande diversité de molécules potentiellement valorisables en santé animale et humaine telles que des molécules antimicrobiennes, anti-hypertensives et antioxydantes (Schade, 2007). Nous nous sommes intéressés au système protéases/antiprotéases qui est impliqué, chez les mammifères, dans de nombreux processus physiologiques (défense innée, fertilité, développement embryonnaire, inflammation, etc.) et pathologiques (cancer, etc.) (Davies, 1990, Hooper, 1994, Otto *et al.*, 1997, Borkakoti, 1998, Barrett *et al.*, 2001, Turk *et al.*, 2001, Hedstrom, 2002, Sajid *et al.*, 2002, Woessner, 2002, Polgar, 2005). La régulation de la balance protéases/antiprotéases et leur fonction respective dans l'œuf restent méconnues. Certaines telles que la cystatine sont en effet impliquées dans la défense antimicrobienne de l'œuf (Korant *et al.*, 1985). D'autres comme la cathepsine D sont également impliquées dans la maturation de ses protéines (Retzek *et al.*, 1992). Jusqu'à dernièrement, seules les protéines majeures du jaune d'œuf avaient été identifiées et étudiées, mais de récentes approches protéomiques ont permis de mettre en évidence de nombreuses protéines mineures et en particulier des protéases et antiprotéases. L'objectif de la thèse était 1) d'identifier les protéases et antiprotéases présentes dans le jaune d'œuf, une source de nutriments et de molécules bioactives pour l'embryon, 2) de déterminer, pour certaines d'entre elles, leur origine tissulaire et leur spécificités fonctionnelles en mesurant la variabilité de l'expression de leur gènes dans différents organes et à différents stades physiologiques, liés à la maturité sexuelle.

Ces approches à la fois globale (approche transcriptomique) et ciblée (protéines candidates) nous ont permis de mieux définir la dynamique moléculaire des protéases et des antiprotéases synthétisées par le foie, l'organe à l'origine de la majorité des constituants du jaune d'œuf. Une part de ces enzymes est impliquée dans le processus de synthèse hépatique ou le transfert ovarien des précurseurs du jaune ; elles pourraient aussi être associées à l'une des nombreuses modifications de la fonction hépatique générées par la maturité sexuelle (lipogénèse et synthèse protéique accrues). Une autre part est transférée dans le jaune d'œuf et contribuera à la maturation des précurseurs du jaune et au développement embryonnaire. La caractérisation de leurs activités à travers notamment l'identification de leurs cibles protéiques, la mise en évidence de leur régulation par les stéroïdes sexuels, la démonstration d'une exportation plasmatique vers les organes reproducteurs ou autres sites affectés par la maturité sexuelle et la localisation de leur action sont autant d'approches qui contribueront à

préciser leur rôle dans la vitellogenèse, les remaniements tissulaires ovariens, la fécondation ou leur implication au cours du développement embryonnaire.

Une des particularités métaboliques des oiseaux est la synthèse de l'ensemble des constituants lipidiques dans le foie, contrairement aux mammifères où il existe également une synthèse par les tissus périphériques adipeux. Une autre originalité est leur oviparité associée à une fertilisation interne (infundibulum) mais à un développement externe de l'embryon. La poule doit donc anticiper l'intégralité des besoins de l'embryon. Elle doit exporter dans l'œuf l'ensemble des nutriments, mais également la majeure partie des outils biologiques nécessaires à l'utilisation initiale de ces nutriments ou à la mise en place des fonctions biologiques, favorisant la protection et le développement embryonnaire (Etches, 1996, Nys *et al.*, 2011). Aussi, chez l'oiseau, les organes reproducteurs et le foie contribuent à accumuler les réserves nutritionnelles et les molécules biologiquement actives, qui permettront le développement d'un poussin dans une enceinte fermée. La spécificité d'élaboration des compartiments de l'œuf est remarquable : le foie synthétise la majorité des constituants du jaune et chaque segment de l'oviducte ajoute dans une séquence spatiale et temporelle les protéines du blanc, les membranes coquillières et la coquille dans sa partie terminale. Un dernier point remarquable qui nous a conduits à explorer préférentiellement le foie, est l'absence de remaniement des précurseurs lipoprotéiques du jaune, lors de leur transfert du foie vers l'ovaire et leur transit ovarien dans l'oocyte des follicules en croissance. En effet, la maturation des précurseurs est endogène à l'oocyte et s'effectue après leur internalisation. L'étude des protéases ou antiprotéases, qui présentent une grande diversité fonctionnelle, est plus complexe que celle d'un précurseur nutritionnel du jaune. En effet, ces molécules peuvent être simplement exportées dans le jaune pour organiser le stockage des nutriments ou favoriser le développement de l'embryon mais elles peuvent aussi intervenir dans le processus de mise en place de ces réserves : au niveau hépatique pour fournir les acides aminés indispensables à la synthèse protéique intense ou au niveau périphérique (ovaire). En effet, les tissus ovariens sont profondément remaniés lors de la croissance des follicules jusqu'à l'ovulation dans l'oviducte. Ce remodelage tissulaire implique de nombreuses protéases dont l'activité est régulée par des antiprotéases spécifiques et qui sont produites localement par les cellules de la thèque et de la granulosa. Cependant, une contribution hépatique est tout à fait envisageable.

L'étude de l'expression hépatique au moment de la mise en place de la fonction de reproduction chez la poule (maturité sexuelle, capacité à pondre des œufs) a révélé 582 gènes surexprimés dans le foie des poules sexuellement matures (Article 1). Si l'on s'intéresse aux 10 gènes les plus surexprimés par le foie à la maturité sexuelle, la plupart code des précurseurs du jaune, de la membrane vitelline ou des protéines impliquées dans la synthèse des lipides. Parmi l'ensemble des gènes surexprimés, 15 protéases et antiprotéases ont été identifiées et validées par RT-qPCR. Etonnamment, seules 2 d'entre elles, la « similar to nothepsin » et la « similar to porin », ont également été identifiées dans le jaune (Mann *et al.*, 2008, Farinazzo *et al.*, 2009), et une autre, la « similar to oviductin » dans la membrane vitelline (Mann, 2008). Nous avons par ailleurs montré que l'expression de la « similar to nothepsin » était spécifique du foie des poules matures sexuellement alors que l'expression de son homologue la cathepsine D est ubiquitaire chez les mâles et les femelles (Article 2).

Concernant ces 15 candidats identifiés au cours de l'approche transcriptomique, une première approche a consisté à identifier les protéases et antiprotéases secrétées par le foie et susceptibles d'être dirigées vers le jaune d'œuf. La recherche d'un peptide signal dans leur séquence protéique nous a permis d'identifier des protéines secrétées par la voie classique, c'est-à-dire *via* le réticulum endoplasmique et l'appareil de golgi. Les protéines sont également secrétées par des voies « non classiques » dont il existe deux grands types: la sécrétion par translocation directe à travers la membrane plasmique et la sécrétion par exocytose (Nickel, 2010). Nous avons utilisé des outils de prédiction de sécrétion des protéines par les voies non classiques (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) élaborés sur la base de données obtenues chez les mammifères, voire les procaryotes. Il existe malheureusement peu d'outils intégrant les mécanismes de sécrétions non classiques pour les autres espèces et notamment les oiseaux. Un excellent exemple d'une protéine secrétée par la voie non classique est l'ovalbumine, la protéine majeure du blanc d'œuf (plus de 50 % des protéines du blanc d'œuf). Cette protéine ne possède pas de peptide signal classique. Elle est néanmoins prédite pour être secrétée de manière non classique par SecretomeP (NNscore = 0,59 ; une sécrétion « non classique » est reflétée par un NN score > 0,5). De la même manière, la « similar to porin » est surexprimée par le foie à la maturité sexuelle et est présente dans le jaune : elle est donc secrétée. Elle ne possède pas de peptide signal classique mais l'utilisation de SecretomeP révèle qu'elle serait également secrétée par une voie non classique (NNscore = 0.64). L'ensemble de ces résultats démontre que SecretomeP est

susceptible de donner des informations utiles même s'il doit être optimisé pour des espèces considérées comme secondaires, afin d'appréhender tous les systèmes non classiques de sécrétion notamment chez *Gallus gallus*. L'utilisation de SecretomeP v.2.0 montre que 4 des 15 protéines surexprimées possèdent un peptide signal classique de sécrétion et que 6 des 11 restantes seraient sécrétées par une voie non classique (Tableau 5).

Tableau 5 : Secrétome des protéases et antiprotéases surexprimées par le foie de poules pondeuses à la maturité sexuelle (SecretomeP v.2.0)

Nom (<i>Gallus gallus</i>)	GeneID	Secrétome (secretomePv.2.0)	Localisation cellulaire
PREDICTED: similar to nothepsin	417848	Peptide signal	-
PREDICTED: similar to putative porin	419301	Signal de sécrétion non classique	-
PREDICTED: similar to papilin	428873	-	-
PREDICTED: similar to oviductin	769290	Peptide signal	-
PREDICTED: similar to ubiquitin specific peptidase 3	415369	-	Nucléaire par homologie
PREDICTED: hypothetical protein RCJMB04_12e24	427467	-	-
PREDICTED: similar to ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 17 preproprotein	415515	-	1 domaine transmembranaire
PREDICTED: similar to PACE4A-II	395454	Signal de sécrétion non classique	-
PREDICTED: similar to aminopeptidase A	428771	Signal de sécrétion non classique	1 domaine transmembranaire
PREDICTED: similar to N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2	429156	Signal de sécrétion non classique	1 domaine transmembranaire
PREDICTED: similar to chymotrypsin inhibitor	768734	Peptide signal	-
PREDICTED: hypothetical protein	426746	-	-
PREDICTED: similar to ubiquitin specific proteinase 40	424029	Peptide signal	-
PREDICTED: similar to inner mitochondrial membrane peptidase 2 isoform 2	417780	Signal de sécrétion non classique	Membrane des mitochondries (par homologie)
PREDICTED: hypothetical protein	770448	Signal de sécrétion non classique	-

La recherche de domaines transmembranaires (TMHMM Server v. 2.0, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) ou de localisation intracellulaire de ces protéines (par homologie) nous a également permis de mieux discriminer les protéines potentiellement sécrétées pour jouer un rôle dans la vitellogénèse, de celles qui restent confinées à la cellule.

La prise en compte de l'ensemble de ces informations nous permet de proposer au moins 4 nouvelles protéases/antiprotéases (« similar to PACE4A-II », « similar to chymotrypsin inhibitor », « similar to ubiquitin specific protease 40 » et une protéase hypothétique) qui pourraient être sécrétées pour participer à la formation du jaune et/ou de la membrane vitelline. Cependant, il est probable que la « similar to ubiquitin specific protease 40 », de par son activité « ubiquitine hydrolase », soit plutôt impliquée dans le catabolisme hépatique pour maintenir l'équilibre fonctionnel du foie des poules sexuellement matures.

L'une des approches prometteuses pour vérifier la sécrétion des protéines correspondant aux gènes surexprimés par le foie, est leur détection dans le plasma sanguin, associées ou non à d'autres protéines (VLDL, vitellogénines, Alpha-2 macroglobuline) en utilisant des anticorps spécifiques. L'utilisation de ces mêmes anticorps sur des extraits de l'oocyte en croissance ou dans le jaune d'œuf (immunoprécipitation) conduirait à confirmer leur présence dans ce compartiment. Par ailleurs, la même approche appliquée aux tissus de l'ovaire apporterait des informations sur leur niveau d'implication dans le processus de remaniement tissulaire de la grappe ovarienne, sous réserve de vérifier parallèlement la possibilité d'une synthèse locale par ces tissus ovariens.

Sur les 37 protéases et antiprotéases identifiées à partir des approches protéomiques, seules 3 (similar to nothepsin, similar to porin, similar to oviductin) se révèlent être surexprimées dans le foie des poules sexuellement matures, mais au moins 14 d'entre elles sont exprimées par cet organe, que la poule soit sexuellement immature ou mature. Cette observation suggère que cet ensemble de protéases et antiprotéases, non stimulé par la maturité sexuelle, ne joue pas un rôle primordial dans la vitellogénèse. Ceci est cependant à nuancer, notamment si leur niveau d'expression est élevé, car une molécule peut être active dans les deux situations physiologiques. C'est le cas par exemple de l'anhydrase carbonique utérine. Cette enzyme qui a un rôle crucial dans la formation d'un des précurseurs essentiels de la coquille (le carbonate), n'est pas surexprimée dans ce tissu lors de la calcification (Jonchère *et al.*, 2010). Aussi, il sera utile d'explorer la signification biologique de la présence dans le jaune de ces nombreuses protéases et antiprotéases, et étudier en particulier celles qui

sont fortement exprimées par le foie, même si l'expression n'est pas augmentée au moment de la maturité sexuelle. Il est à noter que la liste des 15 protéases et antiprotéases surexprimées au moment de la maturité sexuelle de la poule n'est probablement pas exhaustive. En effet, dans les protéomes du jaune et de la membrane vitelline, nous avons identifiés deux protéases (« coagulation factor IX » et « similar to complement component C2 ») et sept antiprotéases (cystatine, « heparin cofactor II », ovalbumine X, ovostatine, « similar to antithrombin », « similar to ovulatory protein 2 » et « similar to plasma protease C1 inhibitor ») qui n'avaient pas d'oligonucléotide(s) correspondant(s) sur la puce. Les gènes correspondants à ces protéases et antiprotéases sont en cours d'analyse par RT qPCR, afin de déterminer quelle est leur spécificité tissulaire et le cas échéant, quels sont leurs niveaux d'expression dans le foie des poules sexuellement matures et immatures. Ces résultats combinés aux données issues de l'approche transcriptomique, nous permettront ainsi de proposer une vision intégrée sur l'origine tissulaire des constituants du jaune.

Une nouvelle étape, après leur mise en évidence dans l'ovocyte, est l'exploration du mécanisme d'internalisation dans le jaune des protéases surexprimées dans le foie des poules sexuellement matures. Ce mécanisme d'internalisation peut être passif par incorporation non sélective dans les vésicules endocytiques, ou actif par interaction directe ou indirecte (association avec des protéines spécifiques du jaune telles que les VLDL et les vitellogénines) avec des récepteurs spécifiques sur la paroi oocytaire. Les protéases plasmatiques, notamment, pourraient être incorporées via l'alpha-2 macroglobuline. L'alpha-2 macroglobuline est une antiprotéase à large spectre d'inhibition. Cette macromolécule plasmatique est retrouvée chez tous les vertébrés y compris *Gallus gallus* (Jacobsen *et al.*, 1995). L'interaction de cette antiprotéase avec les protéases entraîne un changement de conformation de l'alpha-2 macroglobuline qui va piéger les protéases et qui permet également l'exposition d'un domaine de liaison à des récepteurs membranaires. Il a été montré qu'après interaction avec les récepteurs LR8 qui lient également les VLDL, l'alpha-2 macroglobuline était internalisée et dégradée dans les vésicules endocytiques sous l'action probable de la cathepsine D (Jacobsen *et al.*, 1995). Les protéases associées sont également susceptibles d'être dégradées ou au contraire libérées du complexe dans le jaune, pour recouvrer leur activité. L'interaction des protéases ou des complexes protéases-antiprotéases avec ces récepteurs pourrait être étudiée en utilisant des lignées cellulaires exprimant le récepteur en question (Jacobsen *et al.*, 1995). En incubant cette lignée de cellules avec des protéases du

jaune apportées de manière exogène, il serait possible d'estimer l'internalisation des protéases en quantifiant leur disparition du milieu de culture, et en mesurant leurs produits de dégradation dans le jaune (marquage des protéases exogènes, western-blot avec des anticorps spécifiques) (Jacobsen *et al.*, 1995). Cela permettrait d'évaluer si ces protéases sont susceptibles d'être actives dans le jaune ou au contraire inactivées par dégradation, après internalisation.

Après avoir démontré l'implication, dans la formation du jaune d'œuf, des protéases et antiprotéases surexprimées dans le foie des poules sexuellement matures, il nous faudra caractériser leurs fonctions biologiques prédites dans ce compartiment. Cette caractérisation passera, en premier lieu, par l'étude bibliographique de ces candidats afin de définir les fonctions biologiques décrites pour leurs homologues dans les organismes d'autres espèces que *Gallus gallus*. A court terme, l'équipe s'intéressera aux trois protéines les plus surexprimées dans le modèle « foie de poules matures » : deux protéases, la « similar to nothepsin » et la « similar to oviductin » et une antiprotéase, la « similar to porin ».

L'analyse de l'expression de leur gène dans les différents tissus de la poule, et notamment dans le foie au cours de l'acquisition de la maturité sexuelle précisera la spécificité tissulaire de ces candidats et donc nous permettra d'identifier les tissus et/ou les milieux où la protéine devrait être la plus concentrée, afin de faciliter sa purification. Ainsi, la « similar to nothepsin » étant exclusivement exprimée par le foie des poules matures (Article 2), la stratégie de purification pourra être mise au point à partir du foie de ces poules et/ou des oocytes en croissance. Cette même stratégie a été utilisée avec succès pour la cathepsine D, de meilleurs rendements de purification ayant été obtenus lorsque la cathepsine D était purifiée à partir du foie comparativement aux follicules ovariens (Retzek *et al.*, 1992). Dans le cas de l'ovoinhibiteur, les données d'expression démontrent qu'il est très fortement exprimé dans le magnum (blanc d'œuf) puis dans le foie (jaune) (Article 3). Cependant, les données de la littérature nous ont montré que l'ovoinhibiteur purifié à partir du blanc risquait d'être contaminé par l'ovomucoïde. Nous avons choisi par conséquent de réaliser une purification à partir du jaune (Article 3). La même approche, basée sur une chromatographie d'affinité à la trypsine, appliquée au foie, aurait *a priori* été moins efficace car le foie exprime de très nombreuses antiprotéases plasmatiques prédites pour se fixer sur une colonne d'affinité de type trypsine. Une fois les protéases et l'antiprotéase purifiées, il nous faudra vérifier si certains peptides identifiés par spectrométrie de masse sont présents dans le pro-peptide de

ces molécules. Ces données combinées au séquençage NH₂-terminal des protéines purifiées permettront d'analyser si les molécules ont été préalablement activées (élimination du propeptide ou non) ou si elles sont toujours sous la forme de précurseurs (cas de la « similar to nothepsin » par exemple), et ceci selon le tissu ou le milieu à partir duquel elles auront été isolées (la « similar to nothepsin » pourrait se trouver sous forme précurseur dans le foie, mais sous forme activée dans l'oocyte, par exemple).

Les deux protéases (« similar to nothepsin » et « similar to oviductin ») et l'antiprotéase (« similar to porin »), une fois purifiées, seront évaluées pour leur capacité protéolytique et inhibitrice, respectivement, en utilisant des tests cinétiques et des substrats chromogéniques. De nombreux substrats synthétiques et spécifiques de certaines protéases ou d'un certain groupe de protéases, ont été décrits dans la littérature. La base de données merops (<http://merops.sanger.ac.uk>) recense toutes les protéases et leurs spécificités d'action, et peut donc être d'une aide précieuse dans le choix des substrats. Pour caractériser l'activité inhibitrice des antiprotéases, la réalisation de tests cinétiques comme décrit dans l'article de l'ovoinhibiteur est à envisager (Article 3). Le choix des protéases cibles se fera en fonction de la nature de l'antiprotéase à tester.

Dans le cadre de notre approche ciblée sur les défenses antimicrobiennes de l'œuf, l'activité antimicrobienne de ces protéases et antiprotéases purifiées sera testée contre plusieurs souches bactériennes. Des tests antimicrobiens en milieu liquide, comme décrit dans l'article de l'ovoinhibiteur, pourraient être réalisés. La cinétique de cette activité pourra également être analysée en évaluant la croissance du pathogène en temps réel avant et après incubation avec la molécule purifiée, dans des microplaques à l'aide du Bioscreen (Van De Guchte *et al.*, 2001).

Pour la « similar to nothepsin », il sera pertinent d'analyser en parallèle son implication dans la maturation des précurseurs du jaune. Il s'agira d'incuber la « similar to nothepsin » activée avec les précurseurs du jaune (prélevés sur des oocytes en croissance) et d'analyser l'éventuelle apparition de produits de dégradation par SDS-PAGE par exemple. La comparaison du profil obtenu avec celui des protéines du jaune pondu permettra de statuer sur le rôle de cette protéase dans ce processus. Cette approche a en effet été utilisée avec succès pour confirmer le rôle de la cathepsine D dans la maturation des protéines du jaune d'œuf (Retzek *et al.*, 1992).

Pour la « similar to oviductin », présente dans la membrane vitelline, nous privilégierons des essais permettant de définir son rôle dans la fertilisation de l'oocyte (interaction spermatozoïde/oocyte), qui se produit dans l'oviducte au niveau de l'infundibulum.

Pour cette thèse, nous ne nous sommes intéressés qu'aux protéases et antiprotéases, afin de conduire une étude complète sur deux familles de protéines retrouvée dans de très nombreux processus physiologiques. Cependant, les 582 gènes surexprimés dans le foie des poules sexuellement matures et donc susceptibles d'être impliqués dans la formation du jaune d'œuf sont une mine d'informations pour mieux comprendre les grandes fonctions biologiques et cascades métaboliques qui régissent la formation du jaune d'œuf, le transfert des constituants du foie vers le jaune ou la membrane perivitelline et la maturation de ces constituants. 70% des gènes surexprimés sont connus. Un classement ontologique préliminaire réalisé avec le logiciel Genomatix (www.genomatix.de), et basé sur l'annotation « Gene Ontology », souligne les grandes fonctions biologiques associées aux gènes surexprimés par le foie à la maturité sexuelle de la poule (figure 14).

Un grand nombre de gènes (52) est assigné à des molécules à un tissu ou compartiment particulier (« localisation ») et 17 de ces gènes sont impliqués dans le transport des protéines (« protein transport »), ce qui est en accord avec le transfert de molécules du foie vers le jaune d'œuf. Dix huit gènes sont impliqués dans le métabolisme des lipides et trois dans leur biosynthèse, ce qui est cohérent avec la très forte stimulation de la synthèse lipidique du foie au moment de l'acquisition de la maturité sexuelle. Certains des gènes regroupés dans la « regulation of molecular function » sont en relation avec le catabolisme des protéines et donc l'activité protéolytique des protéases et leur régulation par les antiprotéases. L'analyse globale de l'ensemble des gènes surexprimés permettra de révéler l'ensemble des activités biologiques surreprésentées dans le foie au moment de la maturité sexuelle de la poule et de construire des réseaux moléculaires qui souligneront les principaux liens et interactions existant entre elles.

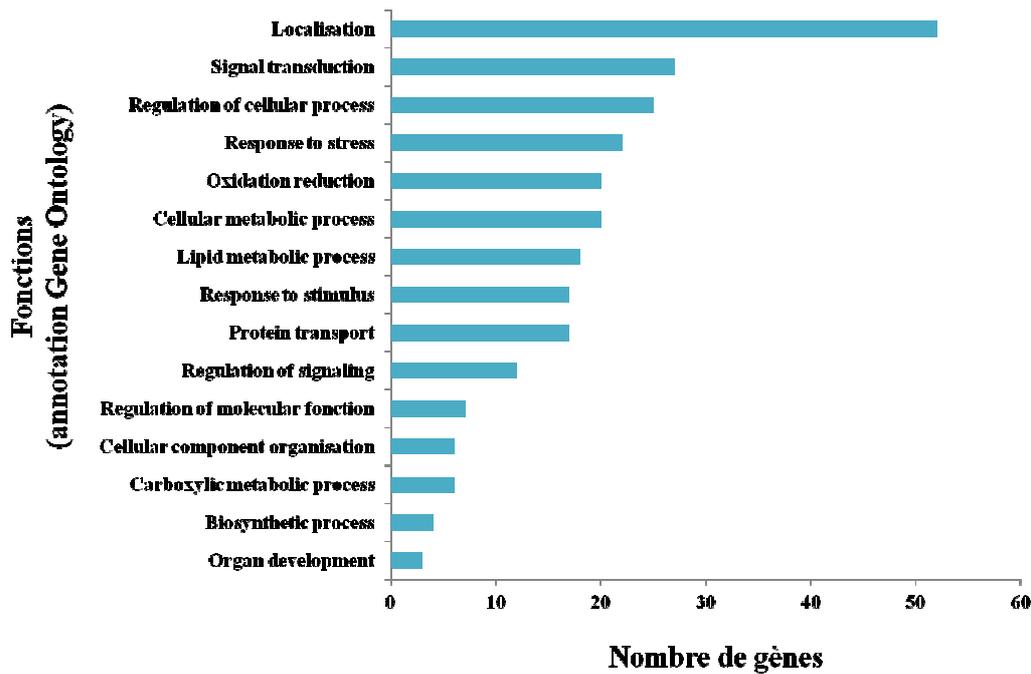


Figure 14: Annotation fonctionnelle des 582 gènes surexprimés dans le foie de poules sexuellement matures.

L'essentiel du travail sera d'intégrer l'ensemble de ces données pour les replacer dans le modèle *Gallus gallus* ou en lien avec la vitellogenèse. En effet, la plupart des outils utilisés pour réaliser ce type d'analyse intègre de nombreuses données issues des mammifères ou de l'homme, et incluent de nombreuses références à des pathologies types (cancers humains spécifiques par exemple). Le transfert de ses informations dans le contexte de la formation de l'œuf s'avère donc parfois difficile pour un modèle trop spécifique telle que l'ovogénèse (D'Alessandro *et al.*, 2010). Cependant, l'utilisation des données principalement d'origines humaine ou mammalienne ne devrait pas être problématique quand il s'agit de la synthèse lipidique ou protéique, car les analogies sont importantes entre espèces dans les voies métaboliques. Une difficulté supplémentaire réside dans le fait que 30% des gènes surexprimés sont soit inconnus (non caractérisés ou hypothétiques) soit prédits par homologie avec des protéines d'autres espèces (souvent mammaliennes), ce qui ne facilite pas leur annotation fonctionnelle. Ainsi, 12 des 15 protéases et des antiprotéases surexprimées sur la puce sont prédites par homologie et 3 sont hypothétiques (Tableau 5).

Les protéases et antiprotéases du jaune d'œuf identifiées par le biais des approches transcriptomique et protéomiques ont un rôle supposé dans la maturation des protéines du jaune grâce à leur activité fondamentale : la protéolyse (Davies, 1990, Barrett *et al.*, 2001). Dans la littérature, de nombreuses protéases et antiprotéases ont été décrites comme étant impliquées dans le remodelage et la croissance tissulaire, l'angiogenèse et l'apoptose, ce qui leur confère un rôle potentiel dans les remaniements folliculaires qui accompagnent la vitellogénèse et l'ovulation mais également le développement embryonnaire (Hooper, 1994, Otto *et al.*, 1997, Borkakoti, 1998, Turk *et al.*, 2001, Hedstrom, 2002, Sajid *et al.*, 2002, Woessner, 2002, Polgar, 2005).

Nous nous sommes donc intéressés à l'évolution des activités relatives aux protéines du jaune au cours du développement embryonnaire. Pour cela, les jaunes d'œufs embryonnés et non-embryonnés incubés 12 jours, à 37,8°C ont été prélevés (8 réplicats biologiques à J0, J4, J8 et J12 d'incubation). L'étude du profil protéique par gel électrophorétique SDS-PAGE a été réalisée sur la fraction plasmatique de ces jaunes d'œuf à J0, J4, J8, J12 d'incubation (figure 15).

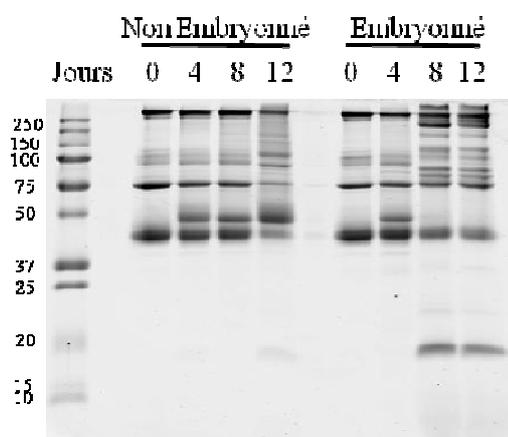


Figure 15 : Profil électrophorétique de la fraction plasmatique du jaune d'œuf sur des œufs Non Embryonnés et Embryonnés après 0, 4, 8 et 12 jours d'incubation. Les poids moléculaires sur la gauche sont en kDa.

Le profil protéique des œufs embryonnés après 12 jours d'incubation (J12) est très différent de celui réalisé à J0. Il semble que les protéines du jaune fassent l'objet d'un remaniement important, avec notamment une dégradation d'un certain nombre d'entre elles.

Des changements dans le profil protéique des fractions plasmatiques des jaunes d'œufs non embryonnés sont également visibles. Une analyse protéomique comparée a été initiée en collaboration avec l'équipe de Karlheinz Mann, qui est à l'origine des protéomes des différents compartiments de l'œuf (Mann *et al.*, 2006, Mann, 2007, 2008, Mann *et al.*, 2008). Cette analyse compare des protéines présentes dans les jaunes d'œufs fécondés à J0 et J12 d'incubation et évalue la cinétique d'utilisation de ces protéines par l'embryon. L'introduction d'une approche similaire sur un contrôle correspondant à des œufs non fécondés révélera l'effet de la présence d'un embryon sur l'évolution de la composition protéique du jaune (comparaison œufs embryonnés et non embryonnés à J12). Les analyses statistiques sont en cours. Cette approche nous permettra d'analyser la dynamique d'apparition et de disparition/dégradation des protéines du jaune au cours du développement embryonnaire (J12 versus J0 pour les œufs embryonnés) et d'autre part d'étudier l'évolution des protéines du jaune au cours du stockage en lien avec la perte de la qualité organoleptique et hygiénique de l'œuf au cours du stockage (J12 versus J0 pour les œufs non embryonnés) (Réhault-Godbert *et al.*, 2011).

L'exploration de la présence d'activités protéolytiques spécifiques, apparaissant ou disparaissant au cours du développement embryonnaire, sera conduite en appliquant aux jaunes d'œuf embryonnés la technique de zymographie en gel de gélatine. Cette technique consiste à incorporer un substrat protéique (gélatine, caséine) à des gels d'acrylamide/bis-acrylamide et à faire migrer les échantillons en conditions non réductrices, sans les dénaturer par la chaleur mais en conservant le SDS. Le gel est alors lavé dans différents bains en présence de Triton X-100 pour renaturer les protéines présentes dans le gel. Ce gel est ensuite incubé dans un tampon spécifique en fonction du type d'activité que l'on veut mettre en évidence (protéases à sérine, protéases à aspartate, protéases à cystéine, métalloprotéases). Les activités protéolytiques sont révélées sous forme de bandes claires sur fond bleu après coloration au bleu de Coomassie. L'avantage de cette technique est qu'elle active des précurseurs dont le site actif est bloqué par un propeptide. Par cette approche, nous obtenons des indications sur la spécificité enzymatique de ces protéases (en jouant sur différents tampons, l'activité de chaque famille de protéases étant dépendante du pH, ou de l'incorporation de calcium, agent réducteurs etc. dans le tampon) ainsi que sur le poids moléculaire apparent de ces molécules. En parallèle, la présence ou la disparition des protéases et antiprotéases au cours de l'incubation et du développement embryonnaire pourra

être analysée par western blot à l'aide d'anticorps spécifiques. Ceux ciblant la « similar to nothepsin » et l'ovoinhibiteur ont été produits mais non encore testés. Cette expérimentation démontrera si les protéases et antiprotéases du jaune d'œuf sont « utilisées » par l'embryon (activées puis dégradées ou assimilées) au cours de son développement.

V
CONCLUSION

L'approche globale nous a permis d'identifier 582 gènes surexprimés dans le foie des poules sexuellement matures et susceptibles d'être impliqués dans la formation du jaune d'œuf. La classification de ces gènes par grands types de fonction sera très informative pour analyser les voies métaboliques de la lipogenèse et de la synthèse protéique en lien notamment avec la formation du jaune d'œuf.

Dans le cadre précis de notre étude, nous nous sommes intéressés à un groupe de protéines retrouvées dans de très nombreux processus physiologiques : les protéases et antiprotéases. Quinze protéases et antiprotéases ont été identifiées dans notre modèle et au moins trois d'entre elles sont susceptibles de jouer un rôle majeur dans le jaune d'œuf (« similar to nothepsin » et « similar to porin ») ou dans la membrane vitelline (« similar to oviductin »). Parmi les autres candidats identifiés au cours de l'approche transcriptomique, plusieurs ne sont potentiellement pas déposés dans le jaune. Ces protéases pourraient néanmoins participer à la synthèse des constituants du jaune avant même leur transport vers le follicule en croissance et jouer un rôle dans le catabolisme hépatique pour réguler l'anabolisme protéique exacerbé de cet organe à la maturité sexuelle. Elles pourraient également intervenir dans le remaniement tissulaire qui accompagne la libération du follicule juste avant l'ovulation, même s'il est plus probable que cette action soit menée par les protéases et antiprotéases produites localement par les cellules de la granulosa. Le modèle d'étude que nous avons utilisé, foie de poules sexuellement matures versus foie de poules sexuellement immatures, a permis de dégager des candidats prédits pour avoir un rôle certain dans le jaune d'œuf et/ou la membrane vitelline. Il s'agira à l'avenir d'étudier plus précisément le mécanisme de leur internalisation dans l'oocyte, leur modification biochimiques éventuelles au cours du transfert vers le jaune et de développer des modèles d'étude pertinents pour étudier leur spécificité d'action (tissulaire, fonctionnelle) afin de replacer leurs activités dans leur contexte : la formation de l'œuf qui doit contenir l'ensemble des nutriments et systèmes biologiques et protecteurs nécessaires au développement de l'embryon.

Dans l'approche ciblée, nous avons étudié plus particulièrement un des candidats ressortant de l'approche globale : la « similar to nothepsin ». Cette protéase acide est très proche de la cathepsine D du poulet, connue pour avoir un rôle majeur dans la maturation des protéines du jaune. Notre étude a montré que l'expression de la « similar to nothepsin » est

spécifique du foie des poules matures et dépendante des stéroïdes sexuels. Ces données suggèrent que la « similar to nothepsin » est exprimée spécifiquement pour jouer un rôle dans la vitellogénèse, que ce soit pour activer les précurseurs du jaune ou pour dégrader les protéines endogènes afin de fournir les nutriments nécessaires à l'embryon. Cette protéase pourrait également jouer un rôle dans la défense antimicrobienne au niveau de l'ovaire ou au cours du développement embryonnaire en dégradant des protéines exogènes (microbiennes) à l'instar d'autres protéases acides que l'on retrouve notamment dans les lysosomes.

En parallèle, nous nous sommes aussi intéressés à l'ovoinhibiteur, une antiprotéase ubiquiste et majeure de l'œuf. L'évaluation de son potentiel antimicrobien a montré que l'ovoinhibiteur était actif contre *Bacillus*. L'ovoinhibiteur jouerait donc un rôle significatif dans la défense antimicrobienne de l'œuf.

L'ensemble de ce travail s'inscrit dans le projet de l'équipe, qui étudie la physiologie de la formation de l'œuf afin d'identifier des acteurs incontournables de ce processus tout en cherchant à caractériser les différentes activités biologiques de l'œuf. Dans un contexte de production nationale et européenne, où les œufs doivent être garants d'une qualité sanitaire optimale pour les consommateurs, l'un des objectifs majeur est de caractériser les systèmes de protection de l'œuf (coquille, molécules antimicrobiennes) afin de limiter les risques de toxico-infections alimentaires (salmonelloses). Par ailleurs, outre son intérêt comme source alimentaire équilibrée, l'œuf est connu pour renfermer une multitude de molécules d'activités variées (propriétés antiadhésives, immunomodulatrices, anti-hypertensives, anti-cancéreuses, anti-inflammatoires ou cryoprotectrices) qui représentent un potentiel considérable pour différents secteurs d'activités tels que l'agroalimentaire, la cosmétique ou la santé animale et humaine.

VI
LISTE DES PUBLICATIONS ET DES
COMMUNICATIONS

Publications

Bourin M., Gautron J., Berges M., Attucci S., Le Blay G., Labas V., Nys Y., Réhault-Godbert, S.. 2011. *Antimicrobial potential of egg yolk ovoidinhibitor, a multidomain Kazal-like inhibitor of chicken egg*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58:12368-12374

Bourin M., Gautron J., Berges M., Nys Y., Réhault-Godbert, S.. 2011. *Aspartic proteases of hen egg yolk : Sex and tissue-specific expression of “similar to nothepsin” and cathepsin D in relation to egg yolk formation in Gallus Gallus*

Article soumis au journal Poultry Science

Bourin M., Gautron J., Berges M., Hennequet-Antier C., Cabau C., Nys Y., Réhault-Godbert, S. 2011. *Transcriptomic profiling of proteases and antiproteases in the liver of sexually mature hens in relation to vitellogenesis*

Article en préparation

Communications à des congrès scientifiques

2011 :

Bourin, M.; Gautron, J.; Berges, M.; Labas, V.; Nys, Y.; Réhault-Godbert, S. 2011. *Hen egg ovoidinhibitor: Tissular expression and biological activities*. 14. European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products; Leipzig (GER); 2011/09/4-8, 8 p.

Bourin, M.; Gautron, J.; Berges, M. ; Hennequet-Antier, C., Cabau, C., Nys, Y.; Réhault-Godbert, S. 2011. *Transcriptomic profiling of hen hepatic genes reveals many egg yolk proteases and antiproteases potentially involved in chicken development*. 14. European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products; Leipzig (GER); 2011/09/4-8, 8 p.

2010 :

Bourin, M.; Gautron, J.; Berges, M.; Mills, M.; Nys, Y.; Réhault-Godbert, S.; 2010. *Investigation of the antimicrobial potential of hen egg ovoinhibitors*. 13. European Poultry Conference ; Tours (FRA) ; 2010/08/23-27, 4 p.

2009 :

Bourin, M.; Gautron, J.; Labas, V.; Nys, Y.; Réhault-Godbert, S.; 2009. *Etude fonctionnelle des antiprotéases du jaune d'oeuf*. 3èmes Journées d'Animation Scientifique du Département PHASE ; Tours (FRA) ; 2009/10/7-9, 150.

2008 :

Hervé-Grépinet, V.; Réhault-Godbert, S.; Labas, V.; Magallon, T.; **Bourin, M.;** Derache, C.; Lalmanach, A.C.; Gautron, J.; Nys, Y.; 2008. *Avian B-defensin 11 : identification, purification and characterization*. 25ème Congrès de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique ; Tours (FRA) ; 2008/10/06-08; SFEAP, Tours (FRA).

Communications à des journées professionnelles

2011 :

Bourin, M.; Gautron, J.; Berges, M.; Labas, V.; Nys, Y.; Réhault-Godbert, S.; 2011. *Ovoinhibiteur : spécificité tissulaire et activités biologiques*. In : 9. Journées de la Recherche Avicole. Synthèses et textes résumés . 9. Journées de la Recherche Avicole ; Tours (FRA) ; 2011/03/29-30, 238 (texte intégral de 5 p. sur CD-Rom p 681-685); ITAVI.

2009 :

Hervé-Grépinet, V.; Réhault-Godbert, S.; Labas, V.; Magallon, T.; **Bourin, M.;** Derache, C.; Lalmanach, A.C.; Gautron, J.; Nys, Y.; 2009. *Identification, purification et caractérisation de la bêta-defensine aviaire 11 dans l'oeuf de poule*. 8èmes Journées de la Recherche Avicole ; St Malo (FRA) ; 2009/03/25-26, 134 (Résumé). CDRom : 000087.pdf, 473-476; ITAVI, Paris (FRA).

Autre

2011 :

Bourin, M.; 2011. *Protéases et antiprotéases du jaune d'oeuf : caractérisation fonctionnelle et biochimique*. Douzième Journée Thésards de l'Unité de Recherches Avicoles ; Nouzilly (FRA) ; 2011/05/09, p. 11; (Encadrement: Nys, Y.; Réhault-Godbert, S.).

2010 :

Bourin, M.; 2010. *Etude fonctionnelle des protéases et antiprotéases du jaune d'oeuf*. 11^{ème} journée thésards de l'URA ; 2010/04/26; (Encadrement: Nys, Y.; Réhault-Godbert, S.).

2009 :

Bourin, M.; 2009. *Etude fonctionnelle des protéases et antiprotéases du jaune d'oeuf*. 10^{ème} Journée des thésards ; Nouzilly (FRA) ; 2009/05/07; (Encadrement: Nys, Y.; Réhault-Godbert, S.).

Bourin, M., Nys, Y., Labas, V., Gautron, J., Rehault-Godbert, S. 2009. *Etude fonctionnelle des protéases et antiprotéases du jaune d'œuf*. Forum des Ecoles Doctorales Santé, Sciences et Technologies de Tours et Sciences et Technologies d'Orléans, à Tours (FRA)

Participation à des programmes de recherches

Type de contrats	Dates	Intitulés	Implication personnelle
ANR	2009-2013	OVO-Mining : Biochemical and functional characterization of novel antimicrobial egg molecules (Coordination Y. Nys, UR 83, Recherches avicoles, F-37380 Nouzilly, FR)	Participation in Work Packages 1 and 3

VII
INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales protéines du blanc d'œuf (Li-Chan <i>et al.</i> , 1989).	- 20 -
Tableau 2 : Composition du jaune d'œuf de poule (Powrie <i>et al.</i> , 1986).....	- 23 -
Tableau 3 : Liste des protéases identifiées dans le jaune d'œuf, d'après les études protéomiques de Mann <i>et al.</i> (Mann <i>et al.</i> , 2008) et Farinazzo <i>et al.</i> (Farinazzo <i>et al.</i> , 2009)	- 34 -
Tableau 4 : Liste des antiprotéases identifiées dans le jaune d'œuf, d'après les études protéomiques de Mann <i>et al.</i> (Mann <i>et al.</i> , 2008) et Farinazzo <i>et al.</i> (Farinazzo <i>et al.</i> , 2009)	- 42 -
Tableau 5 : Secrétome des protéases et antiprotéases surexprimées par le foie de poules pondeuses à la maturité sexuelle (SecretomeP v.2.0)	- 148 -

Liste des figures

Figure 1 : Représentation de l’ovaire et de l’oviducte de poule mature (Nys <i>et al.</i> , 2004).....	- 1 -
Figure 2 : Structure folliculaire avec thèques interne et externe (T), couche basale (CB), la <i>granulosa</i> (G); la couche acellulaire périvitelline (P) et les sphères constituant le jaune d’œuf (S) (Perry <i>et al.</i> , 1979)	- 14 -
Figure 3 : Phénomène d’endocytose avec internalisation de granules au niveau de l’oocyte (Perry <i>et al.</i> , 1979)	- 1 -
Figure 4 : Cinétique des dépôts et lieu de formation de l’œuf de poule (Sauveur <i>et al.</i> , 1988).....	- 1 -
Figure 5 : Représentation schématique de l’œuf pondu.	- 20 -
Figure 6 : Schéma de séparation et composition des fractions du jaune d’œuf.	- 24 -
Figure 7 : Représentation schématique des LDL du jaune d’œuf.....	- 1 -
Figure 8 : Représentation de l’interaction entre le substrat (peptide substrat) et la protéase (ici une protéase à cystéine présentant un groupement -SH) (Sajid <i>et al.</i> , 2002).....	- 33 -
Figure 9 : Triade catalytique de la chymotrypsine (Polgar, 2005).....	- 35 -
Figure 10 : Représentation schématique d’un domaine de type Kazal.	- 1 -
Figure 11 : Représentation schématique d’un domaine de type Kunitz.....	- 1 -
Figure 12 : Représentation schématique d’une serpine. Les hélices alpha et les feuilletts béta de la molécule sont indiqués par hA à hI et A-sheet à C-sheet, respectivement. RCL désigne la boucle inhibitrice (reactive site loop, en violet) interagissant avec la protéase cible par son résidu P1 (Silverman <i>et al.</i> , 2001).	- 1 -
Figure 13 : Illustration du mécanisme d’inhibition des protéases par l’alpha-2 macroglobuline.....	- 49 -
Figure 14 : Annotation fonctionnelle des 582 gènes surexprimés dans le foie de poules sexuellement matures.	- 154 -
Figure 15 : Profil électrophorétique de la fraction plasmatique du jaune d’œuf sur des œufs Non Embryonnés et Embryonnés après 0, 4, 8 et 12 jours d’incubation. Les poids moléculaires sur la gauche sont en kDa.....	- 155 -

Liste des annexes

Annexe 1 : Classification des protéases à sérine par clan.	- 193 -
Annexe 2 : Classification des métalloprotéases par clan.	- 194 -
Annexe 3 : Classification des protéases à cystéine par clan.	- 195 -
Annexe 4 : Classification des protéases acides par clan.	- 196 -
Annexe 5 : Classification des antiprotéases par famille.....	- 197 -

VIII
BIBLIOGRAPHIE

- Anton, M.** Composition and Extraction of Egg Components. In: R. HUOPALAHTI, R. LOPEZ-FANDINO, M. ANTON, AND R. SCHADE, editors., *Bioactive Egg Compounds*. New York. Springer, **2007**, 1-31.
- Anton, M. and G. Gandemer.** Composition, solubility and emulsifying properties of granules and plasma of egg yolk. *Journal of Food Science*. **1997**. 62 (3), 484-487.
- Bain, J. M. and J. M. Hall.** Observations on the Development and Structure of the Vitelline Membrane of the Hen's Egg: An Electron Microscope Study. *Australian Journal of Biological Sciences*. **1969**. 22 (3), 653-666.
- Bakst, M. R., G. Wishart, and J. P. Brillard.** Oviducal sperm selection, transport and storage in poultry. *Poultry Science*. **1994**. 5 117-143.
- Barrett, A. J., N. D. Rawlings, and E. A. O'Brien.** The MEROPS database as a protease information system. *Journal of Structural Biology*. **2001**. 134 (2-3), 95-102.
- Becerra, S. P., A. Sagasti, P. Spinella, and V. Notario.** Pigment epithelium-derived factor behaves like a noninhibitory serpin. Neurotrophic activity does not require the serpin reactive loop. *Journal of Biological Chemistry*. **1995**. 270 (43), 25992-25999.
- Benarafa, C. and E. Remold-O'Donnell.** The ovalbumin serpins revisited: perspective from the chicken genome of clade B serpin evolution in vertebrates. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*. **2005**. 102 (32), 11367-11372.
- Blankenvoorde, M. F. J., W. van't Hof, E. Walgreen-Weterings, T. J. M. van Steenberg, H. S. Brand, E. C. I. Veerman, and A. V. N. Amerongen.** Cystatin and cystatin-derived peptides have antibacterial activity against the pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Biological Chemistry*. **1998**. 379 (11), 1371-1375.
- Borkakoti, N.** Matrix metalloproteases: variations on a theme. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. **1998**. 70 (1), 73-94.

- Borrelli, L., R. De Stasio, S. Filosa, E. Parisi, M. Riggio, R. Scudiero, and F. Trinchella.** Evolutionary fate of duplicate genes encoding aspartic proteinases. Nothepsin case study. *Gene*. **2006**. 368 101-109.
- Borth, W.** Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *FASEB Journal*. **1992**. 6 (15), 3345-3353.
- Chapman, H. A., R. J. Riese, and G. P. Shi.** Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annual Review of Physiology*. **1997**. 59 63-88.
- Clark, I. A., T. E. Swingler, C. L. Sampieri, and D. R. Edwards.** The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **2008**. 40 (6-7), 1362-1378.
- D'Alessandro, A., P. G. Righetti, E. Fasoli, and L. Zolla.** The egg white and yolk interactomes as gleaned from extensive proteomic data. *Journal of Proteomics*. **2010**. 73 (5), 1028-1042.
- D'Ambrosio, C., S. Arena, A. Scaloni, L. Guerrier, E. Boschetti, M. E. Mendieta, A. Citterio, and P. G. Righetti.** Exploring the chicken egg white proteome with combinatorial peptide ligand libraries. *Journal of Proteome Research*. **2008**. 7 (8), 3461-3474.
- Davies, D. R.** The structure and function of the aspartic proteinases. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*. **1990**. 19 189-215.
- De Luca, V., G. Maria, G. De Mauro, G. Catara, V. Carginale, G. Ruggiero, A. Capasso, E. Parisi, S. Brier, J. R. Engen, and C. Capasso.** Aspartic proteinases in Antarctic fish. *Marine Genomics*. **2009**. 2 (1), 1-10.
- Etches, R. J.** *Reproduction in poultry*. Wallington, UK: CAB international, **1996**.

- Farinazzo, A., U. Restuccia, A. Bachi, L. Guerrier, F. Fortis, E. Boschetti, E. Rasoli, A. Citterio, and P. G. Righetti.** Chicken egg yolk cytoplasmic proteome, mined via combinatorial peptide ligand libraries. *Journal of Chromatography A*. **2009**. 1216 (8), 1241-1252.
- Foltmann, B.** Chymosin - a short review on fetal and neonatal gastric proteases. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. **1992**. 52 65-79.
- Frick, I. M., P. Akesson, H. Herwald, M. Morgelin, M. Malmsten, D. K. Nagler, and L. Bjorck.** The contact system--a novel branch of innate immunity generating antibacterial peptides. *EMBO Journal*. **2006**. 25 (23), 5569-5578.
- Gettins, P. G. W.** Serpin structure, mechanism, and function. *Chemical Reviews*. **2002**. 102 (12), 4751-4803.
- Gilbert, A. B.** *Egg albumen and its formation*. London: Academic Press, **1971**.
- Greengard, O., A. Sentenac, and N. Mendelsohn.** Phosvitin, the iron carrier of egg yolk. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1964**. 90 406-407.
- Guérin-Dubiard, C., M. Anton, J. Gautron, Y. Nys, and F. Nau.** Composition de l'oeuf. In: F. NAU, C. GUERIN-DUBIARD, F. BARON, AND J. L. THAPON, editors., *Science et technologie de l'oeuf*. Paris. Lavoisier, **2010**, 1-169.
- Guérin-Dubiard, C., M. Pasco, D. Molle, C. Desert, T. Croguennec, and F. Nau.** Proteomic analysis of hen egg white. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**. 54 (11), 3901-3910.
- Guioli, S. and R. Lovell-Badge.** PITX2 controls asymmetric gonadal development in both sexes of the chick and can rescue the degeneration of the right ovary. *Development*. **2007**. 134 (23), 4199-4208.
- Hedstrom, L.** Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*. **2002**. 102 (12), 4501-4523.

- Hooper, N. M.** Families of zinc metalloproteases. *FEBS Letters*. **1994**. 354 (1), 1-6.
- Jacobsen, L., M. Hermann, P. M. Vieira, W. J. Schneider, and J. Nimpf.** The chicken oocyte receptor for lipoprotein deposition recognizes alpha(2)-macroglobulin. *Journal of Biological Chemistry*. **1995**. 270 (12), 6468-6475.
- Jonchère, V.** *Identification de gènes et de protéines de l'utérus impliqués dans le transfert minéral, la calcification de la coquille et la protection antimicrobienne de l'oeuf de poule*. Santé, Sciences, Technologies. Francois Rabelais, Tours. **2010**.
- Jonchere, V., S. Rehaut-Godbert, C. Hennequet-Antier, C. Cabau, V. Sibut, L. A. Cogburn, Y. Nys, and J. Gautron.** Gene expression profiling to identify eggshell proteins involved in physical defense of the chicken egg. *BMC Genomics*. **2010**. 11.
- Kato, A., T. Kanemitsu, and K. Kobayashi.** Inhibitory activity of ovomacroglobulin for pepsin and rennin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1991**. 39 (1), 41-43.
- Kay, J. and B. M. Dunn.** Substrate-specificity and inhibitors of aspartic proteinases. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. **1992**. 52 23-30.
- Kazal, L. A., D. S. Spicer, and R. A. Brahinsky.** Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-anticoagulant protein from pancreas. *Journal of the American Chemical Society*. **1948**. 70 (9), 3034-3040.
- Kjalke, M., K. G. Welinder, and C. Koch.** Structural analysis of chicken factor B-like protease and comparison with mammalian complement proteins factor B and C2. *The Journal of Immunology*. **1993**. 151 (8), 4147-4152.
- Korant, B. D., J. Brzin, and V. Turk.** Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteases alters viral protein cleavages in infected human cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **1985**. 127 (3), 1072-1076.
- Kostka, V.** Chicken pepsin and the other avian aspartic proteinases. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. **1992**. 52 121-125.

- Kraut, J.** Serine proteases - structure and mechanism of catalysis. *Annual Review of Biochemistry*. **1977**. 46 331-358.
- Krem, M. M., T. Rose, and E. Di Cera.** Sequence determinants of function and evolution in serine proteases. *Trends in Cardiovascular Medicine*. **2000**. 10 (4), 171-176.
- Krowarsch, D., T. Cierpicki, F. Jelen, and J. Otlewski.** Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **2003**. 60 (11), 2427-2444.
- Kunitz, M.** Crystalline soybean trypsin inhibitor. *Journal of General Physiology*. **1946**. 29 149-154.
- Lalmanach, G., C. Naudin, F. Lecaille, and H. Fritz.** Kininogens: More than cysteine protease inhibitors and kinin precursors. *Biochimie*. **2010**. 92 (11), 1568-1579.
- Laskowski, M. and I. Kato.** Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review of Biochemistry*. **1980**. 49 593-626.
- Law, R. H. P., Q. W. Zhang, S. McGowan, A. M. Buckle, G. A. Silverman, W. Wong, C. J. Rosado, C. G. Langendorf, R. N. Pike, P. I. Bird, and J. C. Whisstock.** An overview of the serpin superfamily. *Genome Biology*. **2006**. 7 (5).
- Li-Chan, E. and S. Nakai.** Biochemical basis for the properties of egg white. *Critical Review of Poultry Biology*. **1989**. 2 21-58.
- Li, X. C., X. W. Wang, Z. H. Wang, X. F. Zhao, and J. X. Wang.** A three-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor exhibiting domain inhibitory and bacteriostatic activities from freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Developmental and Comparative Immunology*. **2009**. 33 (12), 1229-1238.
- Liu, W. H., G. E. Means, and R. E. Feeney.** The inhibitory properties of avian ovoidinhibitors against proteolytic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1971**. 229 (1), 176-185.

- Maclachlan, I., J. Nimpf, and W. J. Schneider.** Avian riboflavin binding-protein binds to lipoprotein receptors in association with vitellogenin. *Journal of Biological Chemistry*. **1994**. 269 (39), 24127-24132.
- Magdelaine, P., A. Braine, V. Gonnier, and M. P. Spiess.** Production et consommation des oeufs et des ovoproduits. In: F. NAU, C. GUERIN-DUBIARD, F. BARON, AND J. L. THAPON, editors., *Science et technologie de l'oeuf*. Paris. Lavoisier, **2010**, 1-36.
- Major, I. T. and C. P. Constabel.** Functional analysis of the Kunitz trypsin inhibitor family in poplar reveals biochemical diversity and multiplicity in defense against herbivores. *Plant Physiology*. **2008**. 146 (3), 888-903.
- Mann, K.** The chicken egg white proteome. *Proteomics*. **2007**. 7 (19), 3558-3568.
- Mann, K.** Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. *Proteomics*. **2008**. 8 (11), 2322-2332.
- Mann, K., B. Macek, and J. V. Olsen.** Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer. *Proteomics*. **2006**. 6 (13), 3801-3810.
- Mann, K. and M. Mann.** The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. *Proteomics*. **2008**. 8 (1), 178-191.
- Mares, M., B. Meloun, M. Pavlik, V. Kostka, and M. Baudys.** Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family. *FEBS Letters*. **1989**. 251 (1-2), 94-98.
- Massova, I., L. P. Kotra, R. Fridman, and S. Mobashery.** Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB Journal*. **1998**. 12 (12), 1075-1095.
- Merops.** August 2011 (Release 9.5). <http://merops.sanger.ac.uk/>

- Migliolo, L., A. S. de Oliveira, E. A. Santos, O. L. Franco, and M. P. de Sales.** Structural and mechanistic insights into a novel non-competitive Kunitz trypsin inhibitor from *Adenanthera pavonina* L. seeds with double activity toward serine- and cysteine-proteinases. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*. **2010**. 29 (2), 148-156.
- Miyagawa, S., R. Kamata, K. Matsumoto, R. Okamura, and H. Maeda.** Therapeutic intervention with chicken egg white ovomacroglobulin and a new quinolone on experimental *Pseudomonas keratitis*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. **1994**. 32 (8), 488-493.
- Miyazawa, K.** Hepatocyte growth factor activator (HGFA): a serine protease that links tissue injury to activation of hepatocyte growth factor. *FEBS Journal*. **2010**. 277 (10), 2208-2214.
- Moran, E. T.** Protein requirement, egg formation and the hens ovulatory cycle. *Journal of Nutrition*. **1987**. 117 (3), 612-618.
- Moreau, T.** Inhibiteurs protéiques et zymogènes: les deux armes essentielles du contrôle de la protéolyse. *Regard sur la Biochimie*. **1999**. 4 43-59.
- Morrison, S. L., M. S. Mohammed, L. A. Wims, R. Trinh, and R. Etches.** Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Molecular Immunology*. **2002**. 38 (8), 619-625.
- Nagase, H. and E. D. Harris, Jr.** Ovostatin: a novel proteinase inhibitor from chicken egg white. II. Mechanism of inhibition studied with collagenase and thermolysin. *Journal of Biological Chemistry*. **1983a**. 258 (12), 7490-7498.
- Nagase, H., E. D. Harris, Jr., J. F. Woessner, Jr., and K. Brew.** Ovostatin: a novel proteinase inhibitor from chicken egg white. I. Purification, physicochemical properties, and tissue distribution of ovostatin. *Journal of Biological Chemistry*. **1983b**. 258 (12), 7481-7489.
- Nagase, H. and J. F. Woessner.** Matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*. **1999**. 274 (31), 21491-21494.

- Nickel, W.** Pathways of unconventional protein secretion. *Current Opinion in Biotechnology*. **2010**. 21 (5), 621-626.
- Nirmala, X., D. Kodrik, M. Zurovec, and F. Sehnal.** Insect silk contains both a Kunitz-type and a unique Kazal-type proteinase inhibitor. *European Journal of Biochemistry*. **2001**. 268 (7), 2064-2073.
- Nordahl, E. A., V. Rydengard, M. Morgelin, and A. Schmidtchen.** Domain 5 of high molecular weight kininogen is antibacterial. *Journal of Biological Chemistry*. **2005**. 280 (41), 34832-34839.
- Nys, Y.** Structure et formation de l'oeuf. In: F. NAU, C. GUERIN-DUBIARD, F. BARON, AND J. L. THAPON, editors., *Science et technologie de l'oeuf*. Paris. Lavoisier, **2010**, 161-237.
- Nys, Y. and N. Guyot.** Egg Formation and Chemistry. In: Y. NYS, M. BAIN, AND F. VAN HIMMERSEEL, editors., *Improving the Safety and Quality of Egg and Egg Products*. Cambridge, UK. Woodhead Publishing, **2011**, 83-132.
- Nys, Y. and B. Sauveur.** The nutritional value of eggs. *Productions Animales*. **2004**. 17 (5), 385-393.
- Ochieng, J. and G. Chaudhuri.** Cystatin Superfamily. *Journal of Health Care for the Poor and Underserved*. **2010**. 21 (1), 51-70.
- Otto, H. H. and T. Schirmeister.** Cysteine proteases and their inhibitors. *Chemical Reviews*. **1997**. 97 (1), 133-171.
- Page, M. J. and E. Di Cera.** Serine peptidases: Classification, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **2008**. 65 (7-8), 1220-1236.
- Perry, M. M. and A. B. Gilbert.** Yolk transport in the ovarian follicle of the hen (*Gallus domesticus*): lipoprotein-like particles at the periphery of the oocyte in the rapid growth phase. *Journal of Cell Science*. **1979**. 39 257-272.

- Polgar, L.** The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **2005**. 62 (19-20), 2161-2172.
- Potempa, J., E. Korzus, and J. Travis.** The serpin superfamily of proteinase-inhibitors - structure, function, and regulation. *Journal of Biological Chemistry*. **1994**. 269 (23), 15957-15960.
- Powrie, W. D. and S. Nakai.** The chemistry of egg and egg products. In: W. J. STADELMAN AND O. J. COTTERIL, editors., *Egg Science and Technology*. Wesport. AVI Publishing Co, **1986**, 97-139.
- Quesada, V., A. Diaz-Perales, A. Gutierrez-Fernandez, C. Garabaya, S. Cal, and C. Lopez-Otin.** Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2004**. 314 (1), 54-62.
- Rau, J. C., L. M. Beaulieu, J. A. Huntington, and F. C. Church.** Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **2007**. 5 Suppl 1 102-115.
- Rawlings, N. D. and A. J. Barrett.** Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*. **1993**. 290 205-218.
- Rawlings, N. D. and A. J. Barrett.** MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*. **1999**. 27 (1), 325-331.
- Rawlings, N. D., D. P. Tolle, and A. J. Barrett.** Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal*. **2004a**. 378 705-716.
- Rawlings, N. D., D. P. Tolle, and A. J. Barrett.** MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*. **2004b**. 32 D160-D164.

- Réhault-Godbert, S., V. Hervé-Grépinet, J. Gautron, C. Cabau, and M. Hincke.** Molecules Involved in Chemical Defence of the Chicken Egg. In: Y. NYS, M. BAIN, AND F. VAN HIMMERSEEL, editors., *Improving the Safety and Quality of Egg and Egg Products*. Cambridge, UK. Woodhead Publishing, **2011**, 83-132.
- Réhault, S., M. Anton, F. Nau, J. Gautron, and Y. Nys.** Biological activities of the egg. *Productions Animales*. **2007**. 20 (4), 337-347.
- Retzek, H., E. Steyrer, E. J. Sanders, J. Nimpf, and W. J. Schneider.** Molecular cloning and functional characterization of chicken cathepsin D, a key enzyme for yolk formation. *DNA and Cell Biology*. **1992**. 11 (9), 661-672.
- Riggio, M., R. Scudiero, S. Filosa, and E. Parisi.** Sex- and tissue-specific expression of aspartic proteinases in *Danio rerio* (zebrafish). *Gene*. **2000**. 260 (1-2), 67-75.
- Rimphanitchayakit, V. and A. Tassanakajon.** Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors. *Developmental and Comparative Immunology*. **2010**. 34 (4), 377-386.
- Saito, N. and K. Shimada.** Ovarian prostaglandin levels at the midsequence oviposition, the terminal oviposition and the first ovulation of a sequence in the hen *Gallus domesticus*. *Japanese Poultry Science*. **1988**. 25 (5), 296-304.
- Sajid, M. and J. H. McKerrow.** Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **2002**. 120 (1), 1-21.
- Sauveur, B. and M. Reviere.** *Reproduction des volailles et production d'oeufs*. Institut national de la recherche agronomique, **1988**.
- Schade, R.** Use of eggs for human/animal health and biotechnology. In: R. HUOPALAHTI, R. LOPEZ-FANDINO, M. ANTON, AND R. SCHADE, editors., *Bioactive egg compounds*, . Berlin Germany). Springer-Verlag **2007**, 191-240.
- Schechter, I. and A. Berger.** On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **1967**. 27 (2), 157-162.

- Schneider, W. J.** Receptor-mediated mechanisms in ovarian follicle and oocyte development. *Gen Comp Endocrinol.* **2009.** 163 (1-2), 18-23.
- Schneider, W. J., R. Carroll, D. L. Severson, and J. Nimpf.** Apolipoprotein VLDL-II inhibits lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins in the laying hen. *Journal of Lipid Research.* **1990.** 31 (3), 507-513.
- Seife, C.** Blunting nature's Swiss army knife. *Science.* **1997.** 277 (5332), 1602-1603.
- Serveau, C., G. Lalmanach, M. A. Juliano, J. Scharfstein, L. Juliano, and F. Gauthier.** Investigation of the substrate specificity of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, through the use of cystatin-derived substrates and inhibitors. *Biochemical Journal.* **1996.** 313 (Pt 3) 951-956.
- Shen, H. B. and K. C. Chou.** Identification of proteases and their types. *Analytical Biochemistry.* **2009.** 385 (1), 153-160.
- Shigetomi, H., A. Onogi, H. Kajiwara, S. Yoshida, N. Furukawa, S. Haruta, Y. Tanase, S. Kanayama, T. Noguchi, Y. Yamada, H. Oi, and H. Kobayashi.** Anti-inflammatory actions of serine protease inhibitors containing the Kunitz domain. *Inflammation Research.* **2010.** 59 (9), 679-687.
- Silverman, G. A., P. I. Bird, R. W. Carrell, F. C. Church, P. B. Coughlin, P. G. Gettins, J. A. Irving, D. A. Lomas, C. J. Luke, R. W. Moyer, P. A. Pemberton, E. Remold-O'Donnell, G. S. Salvesen, J. Travis, and J. C. Whisstock.** The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *Journal of Biological Chemistry.* **2001.** 276 (36), 33293-33296.
- Sim, R. B. and A. Laich.** Serine proteases of the complement system. *Biochemical Society Transactions.* **2000.** 28 (5), 545-550.

Subramanian, P., S. E. Crawford, and S. P. Becerra. Assays for the antiangiogenic and neurotrophic serpin pigment epithelium-derived factor In: J. C. WHISSTOCK AND P. I. BIRD, editors., *Methods in Enzymology: Biology of Serpins*, **2011**, 183-204.

Szecs, P. B. The aspartic proteases. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. **1992**. 52 5-22.

Takeuchi, Y., K. Nishimura, N. Aoki, T. Adachi, C. Sato, K. Kitajima, and T. Matsuda. 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. *European Journal of Biochemistry*. **1999**. 260 (3), 736-742.

Tallant, C., A. Marrero, and F. X. Gomis-Ruth. Matrix metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. **2010**. 1803 (1), 20-28.

Tanaka, T. and E. Ichishima. Substrate specificity of aminopeptidase Ey from hen's (*Gallus domesticus*) egg yolk. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry*. **1993**. 105 (1), 105-110.

Travis, J. and G. S. Salvesen. Human-plasma proteinase-inhibitors. *Annual Review of Biochemistry*. **1983**. 52 655-709.

Turk, B., D. Turk, and G. S. Salvesen. Regulating cysteine protease activity: Essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Current Pharmaceutical Design*. **2002**. 8 (18), 1623-1637.

Turk, V., B. Turk, and D. Turk. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO Journal*. **2001**. 20 (17), 4629-4633.

Van De Guchte, M., S. D. Ehrlich, and E. Maguin. Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *Journal of Applied Microbiology*. **2001**. 91 (1), 147-153.

- Walsh, P. N. and S. S. Ahmad.** Proteases in blood clotting. *Essays in Biochemistry*. **2002**. 38 95-111.
- Wang, W., M. B. Boffa, L. Bajzar, J. B. Walker, and M. E. Nesheim.** A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*. **1998**. 273 (42), 27176-27181.
- Woessner, J. F.** MMPs and TIMPs - An historical perspective. *Molecular Biotechnology*. **2002**. 22 (1), 33-49.
- Yadgary, L., R. Yair, and Z. Uni.** The chick embryo yolk sac membrane expresses nutrient transporter and digestive enzyme genes. *Poultry Science*. **2011**. 90 (2), 410-416.
- Yamashita, K., J. P. Kamerling, and A. Kobata.** Structural studies of the sugar chains of hen ovomucoid. Evidence indicating that they are formed mainly by the alternate biosynthetic pathway of asparagine-linked sugar chains. *Journal of Biological Chemistry*. **1983**. 258 (5), 3099-3106.

Annexes

Annexe 1 : Classification des protéases à sérine par clan.

Les informations suivantes proviennent de la base de données MEROPS release 9.5 (<http://merops.iaps.bbsrc.ac.uk/>). B, Bactérie ; P, Protozoaire ; C, Champignons ; Pl, Plante ; A, Animal et V, Virus.

Clans	Nombre de protéases identifiées	Exemple	Site catalytique	Type	Distributio
PA (Ser)	712	Chymotrypsin A	His, Asp, Ser	Endopeptidase	B, P, C, Pl, A, V
SB	182	Subtilisin	Asp, His, Ser	Endopeptidase, exopeptidase	B, P, C, Pl, A, V
SC	441	Serine carboxypeptidase D	Ser, Asp, His	Endopeptidase, exopeptidase	B, P, C, Pl, A, V
SF	40	D-Ala-D-Ala carboxypeptidase B	Ser, Lys	Endopeptidase, exopeptidase	B, P, C, Pl, A, V
SH	6	Cytomegalovirus assemblin	His, Ser, His	Endopeptidase	V
SJ	23	Lon-A peptidase	Ser, Lys	Endopeptidase	B, P, C, Pl, A, V
SK	43	Peptidase Clp	Ser, His, Asp	Endopeptidase	B, P, C, Pl, A, V
SP	5	Nucleoporin 145	His, Ser	Endopeptidase	P, C, Pl, A
SQ	1	Dmpa aminopeptidase	Ser	Aminopeptidase	B, P, C, Pl
SR	11	Lactoferrin	Lys, Ser	Endopeptidase	Pl, A
SS	3	Murein tetrapeptidase	Ser, Glu, His	Carboxypeptidase	B, P, Pl, A
ST	43	Rhomboid-1	Ser, his	Endopeptidase	B, P, C, Pl, A
PB (Ser)	3	penicillin G acylase precursor	Ser	Endopeptidase	B,P,Pl

Annexe 2 : Classification des métalloprotéases par clan.

Les informations suivantes proviennent de la base de données MEROPS release 9.5 (<http://merops.iaps.bbsrc.ac.uk/>). B, Bactérie ; P, Protozoaire ; C, Champignons ; Pl, Plante ; A, Animal et V, Virus.

Clan	Nombre de protéases identifiées	Exemple	Site catalytique	Type	Distribution
MA	544	Thermolysin	His-Glu-Xaa-Xaa-His	Endopeptidase	B, P, C, Pl, A, V
MC	68	Carboxypeptidase A1	His-Xaa-Xaa-Glu	Carboxypeptidase	B, P, C, Pl, A
MD	14	Murein endopeptidase	His, Asp and His	Carboxypeptidase	B, P, Pl, A, V
ME	20	Pitriysin	His-Xaa-Xaa-Glu-His	Endopeptidase	B, P, C, Pl, A, V
MF	16	Leucyl aminopeptidase	Lys, Asp, Asp, Asp, Glu	Aminopeptidases	B, P, C, Pl, A
MG	28	Methionyl aminopeptidase 1	Asp, Asp, His, Glu, Glu	Metalloexopeptidases	B, P, C, Pl, A
MH	97	Methionyl aminopeptidase 1	His (or Asp), Asp, Glu, Asp (or Glu), His	Zinc-dependent exopeptidases	B, P, C, Pl, A
MJ	26	Isoaspartyl dipeptidase	His, Asp/His, Glu/Lys, His, His	Dipeptidases	B, P, C, Pl, A
MK	9	O-sialoglycoprotein peptidase	His, His	Metalloendopeptidases	B, P, C, Pl, A, V
MM	11	S2P peptidase	His-Glu-Xaa-Xaa-His	Metalloendopeptidases	B, P, C, Pl, A
MN	1	D-aminopeptidase dppa	Asp, Glu, His, His, Glu	Aminopeptidase	B
MO	10	Beta-lytic metallopeptidase	His-(Xaa) ₃ -Asp and His-Xaa-His	Endopeptidase	B, C, Pl, A, V
MP	27	Poh1 peptidase	His-Ser-His-Pro-(Xaa) ₉ -Asp	Isopeptidases	B, P, C, Pl, A, V
MQ	4	Aminopeptidase T	Glu, Glu, His, His, Asp	Aminopeptidases	B, Pl

Annexe 3 : Classification des protéases à cystéine par clan.

Les informations suivantes proviennent de la base de données MEROPS release 9.5 (<http://merops.iaps.bbsrc.ac.uk/>). B, Bactérie ; P, Protozoaire ; C, Champignons ; Pl, Plante ; A, Animal et V, Virus.

Clan	Nombre de protéases identifiées	Exemple	Site catalytique	Type	Distribution
CA	351	Papain	Cys, His, Asn (or Asp)	Endopeptidase et exopeptidase	B, P, C, Pl, A, V
CD	79	Caspase	His, Cys	Endopeptidase	B, P, C, Pl, A, V
CE	61	Adenain	His, Asp (or Asn), Gln and Cys	Endopeptidase	B, P, C, Pl, A, V
CF	8	Pyroglutamyl-peptidase I	Glu, Cys, His	Exopeptidase	B, P, C, Pl, A
CL	15	Sortase A	His, Cys	-	B
CM	1	Hepatitis C virus peptidase 2	His, Glu, Cys	Endopeptidase	V
CN	2	Sindbis virus-type nsp2 peptidase	Cys, His	Endopeptidase	V
CO	14	Dipeptidyl-peptidase VI	Cys, His, His	Exopeptidase	B, P, C, Pl, A, V
PA (Cys)	42	Poliovirus-type picornain 3C	His, Asp, Cys	Endopeptidase	V
PB (Cys)	27	Peniciline	Cys	Endopeptidase	B, P, C, Pl, A, V

Annexe 4 : Classification des protéases acides par clan.

Les informations suivantes proviennent de la base de données MEROPS release 9.5 (<http://merops.iaps.bbsrc.ac.uk/>). B, Bactérie ; P, Protozoaire ; C, Champignons ; Pl, Plante ; A, Animal et V, Virus.

Clan	Nombre de protéases identifiées	Exemple	Site catalytique	Type	Bacterie
AA	244	Pepsin	Asp	Endopeptidases	B, P, C, Pl, A, V
AC	1	Bacterial signal peptidase II	Asp	Endopeptidases	B, Pl,
AD	38	Presenilin 1	Asp	Endopeptidases	B, P, C, Pl, A
AE	7	Gpr peptidase	Asp, Asp, His	Endopeptidases	B
AF	6	Omptine	Asp, Asp, Asp, His	Endopeptidases	B

Annexe 5 : Classification des antiprotéases par famille.

Les informations suivantes proviennent de la base de données MEROPS release 9.5 (<http://merops.iaps.bbsrc.ac.uk/>).

Famille	Type d'inhibiteur	Familles de protéases inhibées
I1	Kazal -Ovomucoid inhibitor unit 3 (<i>Meleagris gallopavo</i>)	Sérine (S1, S8)
I2	Kunitz (animal)-Aprotinin (<i>Bos taurus</i>)	Sérine (S1)
I3 (A)	Kunitz (plante)-Soybean Kunitz trypsin inhibitor (<i>Glycine max</i>)	Sérine (S1), Cystéine (C1), Acide (A1)
I3 (B)	Kunitz (plante)-Proteinase inhibitor B (<i>Sagittaria sagittifolia</i>)	Sérine (S1), Cystéine (C1), Acide (A1)
I4	Serpines -Alpha-1-peptidase inhibitor (<i>Homo sapiens</i>)	Sérine (S1, S8), Cystéine (C1, C14)
I5	Ascidian trypsin inhibitor (<i>Halocynthia roretzi</i>)	Sérine (S1)
I6	Ragi seed trypsin/alpha-amylase inhibitor (<i>Eleusine coracana</i>)	Sérine (S1)
I7	Trypsin inhibitor MCTI-1 (<i>Momordica charantia</i>)	Sérine (S1)
I8	Chymotrypsin/elastase inhibitor (<i>Ascaris suum</i>)	Sérine (S1), Métalloprotéase (M4)
I9	Peptidase B inhibitor (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Sérine (S8)
I10	Marinostatin (<i>Alteromonas sp.</i>)	Sérine (S1)
I11	Ecotin (<i>Escherichia coli</i>)	Sérine (S1)
I12	Bowman-Birk - Bowman-Birk inhibitor unit 1 (<i>Glycine max</i>)	Sérine (S1, S3)
I13	Eglin c (<i>Hirudo medicinalis</i>)	Sérine (S1)
I14	Hirudin (<i>Hirudo medicinalis</i>)	Sérine (S1)
I15	Antistasin inhibitor unit 1 (<i>Haementeria officinalis</i>)	Sérine (S1)
I16	Streptomyces subtilisin inhibitor (<i>Streptomyces albogriseolus</i>)	Sérine (S8, S1), Métalloprotéase (M4)
I17	Secretory leukocyte peptidase inhibitor domain 2 (<i>Homo sapiens</i>)	Sérine (S1)
I18	Mustard trypsin inhibitor-2 (<i>Sinapis alba</i>)	Sérine (S1)
I19	Peptidase inhibitor LMPI inhibitor unit 1 (<i>Locusta migratoria</i>)	Sérine (S1)
I20	Potato peptidase inhibitor II inhibitor unit 1 (<i>Solanum tuberosum</i>)	Sérine (S1, S8)
I21	Secretogranin V (<i>Homo sapiens</i>)	Sérine (S8)
I24	Pina Lon peptidase inhibitor (<i>Enterobacteria phage T4</i>)	Sérine (S16)
I25 (A)	Cystatine 1 - Cystatin A (<i>Homo sapiens</i>)	Cystéine (C1)
I25 (B)	Cystatine 2 - Ovocystatin (<i>Gallus gallus</i>)	Cystéine (C1, C13)
I25 (C)	Cystatine 3 - Metallopeptidase inhibitor (<i>Bothrops jararaca</i>)	Sérine (S8), Métalloprotéase (M12)
I27	Calpastatin inhibitor unit 1 (<i>Homo sapiens</i>)	Cystéine (C2)
I29	Cytotoxic T-lymphocyte antigen-2 alpha (<i>Mus musculus</i>)	Cystéine (C1)
I31	Equistatin inhibitor unit 1 (<i>Actinia equina</i>)	Cystéine (C1)
I32	Survivin (<i>Homo sapiens</i>)	Acide (A1)
I33	Aspin (<i>Ascaris suum</i>)	Acide (A1)
I34	Saccharopepsin inhibitor (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Acide (A1)
I35	Timp - Timp-1 (<i>Homo sapiens</i>)	Métalloprotéase (M10, M12)
I36	Streptomyces metallopeptidase inhibitor (<i>Streptomyces nigrescens</i>)	Métalloprotéase (M4)
I37	Potato metallo-carboxypeptidase inhibitor (<i>Solanum tuberosum</i>)	Métalloprotéase (M14)
I38	Metallopeptidase inhibitor (<i>Erwinia chrysanthemi</i>)	Métalloprotéase (M10, M4)
I39	α2M - Alpha-2-macroglobulin (<i>Homo sapiens</i>)	Sérine, Cystéine, Acides, Métalloprotéases
I40	Bombyx subtilisin inhibitor (<i>Bombyx mori</i>)	Sérine (S8)
I42	Chagasin (<i>Leishmania major</i>)	Cystéine (C1)

I43	Oprin (<i>Didelphis marsupialis</i>)	Métalloprotéase (M12)
I44	Metallocoxypeptidase A inhibitor (<i>Ascaris suum</i>)	Métalloprotéase (M14)
I46	Leech metallocoxypeptidase inhibitor (<i>Hirudo medicinalis</i>)	Métalloprotéase (M14), Acide (A1)
I47	Latexin (<i>Homo sapiens</i>)	Métalloprotéase (M14)
I48	Clitocypin (<i>Lepista nebularis</i>)	Cystéine (C1), Sérine (S1), Acide (A1)
I49	Prosaas (<i>Homo sapiens</i>)	Sérine (S8)
I50 (A)	Baculovirus P35 caspase inhibitor (<i>Spodoptera litura nucleopolyhedrovirus</i>)	Cystéine (C14)
I50 (B)	P35 homologue (<i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i>)	Cystéine (C14)
I51	Serine coxypeptidase Y inhibitor (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Sérine (S1)
I52	Tick anticoagulant peptide (<i>Ornithodoros moubata</i>)	Sérine (S1)
I53	Madanin 1 (<i>Haemaphysalis longicornis</i>)	Sérine (Thrombine)
I57	Staphostatin B (<i>Staphylococcus aureus</i>)	Cystéine (C47)
I58	Staphostatin A (<i>Staphylococcus aureus</i>)	Cystéine (Staphopaine A)
I59	Triabin (<i>Triatoma pallidipennis</i>)	Sérine (Thrombine)
I63	Pro-eosinophil major basic protein (<i>Homo sapiens</i>)	Métalloprotéase (Pappalysine-1)
I64	Thrombostasin (<i>Haematobia irritans</i>)	Sérine (Thrombine)
I66	Lentinus peptidase inhibitor (<i>Lentinula edodes</i>)	-
I67	Bromein (<i>Ananas comosus</i>)	Sérine (S1)
I68	Tick coxypeptidase inhibitor (<i>Rhipicephalus bursa</i>)	Métalloprotéase (M14)
I69	Streptopain inhibitor (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	Cystéine (Streptopaine)
I71	Falstatin (<i>Plasmodium falciparum</i>)	Cystéine (C1, C2)
I72	Chimadanin (<i>Haemaphysalis longicornis</i>)	Sérine (Thrombine)
I73	“Veronica” trypsin inhibitor (<i>Veronica hederifolia</i>)	Sérine (Trypsine)
I74	Variégin (<i>Amblyomma variegatum</i>)	Sérine (Thrombine)
I75	Bacteriophage lambda CIII protein (<i>bacteriophage lambda</i>)	Métalloprotéase (FtsH peptidase)
I76	Thrombin inhibitor (<i>Glossina morsitans</i>)	Sérine (Thrombine)
I77	Anophelin (<i>Anopheles albimanus</i>)	Sérine (Thrombine)
I78	Aspergillus elastase inhibitor (<i>Aspergillus fumigatus</i>)	Sérine (Oryzin et elastase 2)
I79	AVR2 protein (<i>Passalora fulva</i>)	Cystéine (C1)
I81	Toxostatin-1 (<i>Toxoplasma gondii</i>)	Cystéine (C1)
I83	Amfpi-1 (<i>Antheraea mylitta</i>)	Sérine (S8, S1)
I84	Cvsi-2 (<i>Crassostrea virginica</i>)	Sérine (S8, S1)
I85	Macrocy-pin 1 (<i>Macrolepiota procera</i>)	Cystéine (C1), Sérine (S1)
I87	Hflc (<i>Escherichia coli</i>)	-
I88	Oryctin (<i>Oryctes rhinoceros</i>)	Sérine (S1, S8)
I90	Trypsin inhibitor (<i>Mirabilis jalapa</i>)	-

Marie BOURIN

**Caractérisation fonctionnelle et biochimique
des protéases et antiprotéases présentes dans le
jaune d'œuf « *Gallus gallus* ».**



Résumé

Le jaune d'œuf est une source de nutriments et de molécules bioactives pour l'embryon. Il renferme de nombreuses protéases et antiprotéases, dont la fonction reste méconnue. Notre objectif était d'identifier et de caractériser les protéases/antiprotéases associées spécifiquement à la formation du jaune d'œuf (vitellogenèse). Les précurseurs du jaune sont exprimés par le foie à la maturité sexuelle des poules. Par une approche transcriptomique, nous avons identifié 582 gènes, dont 15 protéases et antiprotéases, surexprimés par le foie des poules sexuellement matures. Au moins trois d'entre elles sont présentes dans le jaune ou la membrane vitelline. Nous avons montré que l'expression de la « similar to nothepsin », une protéase prédite de fonction inconnue, était spécifique du foie des femelles et pourrait participer à la maturation des précurseurs du jaune. D'autre part, nous avons démontré que l'ovoinhibiteur, une antiprotéase du jaune, aurait un rôle dans la défense antimicrobienne de l'œuf. L'intégration de l'ensemble de ces résultats fournira des données essentielles relatives à la vitellogenèse et à la fonction des protéases/antiprotéases dans le jaune d'œuf.

Mots Clés : Œuf de poule, Jaune d'œuf, Protéases, Antiprotéases, Similar to Nothepsin, Ovoinhibiteur, Puce à oligonucléotides, Physiologie.

Résumé en anglais

The egg yolk The egg yolk is a source of nutrients and bioactive molecules for the embryo, including many proteases/antiproteases, the function of which is still unknown. Our objective was to identify and characterize proteases/ antiproteases that are specifically associated with the formation of the yolk (vitellogenesis). Yolk precursors are synthesized by the liver at sexual maturity of hens. Using a transcriptomic approach, we identified 582 genes, including 15 proteases and antiproteases that are over-expressed by the liver at sexual maturity of hens. At least three of them are recovered in the egg yolk or the vitelline membrane. We have shown that the expression of "similar to nothepsin" was specific to the liver of females. This protease could participate in the processing of yolk precursors. We have also demonstrated that egg yolk ovoinhibitor is antimicrobial and could therefore participate in egg defense. The integration of all these results will provide major data relative to vitellogenesis and to the function of proteases/antiproteases in the egg yolk.

Keywords: Hen's egg, Egg yolk, Proteases, Antiproteases, Similar to Nothepsin, Ovoinhibitor, Oligoarray, Physiology.