

formation et évolution des structures de l'œuf de poule, de la ponte à l'éclosion

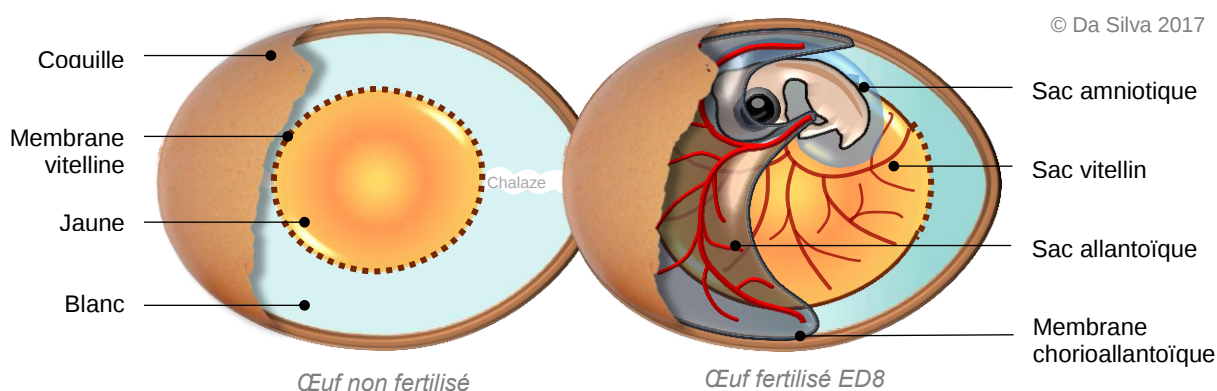


Figure 1 : Représentation des différentes structures basiques et extra-embryonnaires de l'œuf de poule non fertilisé (à gauche) ou fertilisé (à droite ; 8^{ème} jour d'incubation ou ED8)

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

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

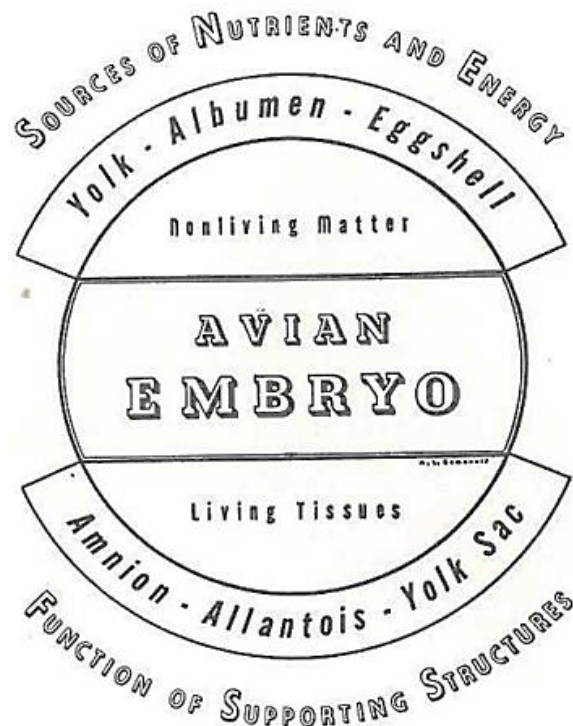


Figure 2 : Schéma illustrant les différents rôles des structures basiques et extra-embryonnaires de l'œuf au cours du développement embryonnaire chez l'oiseau (Romanoff et Romanoff, 1967).

1 - Les structures primaires de l'œuf

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

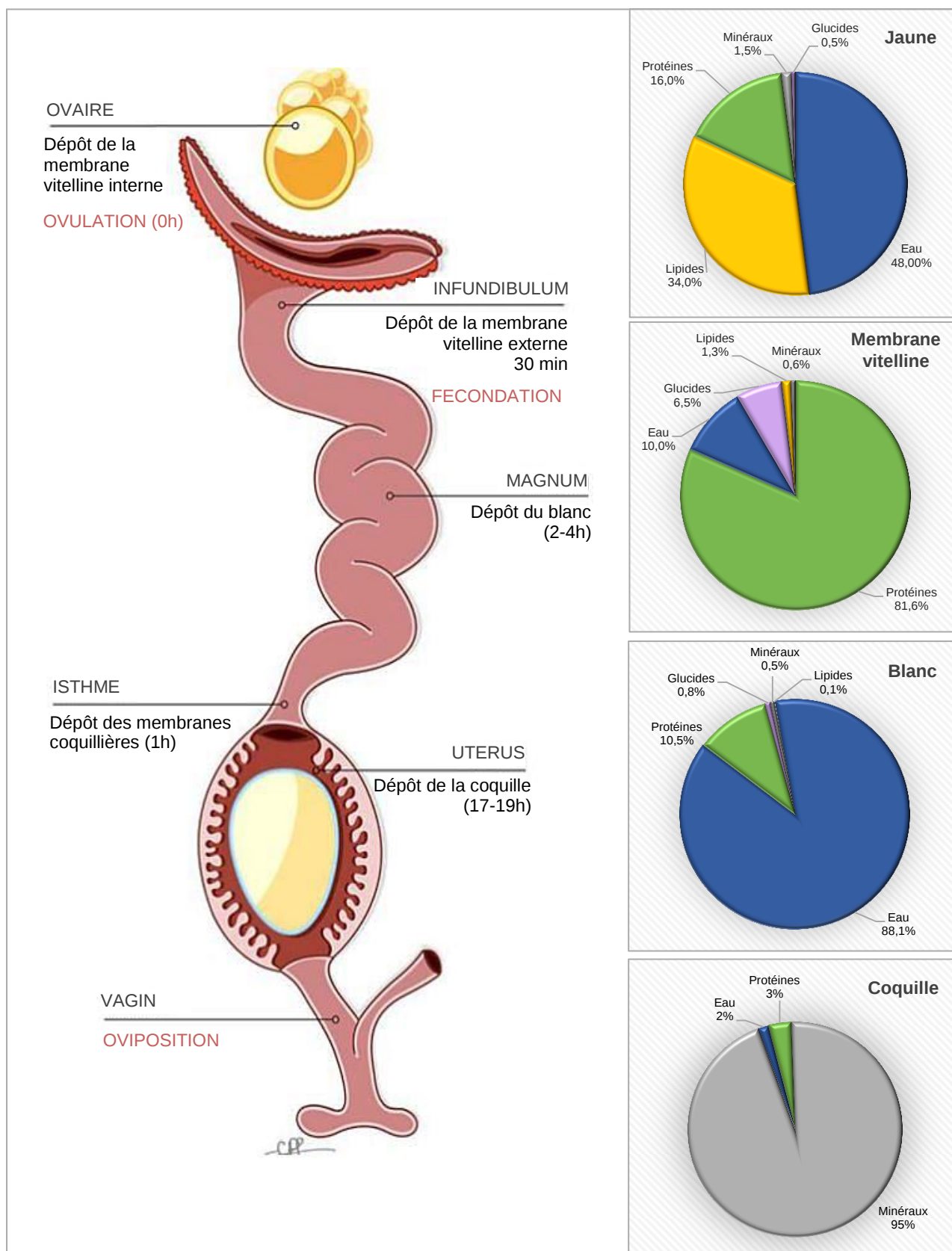


Figure 3 : Formation de l'œuf dans l'appareil reproducteur de la poule (schéma d'après Hincke *et al.*, 2012). A droite sont indiquées les compositions du jaune, du blanc, de la coquille (Li-Chan et Kim, 2008) et de la membrane vitelline (Chung *et al.*, 2010) d'œuf de poule.

1.1 - Le jaune ou vitellus

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

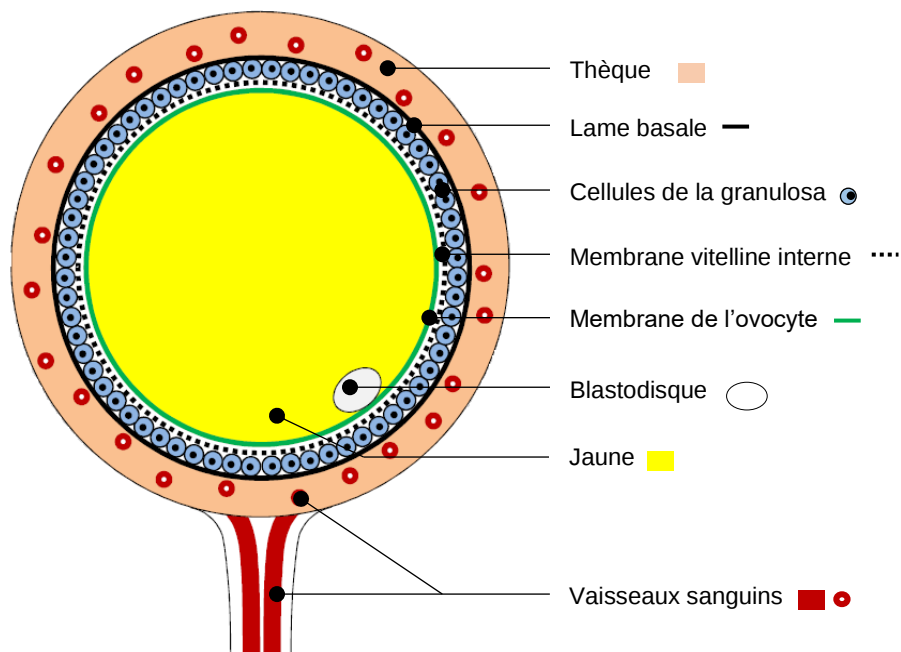


Figure 4 : Structure du follicule ovarien et de l'ovocyte chez la poule (Réhault-Godbert and Guyot, 2017)

- Formation -

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

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

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

- Composition -

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

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

1.2 - La membrane vitelline

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

- Formation -

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

- Composition -

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

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

1.3 - Le blanc ou albumen

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

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

- Formation -

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

- Composition -

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

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

1.4 - La coquille

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

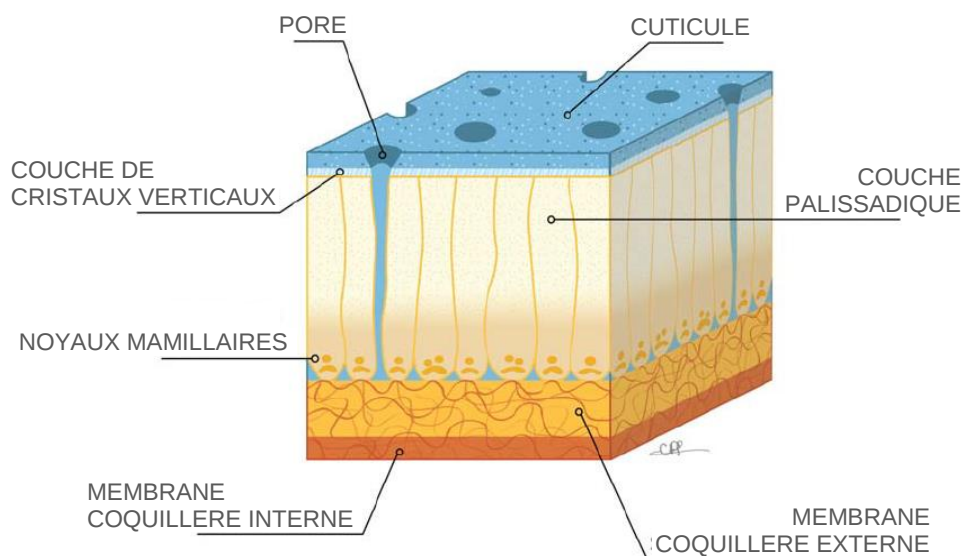


Figure 5 : Représentation schématique de la coquille d'œuf de poule (schéma d'après Hincke *et al.*, 2012).

- Formation -

Les constituants des membranes coquillères sont produits et sécrétés par les cellules de l'isthme (**Figure 3**) (Du *et al.*, 2015). Les noyaux mamillaires qui sont ancrés sur la membrane coquillère externe dans l'isthme distal, sont les points d'initiation de la minéralisation de la coquille dans l'utérus. La composition du fluide utérin, riche en calcium et en ions bicarbonates, favorise la précipitation des cristaux de calcite (carbonate de calcium CaCO_3)

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

- Composition -

En tenant compte des membranes coquillières, la coquille contient 95% de minéraux, 3,3 à 3,5% de matière organique et 1,6% d'eau, pour une épaisseur totale de 0,3 mm environ (Li-Chan et Kim, 2008). Elle est composée de 94% de calcite (CaCO_3), soit 37,5 % de calcium, mais elle contient peu d'oligoéléments, et aucun lipide. La matrice organique se répartit entre les protéines des membranes coquillières et celles contenues dans la partie minéralisée. Les membranes coquillières sont ainsi composées de 10% de fibres de collagène (types I, V, et X) entrelacées et reliées par un ensemble de protéines et glycoprotéines (70% à 75%) (Hincke *et al.*, 2012). Plus de 700 protéines ont été identifiées dans cette matrice organique (Mann *et al.*, 2006; Marie *et al.*, 2015), dont certaines ont été identifiées au préalable dans les autres structures de l'œuf (OVAL, LYZ et TF). D'autres, synthétisées uniquement par l'isthme ou l'utérus, sont spécifiques de la coquille : les ovocléidines 17 et 116 (**OC-17**, **OC-116**), et les ovocalyxines 21, 25, 32 et 36 (**OCX36**), qui sont impliquées dans la biominéralisation de la coquille (Tian *et al.*, 2010; Nys *et al.*, 2010). En outre, certaines de ces protéines sont retrouvées dans la cuticule, composée à 90% de protéines, 5% de sucres et 3% de minéraux (Rose-Martel *et al.*, 2012). C'est aussi dans cette dernière couche que sont concentrés les deux tiers des pigments qui donne la couleur de la coquille.

2 - Les structures extra-embryonnaires de l'œuf

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

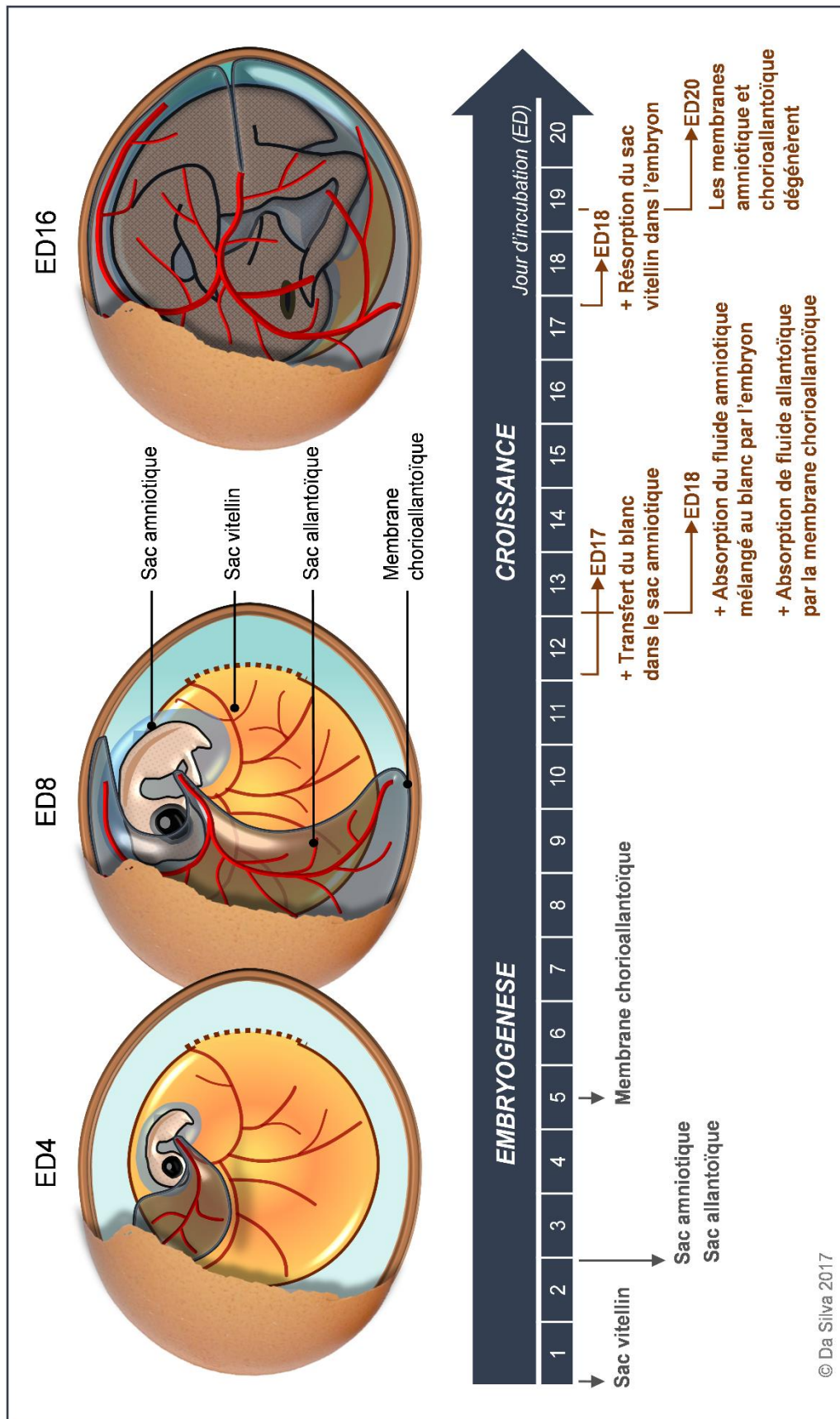


Figure 6 : Frise chronologique illustrant le développement embryonnaire chez la poule. En bleu : début de la formation des structures extra-embryonnaires ; en orange : événements marquants en lien avec les structures extra-embryonnaires. Les flèches orange indiquent le terme du processus.

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

2.1 - Le sac vitellin

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

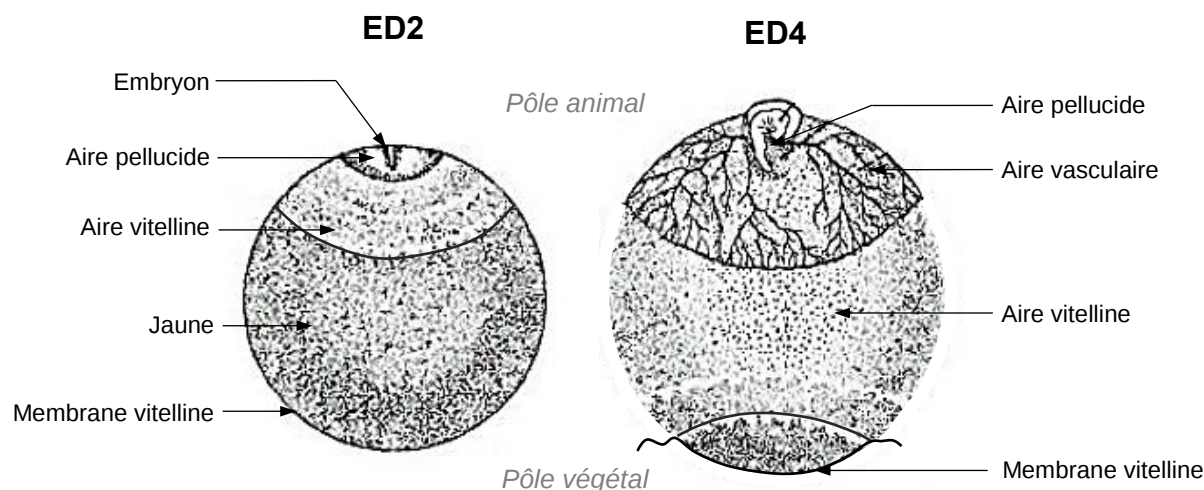


Figure 7 : Illustration de la croissance du sac vitellin à la surface du jaune aux 2^{ème} et 4^{ème} jours d'incubation chez la poule (ED2 et 4) (Romanoff, 1960)

- Formation -

Les premières divisions cellulaires entraînent l'apparition des aires pellucide et vitelline, qui composent le sac vitellin (Figure 7). Ce dernier se présente sous la forme d'une membrane cellulaire vascularisée, dérivée du mésoderme et de l'endoderme (parties externe et interne de la membrane respectivement). Elle se développe à la surface du jaune d'œuf, directement sous la membrane vitelline, et progresse unilatéralement vers le pôle végétal de l'œuf qu'elle atteint au 5^{ème} jour d'incubation (ED5). Ce processus d'extension entraîne la

disparition progressive de la membrane vitelline qui sert de matrice à la formation du sac vitellin (Haas et Spratt, 1976; Yoshizaki *et al.*, 2000) (voir section B3.2). Le sac vitellin est en outre le support d'un important réseau sanguin, appelé l'aire vasculaire, qui recouvre la totalité du sac vitellin à ED14-15 (**Figure 7**). Ce réseau est relié au système sanguin de l'embryon et se développe au sein du mésoderme. En parallèle, sur la partie intérieure du sac, l'endoderme subit d'importantes modifications qui aboutiront à la formation de structures proches de celles de l'intestin (replis, villosités, cellules musculaires, épithélium, etc.) (Bauer *et al.*, 2013; Yadgary *et al.*, 2013).

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

- Composition et fonctions -

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

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

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

2.2 - Le sac amniotique

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

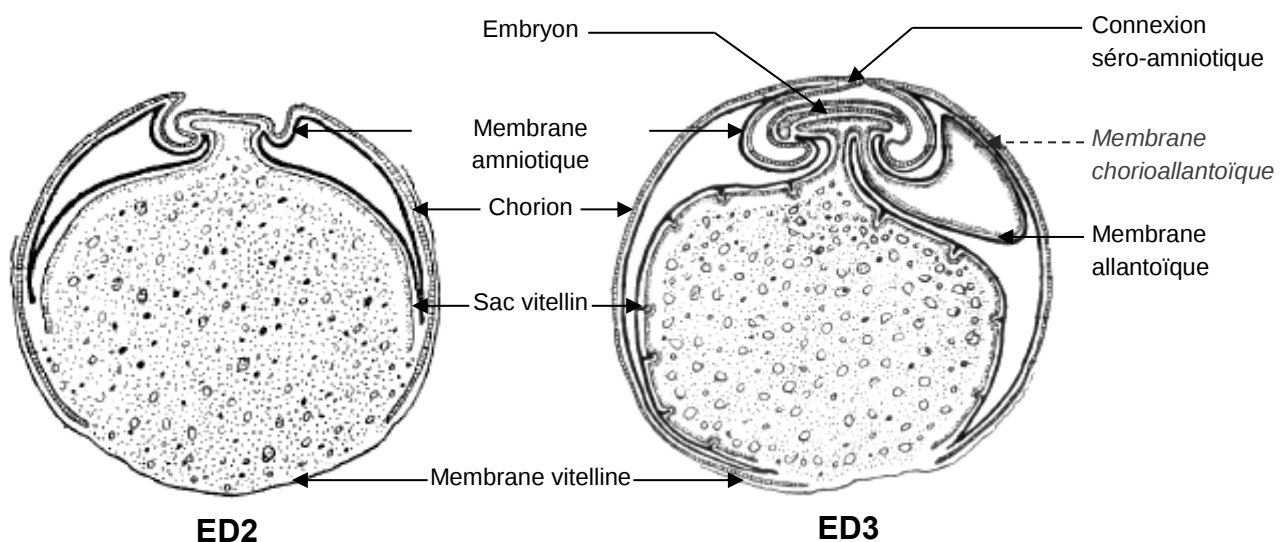


Figure 8 : Formation des structures extra-embryonnaires dans l'œuf de poule aux 2^{ème} et 3^{ème} jours d'incubation (ED2 et 3) vue en coupe sagittale (Pattern, 1920). Le chorion et la membrane du sac allantoïque fusionnent à partir d'ED5-6 pour former la membrane chorioallantoïque (en italique).

- Formation et structure -

La membrane amniotique aussi appelée amnios apparaît à ED2 et recouvre entièrement l'embryon à ED3 (**Figure 8**). Il s'agit d'une membrane très fine et élastique. La partie externe de l'amnios est dérivée du mésoderme, et se différencie progressivement en une couche cellulaire de muscle lisse, dont la contraction maintient le contenu du sac en mouvement à partir d'ED5. A l'inverse, la partie interne de l'amnios est dérivée de l'ectoderme, et prolonge celui de l'embryon. L'amnios croît de façon importante entre ED9 et ED14, puis son poids se stabilise. Pour faciliter la croissance de l'embryon lors de la dernière semaine d'incubation, la membrane s'étire.

Le fluide amniotique (**AmF**) commence à remplir la cavité amniotique à partir d'ED3-4. Son origine reste encore inconnue, même si des hypothèses avancent la possible sécrétion des composés par la membrane amniotique et/ou leur transport depuis l'aire pellucide. Son volume augmente progressivement lors de l'incubation, surtout lors de la rupture de la connexion séro-amniotique (**Figure 8**), qui va permettre le passage des protéines du blanc dans le sac amniotique à partir d'ED12 chez la poule (Geelhoed et Conklin, 1966; Carinci et Manzoli-Guidotti, 1968; Sugimoto *et al.*, 1999) (**Figure 6**). A partir d'ED13, l'embryon commence à absorber oralement l'AmF contenant le blanc d'œuf, ce qui entraîne la diminution rapide du volume de fluide.

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

- Composition et fonctions -

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

2.3 - Le sac allantoïque

Le sac allantoïque est le dernier compartiment extra-embryonnaire à apparaître (**Figure 6**). Il se présente sous la forme d'un appendice relié à l'intestin, qui croît progressivement au

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

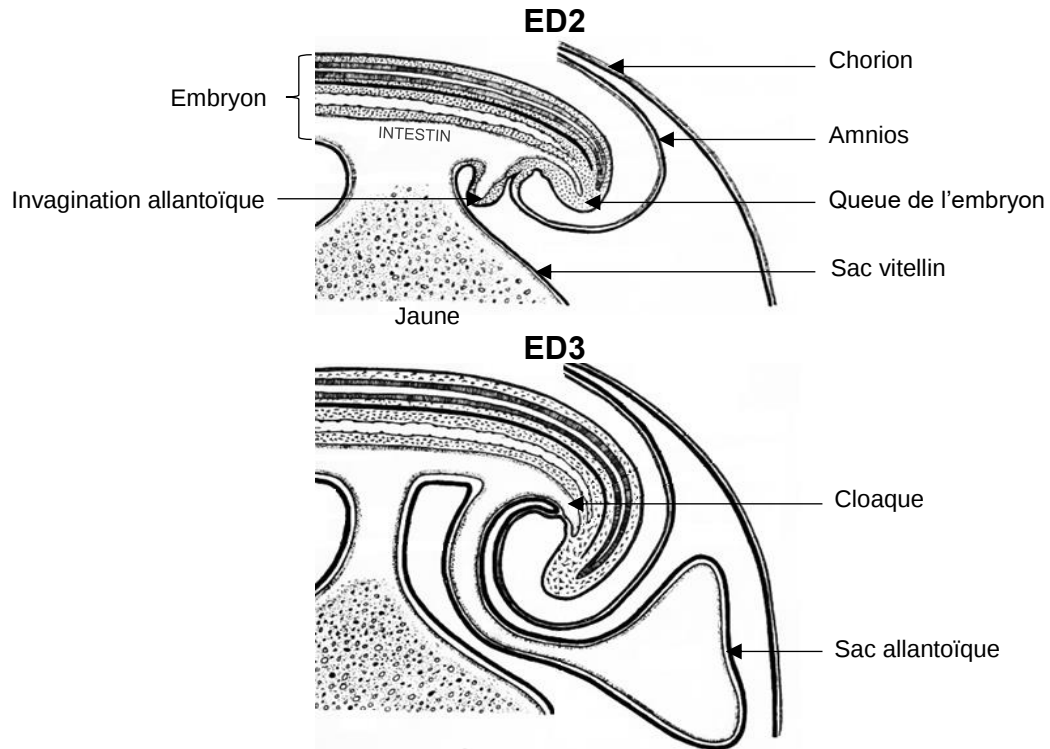


Figure 9 : Illustration de la formation du sac allantoïque dans l'œuf de poule aux 2^{ème} et 3^{ème} jours d'incubation (ED2 et 3) vue en coupe sagittale (Pattern, 1920).

- Formation et structure -

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

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

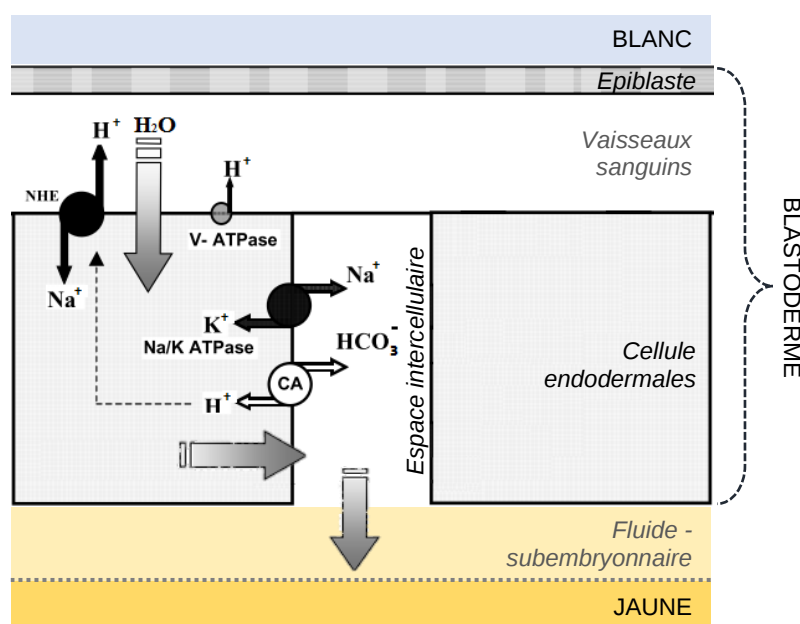


Figure 10 : Formation du fluide subembryonnaire dans l'œuf de caille (d'après Latter et Baggott, 2002). L'eau du blanc est transférée dans le jaune *via* un gradient osmotique établi au niveau du blastoderme, par un échangeur Na^+/H^+ (NHE), des ATPaases (Na^+/K^+ ATPase et V-ATPase) et une anhydrase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

- Composition et fonctions -

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

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

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

- La membrane chorioallantoïque -

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

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

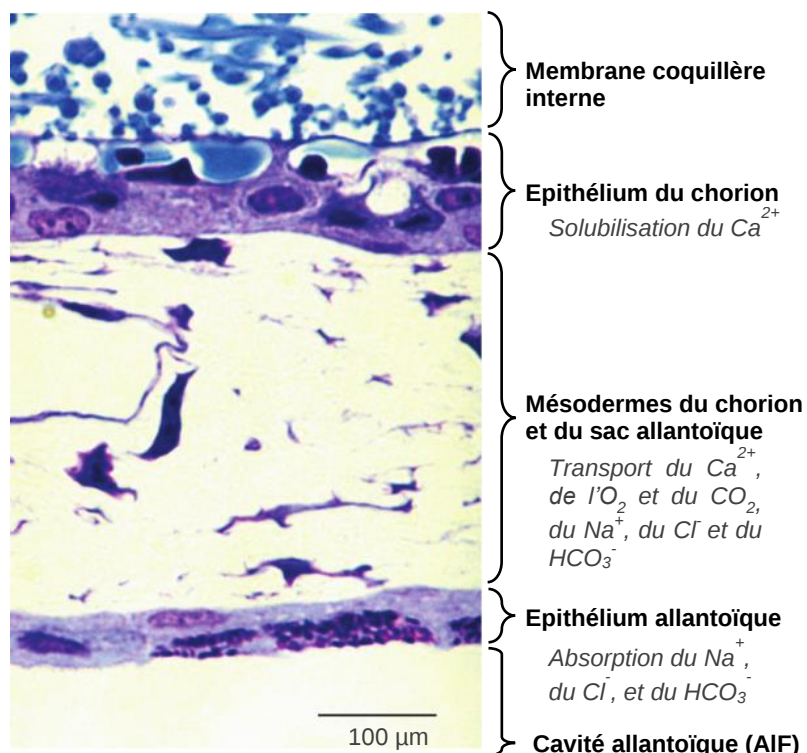


Figure 11 : Observation au microscope d'une coupe transversale de la membrane chorioallantoïque colorée au bleu de Toluidine (Gabielli *et al.*, 2010). Les fonctions associées à chaque sous-couche de la membrane ont été annotées en gris. AIF : fluide allantoïque.

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