

L'apport des techniques à haut débit (protéomique et transcriptomique) dans l'identification et la caractérisation fonctionnelle des protéines de l'oeuf

Joël Gautron, Sophie Réhault-Godbert, Vincent Jonchère, Virginie Herve-Grepinet, K. Mann, Yves Y. Nys

▶ **To cite this version:**

Joël Gautron, Sophie Réhault-Godbert, Vincent Jonchère, Virginie Herve-Grepinet, K. Mann, et al.. L'apport des techniques à haut débit (protéomique et transcriptomique) dans l'identification et la caractérisation fonctionnelle des protéines de l'oeuf. INRA Productions Animales, 2010, 23 (2), pp.133-140. hal-02666661

HAL Id: hal-02666661
https://hal.inrae.fr/hal-02666661

Submitted on 31 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

INRA Prod. Anim.,
2010, 23 (2), 133-142

L'apport des techniques à haut débit (protéomique et transcriptomique) dans l'identification et la caractérisation fonctionnelle des protéines de l'œuf

J. GAUTRON[1], S. RÉHAULT-GODBERT[1], V. JONCHÈRE[1], V. HERVÉ-GRÉPINET[1], K. MANN[2], Y. NYS[1]
[1] INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France
[2] Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Proteomics und Signaltransduktion, Martinsried, Allemagne
Courriel : joel.gautron@tours.inra.fr

Au cours de ces cinq dernières années, le nombre total de protéines identifiées dans l'œuf s'est accru considérablement en passant d'environ une cinquantaine à plusieurs centaines, grâce au développement des outils d'analyse à haut débit. Ces connaissances enrichissent considérablement les informations concernant les protéines de l'œuf et ouvrent la voie à l'utilisation de nouvelles molécules d'intérêt issues de l'œuf.

L'œuf de poule est une enceinte close naturelle autosuffisante et stérile permettant le développement harmonieux d'un poussin dans le milieu extérieur. Cette fonction implique que l'œuf contienne la totalité des composants nécessaires au développement en 21 jours, d'une cellule reproductrice fécondée en un poussin mature. L'œuf est donc une réserve de nutriments et une mine de molécules aux activités biologiques diverses (Anton *et al* 2006, Mine et Kovacs-Nolan 2006, Réhault *et al* 2007). L'œuf contient les vitamines, les minéraux (coquille), les protéines (blanc et jaune) ainsi que les lipides (jaune), nécessaires au développement de l'embryon. L'œuf est aussi un aliment de base qui est largement consommé dans le monde entier. Il possède une haute valeur nutritive du fait de l'équilibre de ses acides aminés facilement assimilables (Nys et Sauveur 2004, Seuss-Baum 2007). Par ailleurs, pour faire face aux agressions physiques et microbiennes, l'œuf possède des systèmes de défenses naturelles. La coquille constitue une barrière physique impénétrable pour les microorganismes si elle reste intacte. Il s'agit d'un biominéral à carbonate de calcium dont la structure est parfaitement ordonnée et structurée grâce à l'action de molécules organiques (matrice organique) sur les cristaux de calcite, qui détermine la structure minérale. La matrice organique composée principalement de protéines et de protéoglycanes, joue par conséquent un rôle crucial dans les propriétés mécaniques de la coquille (Nys *et al* 2004, Gautron et Nys 2007a, 2010, Hincke *et al* 2008). Le second système de protection se compose essentiellement de protéines du blanc, de la coquille et de ses membranes qui grâce à leur rôle antimicrobien constituent la défense chimique de l'œuf (Anton *et al* 2006, Réhault *et al* 2007, Mine et D'Silva 2008, Hervé-Grépinet *et al* 2009).

La diversité des activités biologiques des constituants de l'œuf présente un intérêt majeur pour différents secteurs industriels tels que pharmaceutiques, cosmétiques et agro-alimentaires. En effet, l'œuf contient des composés antihypertensifs, anticancéreux, antioxydants, cryoprotecteurs, immunomodulateurs et antiadhésifs (Anton *et al* 2006, Mine et Kovacs-Nolan 2006, Réhault *et al* 2007). De ce fait, le challenge actuel concerne la caractérisation fonctionnelle des différentes protéines de l'œuf.

L'étude des protéines de l'œuf a été initiée pour le blanc et le jaune il y a plus de 50 ans. Ainsi, les protéines majeures du blanc et du jaune ont été séparées et purifiées en utilisant des techniques classiques de biochimie des protéines (Li-Chan *et al* 1995). Ces approches biochimiques ont été complétées dans les années 80 par les outils de la biologie moléculaire. Toutefois, les composés mineurs qui représentent un grand nombre de molécules, n'ont pu être identifiés et caractérisés par ces méthodes. Le développement des outils de la génomique fonctionnelle au cours de ces dix dernières années a considérablement transformé la biologie et les biotechnologies, et en particulier nos connaissances sur l'œuf. Le développement récent des méthodes d'analyses à haut débit utilisées en combinaison avec la publication de la séquence génomique de la poule (International Chicken Genome Sequencing Consortium 2004), et le développement d'outils bioinformatiques de prédiction des fonctions, ont permis de révéler de nouvelles perspectives pour la caractérisation de nouveaux composés de l'œuf incluant les protéines mineures (Gautron *et al* 2007a). Certaines pourraient être des molécules avec des propriétés biologiques d'intérêt. Dans cette revue, nous décrirons comment l'apport de ces nouvelles technologies a été utilisé pour obtenir des avancées majeures dans la caractérisation des protéines de l'œuf.

1 / Apports de la génomique fonctionnelle

A partir des années 2000, différents projets internationaux de caractérisation des transcrits fonctionnels de l'espèce poule (*Gallus gallus*) ont vu le jour. L'université de Manchester (Grande-Bretagne) a développé un programme majeur mettant à la disposition de la communauté scientifique plus de

300 000 séquences EST redondantes (Boardman *et al* 2002) (http://www.chick.umist.ac.uk/index.html). L'université de Delaware (USA) a proposé un programme complémentaire qui est constitué de 40 000 EST non redondantes (Carre *et al* 2006) (http://cogburn.dbi.udel.edu/index.html). Enfin en France, l'INRA a coordonné le projet AGENAE ayant pour ambition de développer des recherches génériques et des actions de recherche finalisée dans le domaine de la génomique animale (http://www.inra.fr/agenae/). L'ensemble des projets menés au niveau mondial a abouti à la caractérisation de la très grande majorité des ARNm de l'espèce *Gallus gallus*, comme le montrent les 600 323 séquences EST recensées dans la base de données dbEST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html) fin 2009. Ces séquences ont été regroupées par SIGENAE (www.sigenae.org) en 260 460 contigs et 129 842 singlets (http: //public-contig-browser.sigenae. org:9090/Gallus_gallus/index.html). Ces connaissances ont été renforcées par la publication en 2004 de la séquence du génome de la poule (International Chicken Genome Sequencing Consortium 2004) et par l'annotation des différents cadres de lectures ouverts et des séquences codantes des gènes de la poule. Le développement parallèle d'outils bioinformatiques et d'analyse à haut débit des transcrits de gènes (transcriptomique) et des protéines (protéomique), a conduit à l'étude simultanée de l'ensemble des constituants fonctionnels.

1.1 / Le protéome de l'œuf

Le protéome reflète l'ensemble des protéines exprimées dans une cellule, un tissu, un organe ou un organisme à un instant donné. L'étude des protéomes implique l'utilisation de méthodes à haut débit utilisant la spectrométrie de masse, combinées à des outils bioinformatiques pour l'identification des protéines (Mann et Steen 2004). L'ensemble des protéines à étudier est extrait et solubilisé du milieu puis digéré à l'aide d'une protéase (trypsine, le plus fréquemment). Ce mélange hautement complexe composé de peptides hydrolytiques de longueurs variables, est alors introduit dans un spectromètre de masse de manière à déterminer expérimentalement la masse exacte des peptides et des fragments peptidiques formés par la fragmentation partielle des peptides dans l'instrument. Cette masse exacte des peptides, et de leurs fragments, obtenue par spectrométrie de masse, est comparée aux masses théoriques et prédites par digestion *in silico* de toutes les séquences des protéines présentes dans les bases de données, permettant ainsi l'identification des protéines du milieu analysé. Une telle approche est donc dépendante des méthodes d'extraction et de solubilisation mises en œuvre au préalable, ainsi que de la quantité et de la qualité des informations de séquences contenues dans les bases de données pour une espèce donnée. En ce qui concerne l'espèce poule (*Gallus gallus*), les banques de données ont été largement abondées ces dix dernières années par de nombreuses informations sur les transcrits exprimés (ESTs) et par la publication de la séquence de son génome (International Chicken Genome Sequencing Consortium 2004). La parution de ces informations de séquences du génome exprimé de la poule ont permis un essor considérable dans l'identification des protéines de l'œuf, comme en témoignent les publications des cinq dernières années. Ainsi le nombre de protéines identifiées est désormais de plusieurs centaines dans le jaune, les membranes vitellines, le blanc et la coquille (tableau 1).

Tableau 1. *Nombre de protéines identifiées dans l'œuf par analyse protéomique.*

Compartiments de l'œuf	Nombre de protéines identifiées	Références
Coquille	528	Mann *et al* 2006, 2007 Miksik *et al* 2003, 2007
Blanc	148	Raikos *et al* 2006 Guérin-Dubiard *et al* 2006 Mann 2007, D'Ambrosio *et al* 2008
Membranes vitellines	137	Mann 2008
Jaune	316	Mann et Mann 2008 Farinazzo *et al* 2009

L'analyse protéomique est un moyen très efficace d'identifier les protéines présentes dans l'œuf. Néanmoins, la localisation d'une protéine dans un compartiment de l'œuf n'est pas suffisante pour prédire la fonction biologique de cette protéine. Un grand nombre des protéines identifiées par analyse protéomique de la coquille pourrait être incorporé de façon passive du seul fait de leur présence dans le milieu pendant la minéralisation et pourraient ne pas jouer de rôle biologique dans la coquille (Mann *et al* 2006, 2007). Cette hypothèse est confortée par un examen minutieux de la composition du mélange protéique issu des analyses protéomiques du blanc et de la coquille. Celles-ci révèlent la présence dans la coquille de nombreuses protéines issues des processus de sécrétion dans les segments proximaux de l'oviducte, ainsi que de protéines intracellulaires issues du renouvellement cellulaire et de la desquamation des parois bordant l'oviducte (Mann *et al* 2008). Ces dernières observations montrent une limite de l'analyse protéomique qui décrit à un temps donné les espèces protéiques présentes dans le milieu, mais ne fournit pas d'information sur un processus de sécrétion séquentiel dans le temps et l'espace, comme dans le cas de l'oviducte impliqué dans le dépôt des compartiments de l'œuf.

1.2 / Le transcriptome de l'œuf

L'analyse transcriptomique étudie l'expression des gènes qui codent les protéines. Elle quantifie le niveau d'expression des gènes par des techniques permettant le criblage à un stade physiologique donné, de plusieurs milliers de transcrits (ARNm) issus d'un tissu ou d'un organe. Cette technique utilise des puces à ADN qui sont constituées d'une collection d'ADN déposés de manière ordonnée sur un support solide tel que des membranes de nylon ou des lames de verre. Les puces à ADN sont aussi appelées microréseaux d'ADN, puces à gènes ou biopuces. Ces puces à ADN sont utilisées notamment pour faire une analyse différentielle de l'expression des gènes soit dans deux tissus différents, soit dans un même tissu dans deux conditions physiologiques différentes. On pourra par exemple comparer les transcrits d'un tissu sain à ceux d'un même tissu cancéreux et ainsi établir le profil d'expression des gènes associés à cette maladie. L'utilisation d'outils informatiques et statistiques adaptés, permet de quantifier la fluorescence relative dans chacune des conditions testées et d'établir la liste des gènes exprimés de manière différentielle. Les gènes différentiels sont alors classés selon leur fonction afin d'établir leur rôle biologique ou pathologique potentiel.

L'oviducte de poule constitue un excellent modèle pour ce type d'approche. En effet, la synthèse et la sécrétion des protéines de l'œuf se font successivement tout au long des segments de l'oviducte. Ainsi le jaune se forme au

niveau de l'ovaire par captation des lipoprotéines de la circulation sanguine, le magnum est la région de l'oviducte où les protéines du blanc d'œuf sont synthétisées puis sécrétées autour du jaune. L'isthme blanc et l'utérus sont respectivement les tissus de synthèse des membranes coquillières et de sécrétion des précurseurs organiques et minéraux de la coquille. S'appuyant sur cette spécificité spatiale, le transcriptome de l'oviducte a été utilisé pour établir le profil d'expression des gènes dans l'utérus (lieu de formation de la coquille), pendant la phase active de minéralisation de la coquille par comparaison avec d'autres segments de l'oviducte (magnum et isthme), non impliqués dans la minéralisation (Jonchère *et al* 2010) (figure 1). Le profil d'expression de l'utérus a également été établi lors des changements considérables se produisant à la maturité sexuelle aboutissant à la production d'œufs (Dunn *et al* 2009). Des analyses sont également en cours pour établir le profil d'expression du magnum (dépôt des protéines du blanc) et de l'isthme (synthèse des membranes coquillières) (Gautron *et al* 2008).

Les approches transcriptomiques criblent l'ensemble des gènes exprimés dans l'appareil reproducteur de la poule impliqué dans le dépôt des constituants de l'œuf. Toutefois, ces approches présentent également des limites. L'analyse différentielle ne met en évidence que les gènes surexprimés dans un tissu par rapport à un autre. L'analyse trancriptomique ne différencie pas les gènes codant les protéines qui seront sécrétées pour être déposées dans l'œuf, des gènes exprimés qui codent les protéines intracellulaires ayant un rôle dans le métabolisme de l'oviducte. Une manière de s'affranchir de ce problème est d'établir le sécrétome de l'oviducte. Dans une première approche, les gènes exprimés dans l'utérus ont été traduits en protéines (Jonchère *et al* 2010), puis comparées aux protéines préalablement identifiées dans la coquille (Mann *et al* 2006, 2007). Dans une seconde étape, les protéines issues de l'analyse transcriptomique de l'utérus, ont été analysées pour rechercher la présence d'un peptide signal (Jonchère *et al* 2010), qui est une séquence nécessaire à la sécrétion d'une protéine.

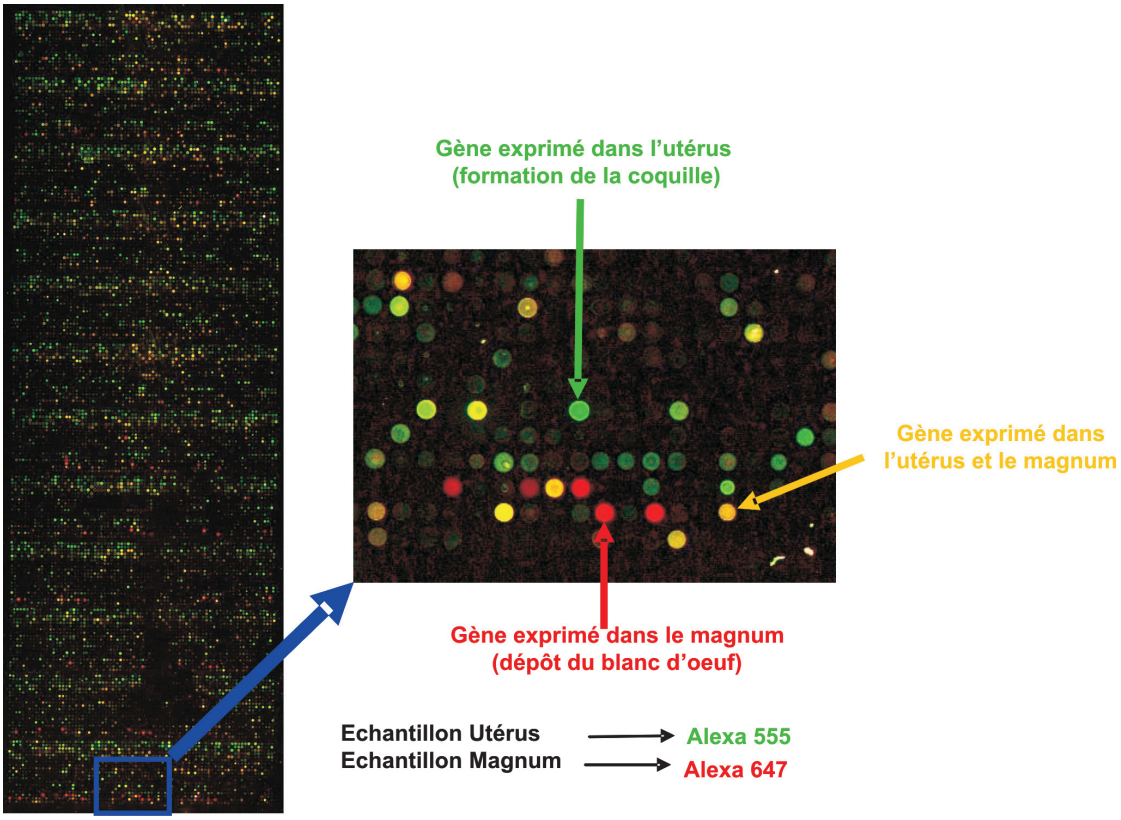
2 / Protéines nouvellement identifiées dans l'œuf

Ces nouveaux outils ont permis une avancée considérable dans la caractérisation des composés de l'œuf. Au cours de ces dernières années, le nombre total de protéines identifiées dans l'œuf est passée d'une cinquantaine en 2006, à plusieurs centaines à ce jour.

2.1 / Les protéines de la coquille

La coquille de l'œuf est une structure composée à 95% de carbonate de calcium. La coquille contient aussi une faible proportion de matière organique (matrice organique). La matrice organique de la coquille d'œuf est impliquée dans les mécanismes de sa minéralisation et par conséquent dans ses propriétés mécaniques (Nys *et al* 2004, Gautron et Nys 2007a). Un total de dix protéines de la matrice organique a été caractérisé par des approches biochimiques et moléculaires classiques. Il s'agit de trois protéines du blanc d'œuf (ovalbumine, lysozyme et ovotransferrine) également présentes dans la coquille (Hincke 1995, Hincke *et al* 2000, Gautron *et al* 2001a), de deux protéines ubiquistes, l'ostéopontine et la clusterine, (Pines *et al* 1994, Mann *et al* 2003), ainsi que de protéines spécifiques de la coquille (ovocleidin-17, -116 et ovocalyxines-36, -32 et -21) (Hincke *et al* 1995, 1999, Gautron *et al* 2001b, 2007b, Gautron et Nys 2007b). Une avancée majeure est survenue en 2006 avec l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem couplée à une chromatographie liquide. Cette technologie a été utilisée pour séparer et identifier les peptides d'un mélange obtenu après solubilisation en milieu acide des protéines de la coquille et digestion par de la trypsine. Un total de 528 protéines a

Figure 1. *Analyse transcriptomique des gènes exprimés dans l'oviducte. Dans cet exemple, les gènes issus de l'utérus et associés à la formation de la coquille, sont marqués avec de l'alexa 555 et apparaissent en vert sur la lame. Les gènes exprimés dans le magnum (formation du blanc) sont marqués avec de l'Alexa 647 et apparaissent donc en rouge sur la puce à ADN.*



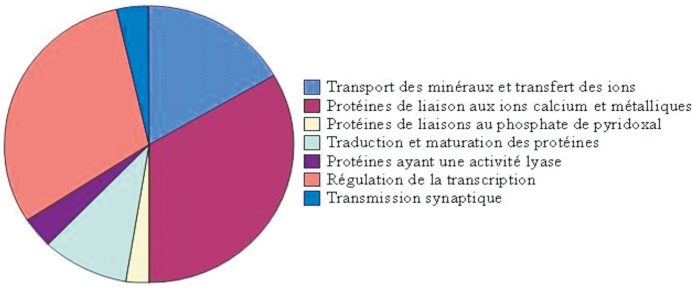
ainsi été mis en évidence dans la coquille (Mann *et al* 2006, 2007, 2008). Ces protéines ont pu être classées en 3 groupes en utilisant un index d'abondance protéique modifié (emPAI). Il faut toutefois noter que l'abondance d'une protéine ne reflète pas nécessairement son degré d'importance. En effet, des protéines identifiées dans la matrice pourraient posséder, même à faible concentration, des activités enzymatiques, régulatrices ou encore antimicrobiennes. Le groupe de protéines en forte abondance est constitué de 32 protéines représentant 6% des protéines identifiées dans la coquille. À l'exception de l'ostéopontine, on retrouve dans ce groupe toutes les protéines qui avaient été identifiées préalablement dans la matrice organique de la coquille par les techniques biochimiques et moléculaires classiques. Les autres protéines identifiées dans ce groupe correspondent à des protéines impliquées dans le métabolisme lipidique, des protéines cytoplasmiques, d'autres protéines du blanc dont 2 antiprotéases (cystatine et ovoinhibiteur), et des protéines non caractérisées ayant des similarités de séquences avec les protéines de liaison aux intégrines ou possédant des domaines relatifs aux protéines antimicrobiennes. Ce groupe contient aussi de nombreuses protéines décrites au préalable dans de nombreux autres fluides biologiques chez la poule (albumine sérique, hémopexine, protéines de liaison à la vitamine D). Le groupe d'abondance intermédiaire (14% du total) est composé de protéines de signalisation ainsi que de protéines reliées au système immunitaire contenant un domaine analogue aux immunoglobulines et des β-défensines aviaires (Mann *et al* 2006). La grande majorité des protéines (80% du total) est constituée de protéines de faible abondance. La fraction non soluble de la matrice organique de la coquille a également été étudiée par analyse protéomique (Miksik *et al* 2003, 2007). Ces analyses n'ont pas permis de révéler de nouvelles protéines. Seules 5 protéines majeures de la coquille (ovocleidin-116 et -17, ovocalyxines-36 et -32 et clusterine) ont été mises en évidence dans ces études.

Un grand nombre de protéines identifiées dans la coquille par analyse protéomique, pourrait être incorporé de façon passive dans le milieu et ne jouerait pas de rôle biologique (Mann *et al* 2006). Les protéines qui jouent un rôle biologique dans la coquille ou lors de son assemblage, telles que les protéines spécifiques de la coquille, sont exprimées et sécrétées par les cellules de l'utérus. Dans ce contexte, l'analyse transcriptomique présente un intérêt, car elle permet d'identifier les gènes exprimés dans l'utérus qui codent les protéines impliquées dans la fabrication de la coquille. Ainsi l'identification globale des gènes exprimés dans l'utérus a été réalisée à l'aide de puces à ADNc, par comparaison avec les autres segments de l'oviducte non impliqués dans la formation de la coquille (Jonchère *et al* 2010). Un total de 605 transcrits est surexprimé dans l'utérus par rapport au magnum et à l'isthme. Ils correspondent à 469 gènes et 437 protéines. La fonction potentielle de ces transcrits spécifiques de l'utérus durant la calcification a été analysée en utilisant les termes de *Gene Ontology* (GO) (figure 2, Jonchère *et al* 2010). Les termes GO présents parmi les gènes surexprimés dans l'utérus, ont été comparés à l'ensemble des termes GO représentés sur la puce ADNc. Les gènes ont ainsi été regroupés en familles selon leurs fonctionnalités potentielles. Cette analyse a mis en évidence des fonctions biologiques surreprésentées dans l'utérus participant à l'apport des constituants de la coquille, à sa biominéralisation et à la protection de l'œuf. Ainsi, la famille de protéines la plus représentée dans l'utérus correspond à des termes GO reliés au transport et au transfert des ions ainsi que des protéines de liaisons au calcium. Ces données identifient de nombreux transporteurs ioniques potentiellement impliqués dans l'apport des minéraux qui se produit durant la minéralisation de la coquille (Nys *et al* 1999, Nys 2010). Une liste de 54 protéines potentiellement sécrétées par les cellules utérines pour être déposées dans la coquille a été établie (Jonchère *et al* 2010). La fonction de ces 54 protéines sécrétées a été examinée en utilisant les informations contenues dans diverses banques de données, et ces protéines ont été classées en différents groupes selon leurs fonctions biologiques.

Le premier groupe contient les protéines potentiellement impliquées dans la minéralisation. Parmi celles-ci, notons la présence de 3 protéines spécifiques de la coquille et de son milieu de formation, l'ovocléidine 116, l'ovocalyxine 36, et l'ovocalyxine 21, (Hincke *et al* 1999, Gautron *et al* 2007b, Gautron et Nys 2007b) et de l'ostéopontine, une phosphoprotéine présente dans l'os et la coquille (Pines *et al* 1994). Il est intéressant de noter dans ce groupe la présence de protéines liant le calcium susceptibles de jouer un rôle dans les mécanismes d'interactions avec le minéral qui se produisent au cours de la biominéralisation. C'est le cas de la DMP4 (*Dentin matrix protein 4*), potentiellement impliquée dans la minéralisation des dents chez les mammifères (Hao *et al* 2007). Le calcium est aussi un ligand de la *mannose-binding protein C* (MBL2) qui contient un domaine *C-type lectin*. SLIT, une protéine impliquée dans le développement des neurones embryonnaires (Marillat *et al* 2002), la *nucleobindin-2* (NUCB2), l'*endoplasmin* (ENDPL), la *follistatin-related protein* (FSTL1), la *FK506-binding protein 9* (FKBP9) et la *calsynthrenin-3* (CLSTN3), sont également des protéines sécrétées par l'utérus et possédant des domaines de liaison au calcium. La présence de domaines de liaison au calcium n'est cependant pas une condition suffisante pour impliquer une interaction directe. Il existe des tests de croissance *in vitro* de la calcite permettant d'explorer plus en détails cette interaction (Hernandez-Hernandez *et al* 2008), mais ils nécessitent la purification de la protéine et le maintien de sa solubilité.

Un autre groupe de protéines sécrétées par l'utérus, correspond aux protéines chaperonnes et impliquées dans le repliement protéique. L'ovocalyxine-21 (OCX-21) et l'endoplasmine (ENDPL) appartiennent à ce groupe. En tant que protéines chaperonnes, elles participeraient à l'assemblage du réseau protéique nécessaire à la minéralisation ordonnée. D'autres protéines impliquées dans la conformation des protéines participeraient à la conformation appropriée de la matrice favorisant la minéralisation de la coquille. C'est notamment le cas de 4 protéines (Icos ligand (ICOSLG), neuroplastine (NPTN), β-2-microglobuline (B2M), butyrophyline (BTN1A1)), qui possèdent des domaines analogues aux immunoglobulines qui contrôlent la conformation et le repliement protéique (Potapov *et al* 2004). C'est aussi le cas

Figure 2. *Distribution des protéines surexprimées dans l'utérus de poule selon leurs activités biologiques.*



de la mannosidase (MAN2B1) impliquée également dans la conformation des protéines et dont le gène est le plus surexprimé dans l'utérus.

Le troisième groupe est constitué de protéines sécrétées, ayant une activité antimicrobienne potentielle. Ce rôle serait joué par l'ovocalyxine-36, une protéine spécifique de la matrice organique de la coquille d'œuf analogue aux protéines LBP (*lipopolysaccharide-binding proteins*) et BPI (*bactericidal permeability-increasing proteins*), connues pour leur action lytique sur la paroi des bactéries Gram négatives (Gautron *et al* 2007b). C'est aussi le cas d'un peptide antimicrobien cationique, la β-défensine aviaire-9 (AvBD-9). La *mannose-binding protein C* pourrait aussi être impliquée dans l'activité antimicrobienne de la matrice. En effet, deux autres protéines de la coquille possédant des domaines *C-type lectin* (ovocleidine-17 chez la poule et ansocalcine chez l'oie), ont montré une activité antimicrobienne (Wellman-Labadie *et al* 2008).

Le dernier groupe est constitué de protéases et d'antiprotéases qui ont un rôle majeur dans de nombreux processus tels que la coagulation sanguine, la prolifération et la migration cellulaire, la maturation des gamètes et les défenses innées. Cette étude des protéines sécrétées par l'utérus, révèle trois protéases dans la coquille d'œuf (cathepsin-A (CTSA), *glioma pathogenesis-related protein 1* (GLIPR1), béta sécrétase 2 (BACE1)). Ces protéines joueraient un rôle important dans le contrôle de l'activité des protéines du fluide utérin, en dégradant certaines protéines et en permettant l'activation d'autres protéines par clivage des proformes. Cette étude a également identifié 7 antiprotéases. Les inhibiteurs de protéases pourraient réguler localement l'activité protéolytique des protéases utérines et avoir une activité antimicrobienne par inhibition des protéases bactériennes, éléments-clés de l'invasion bactérienne.

2.2 / Les protéines du blanc d'œuf

Jusqu'en 1989, seulement 13 protéines avaient été identifiées dans le blanc d'œuf (Li-Chan et Nakai 1989). Cette lacune était principalement due à la forte viscosité de ce milieu et à sa composition défavorable où 6 protéines majeures constituent environ 86% du contenu protéique total (D'Ambrosio *et al* 2008). Différentes méthodes et stratégies ont été appliquées pour l'analyse protéomique du blanc afin de s'affranchir des difficultés techniques dues aux propriétés du blanc. Les premières études ont utilisé l'électrophorèse en deux dimensions pour séparer les protéines du blanc et la spectrométrie de masse pour identifier des spots protéiques. Dans une première étude, Raikos *et al* (2006), ont identifié cinq protéines dont trois déjà connues dans ce milieu (ovalbumine, ovtransferrine et clusterine) et deux nouvelles protéines du blanc d'œuf (récepteur IIA de l'activin et une protéine hypothétique FLJ10305).

Guérin-Dubiard *et al* (2006), ont séparé les protéines du blanc par des techniques chromatographiques combinées avec l'électrophorèse en deux dimensions. Les 69 spots protéiques obtenus ont été digérés puis leurs tailles mesurées par MALDI-TOF et LC-MS/MS. Un total de 16 protéines différentes a été identifié, parmi lesquelles les protéines Tenp et *vitellin membrane outer-I,* caractérisées pour la première fois dans le blanc.

Des avancées majeures dans l'identification des protéines du blanc, ont été obtenues récemment avec les travaux de Mann (2007), et de D'Ambrosio *et al* (2008), qui ont identifié un total de 148 protéines différentes dans le blanc. Deux méthodes de clivage différentes ont été utilisées par Mann pour obtenir des peptides du blanc d'œuf : une digestion directe en solution du blanc d'œuf, ou une séparation par électrophorèse SDS-PAGE 1D du blanc d'œuf suivie d'un découpage et d'une digestion de 18 sections du gel d'électrophorèse. Les différents peptides obtenus par ces méthodes ont été analysés par spectrométrie de masse, et ont permis la caractérisation de 78 protéines dont 54 décrites pour la première fois dans le blanc d'œuf. Ce protéome a permis de mieux caractériser dans le blanc d'œuf des protéines préalablement connues telles que l'ovomucine pour l'identification complète de sa sous-unité β. Parmi les nouvelles protéines, on trouve la galline, une protéine basique de 4,7 kDa apparentées aux β-défensines, qui présente 65 à 70% d'identité de séquence avec la cygnin et la meleagrin identifiées respectivement chez le cygne noir et la dinde. Ce protéome identifie également dans le blanc d'œuf une séquence nommée ovosecretoglobuline qui correspond à une protéine de 7 kDa appartenant à la famille des sécrétoglobulines et utéro-globulines.

Un autre groupe de protéines d'intérêt est constitué par des protéines potentiellement antibactériennes. C'est le cas de la protéine *similar to acyloxyacyl hydrolase* qui partage 62% d'identité avec l'acyloxyacyle hydrolase mammalienne, connue pour sa capacité à cliver les chaînes acyles des lipopolysaccharides (LPS) bactériens. Une fonction antibactérienne similaire est suggérée également pour une protéine de 74 kDa (IPI0058627), dont la séquence contient des domaines BPI (*bactericidal/permeability increasing*), qui sont présents dans des protéines se liant et neutralisant le LPS bactérien aboutissant à la destruction de la bactérie. De tels domaines ont été identifiés au préalable pour la protéine Tenp présente dans le blanc d'œuf et la coquille (Guérin-Dubiart *et al* 2006, Mann *et al* 2006), et pour l'ovocalyxine-36, une nouvelle protéine spécifique de la matrice organique de la coquille (Gautron *et al* 2007b). Une protéine nommée *lymphocyte antigen* 86 (MD1), préalablement identifiée dans la coquille et impliquée dans la réponse cellulaire au LPS, est aussi retrouvée dans le blanc d'œuf. D'autres protéines potentiellement antimicrobiennes sont identifiées pour la première fois dans cette étude. Il s'agit de la β-défensine aviaire 11 (AvBD-11), des histones H1, H2, H3 et H4, et de la galline. Ce protéome identifie également pour la première fois dans le blanc, de nombreux composés décrits au préalable dans d'autres fluides biologiques tels que le plasma ou le fluide cérébrospinal.

D'Ambrosio *et al* (2008) ont utilisé des banques de ligands peptidiques pour identifier des protéines supplémentaires dans un mélange complexe tel que le blanc d'œuf. Cette méthode repose sur un traitement préalable à l'analyse protéomique, en réduisant la concentration des protéines majeures, tout en augmentant celle des espèces protéiques minoritaires. A partir des 20 acides aminés naturels, une banque d'hexapeptides contenant 64 millions de ligands est constituée, de manière à ce que chaque bille contienne un ligand différent avec plusieurs millions de copies de ce seul ligand. La banque est utilisée sur la base d'une séparation protéique par chromatographie d'affinité. La variété de combinaison des séquences disponibles est telle qu'à chaque protéine correspond un ligand présent dans la banque (Thulasiraman *et al* 2005). Lorsqu'une protéine est abondante, seule une quantité donnée de celle-ci peut se fixer au ligand correspondant et le reste est éliminé. A l'inverse, une protéine minoritaire pourra être concentrée à partir du milieu biologique de base. Après rinçage pour éliminer les protéines non liées ou faiblement affines, les protéines adsorbées sont éluées. La solution recueillie contient l'ensemble des protéines du milieu originel, chacune ayant une concentration proche des autres protéines. Le mélange de protéines ainsi obtenu est alors analysé par spectrométrie de masse. Soixante-dix protéines supplémentaires ont ainsi pu être caractérisées dans le blanc d'œuf portant à

148 le nombre de protéines identifiées dans le blanc d'œuf. Il est à noter que parmi ces 70 protéines nouvellement identifiées, 14 sont également présentes dans d'autres espèces animales. Cinq sont identifiées chez l'Homme (*Homo sapiens*), six chez la souris (*Mus musculus*), trois chez le rat (*Rattus norvegicus*), une chez le cobaye (*Cavia porcellus*), et une chez les bovins (*Bos taurus*). L'identification de ces protéines appartenant à d'autres espèces d'eucaryotes est probablement due au fait que 5-10% de la séquence génomique de la poule reste inconnue. Ces séquences correspondent donc à des zones conservées entre espèces, pour lesquelles seuls des identifiants d'autres eucaryotes sont disponibles. La fonction de ces 70 protéines supplémentaires n'a pas été déterminée et des études seront nécessaires pour définir leur rôle biologique dans l'œuf.

L'expression globale des gènes du magnum a été réalisée à l'aide de puces à ADNc. Elle a permis d'identifier 828 gènes spécifiquement exprimés dans ce tissu impliqué dans le dépôt des protéines du blanc (Gautron *et al* 2009). La caractérisation de ces transcrits est en cours d'étude et devrait permettre de compléter la liste des protéines caractérisées par une approche protéomique.

2.3 / Les protéines de la membrane vitelline

La membrane vitelline est une matrice extracellulaire de nature protéique qui entoure le jaune. Elle sépare le jaune de l'albumen et constitue la dernière barrière face à une infection microbienne du jaune. La membrane vitelline est constituée de 3 couches différentes : une couche interne au contact du jaune aussi appelée membrane périvitelline ou membrane vitelline interne, une fine couche intermédiaire et une partie externe au contact du blanc. Les composants de la membrane vitelline interne sont sécrétés par les cellules de la granulosa qui entoure l'oocyte sur le follicule. Les couches intermédiaires et externes sont déposées après ovulation du jaune dans l'infundibulum. Récemment, les protéines des membranes vitellines ont été séparées par électrophorèse 1D avant une analyse des bandes protéiques par spectrométrie de masse (Mann 2008). Un total de 137 protéines a été identifié dans ce milieu. Parmi ces 137 protéines, seules 13 étaient connues pour être présentes dans les membranes vitellines. Cette étude a donc permis d'identifier 124 nouveaux constituants protéiques dans ce compartiment de l'œuf. Il existe un grand nombre de protéines du jaune et du blanc d'œuf, pour lesquelles il est difficile de déterminer si elles sont constitutives des membranes ou présentes en tant que contaminants. Il est toutefois à noter que cette étude identifie l'ovomucine de blanc d'œuf, mais également une nouvelle mucine également décrite dans la coquille (Mann *et* al 2006). Cette étude montre que *vitellin membrane outer*-II, une protéine majeure de la couche externe des membranes vitellines, correspond à la β-défensine aviaire-11 (AvBD-11), un peptide antimicrobien également identifié dans la coquille et le blanc d'œuf (Mann *et al* 2006, Mann 2007). D'autres protéines potentiellement antibactériennes, telles que les protéines apparentées aux BPI (*bactericidal/permeability increasing proteins*), ou possédant des domaines immunoglobulines, sont caractérisées dans cette étude. Parmi les protéines identifiées dans la membrane vitelline, on notera la présence de protéines potentiellement impliquées dans la fonction de reproduction de l'oiseau. La membrane vitelline interne correspond à l'équivalent mammalien chez l'oiseau de la Zone Pellucide (ZP), pour laquelle les protéines ZP3/ZPC (Waclawek *et al* 1998, Takeuchi *et al* 1999), ZP1 (Bausek *et al* 2000), et ZPD (Okumura *et al* 2004) ont été mises en évidence. L'analyse protéomique des membranes vitellines (Mann 2008), permet de caractériser un total de huit protéines ZP correspondantes à ZPAX/ZP6B, ZPA/ZP2, ZPB/ZP4 ou similaires aux ZPC ou possédant le domaine C-terminal des protéines ZP. Le protéome de la membrane vitelline contient aussi des protéines impliquées dans le développement embryonnaire précoce. C'est le cas de l'*olfatomedin-1* qui joue un rôle dans la régulation du développement de l'ectoderme (Sakuragi *et al* 2006), de SLIT-2 impliquée dans la migration neuronale (Wong *et al* 2002), de CEPU-1 une molécule d'adhésion exprimée précocement dans le cerveau de l'embryon (Jungbluth *et al* 2001), et de semaphorin C3 qui joue un rôle dans le développement des tissus (Yazdani et Terman 2006). Les membranes vitellines contiennent également les ovocalyxines -36 et -32, deux protéines décrites comme étant spécifiques de la coquille minéralisée et pour lesquelles une fonction antimicrobienne a été suggérée (Gautron *et al* 2001b, 2007b, Xing *et al* 2007). Ces protéines pourraient être impliquées dans la défense chimique antibactérienne au sein des membranes vitellines. Enfin, deux ATPases (Na+/K+ transporting ATPase, ATP-diphosphohydrolase), ont été identifiées dans les membranes vitellines confirmant des mesures d'activité ATPasique réalisées dans les années 70 (Etheredge *et al* 1971).

2.4 / Les protéines du jaune

Le jaune est séparé du blanc par la membrane vitelline. Les constituants du jaune ont pour origine le foie, où ils sont synthétisés, puis transportés jusqu'à l'ovaire par la circulation sanguine. En utilisant l'électrophorèse 1D couplée à de la spectrométrie de masse LC-MS/MS, Mann et Mann (2008) ont identifié 119 protéines, dont 86 n'avaient pas été identifiées au préalable dans le jaune. Les protéines les plus abondantes sont l'albumine sérique, les produits de clivage de la vitellogénine, les apovitellines, les IgY et l'ovalbumine. Les protéines identifiées ont été classées en différents groupes, les protéines dérivées des vitellogénines et les apovitellines, les autres protéines de liaison aux lipides, les protéines de liaison aux vitamines, les protéases et inhibiteurs, les protéines sériques, les protéines aussi présentes dans le blanc d'œuf et le groupe des protéines diverses.

Le protéome de la partie soluble dans l'eau du jaune d'œuf a aussi été analysé en utilisant les banques de ligands peptidiques (Farinazzo *et al* 2009), comme décrit auparavant pour le blanc (D'Ambrosio *et al* 2008). Cette approche a permis d'identifier 255 protéines dont 54 étaient communes avec le protéome réalisé sur le jaune (Mann et Mann 2008). Au total, 316 protéines différentes de fonctions indéterminées ont été identifiées dans le jaune d'œuf.

Conclusion

Le développement récent des techniques à haut débit, renforcées par la publication de la séquence génomique de la poule et le développement des outils d'annotations fonctionnelles *in silico*, ont permis des avancées majeures dans l'identification et la caractérisation de nouveaux composés de l'œuf. Ce criblage constitue une excellente base pour explorer de nouvelles fonctions biologiques de protéines de l'œuf. La bioinformatique prédit des fonctions biologiques potentielles qui seront vérifiées après avoir purifié les candidats à partir de l'œuf, ou après production de protéines recombinantes ou de peptides de synthèse. Ce criblage n'est donc qu'une étape préliminaire de la caractérisation fonctionnelle. Cette identification facilitera aussi considérablement la compréhension de la régulation de la synthèse des constituants de l'œuf. Ces connaissances peuvent favoriser la mise en évidence dans l'œuf de composés ayant un intérêt pour la santé humaine ou animale, notamment ceux ayant un rôle dans les défenses antimicrobiennes

naturelles physiques et chimiques. Certaines de ces protéines pourraient aussi être des marqueurs biologiques utilisables pour la sélection de poules dont les œufs auraient des systèmes de protection renforcés (Dunn *et al* 2008). La compréhension du contrôle des facteurs ou des conditions d'élevages qui influencent leurs expressions et leurs niveaux d'activités, favorisera l'obtention d'œufs exempts de pathogènes et mieux armés contre les agressions microbiennes. Ces approches contribueront à la réduction des risques de toxi-infections alimentaires liées à la consommation d'œufs et ouvrent de nouveau horizons à une valorisation non alimentaire de dérivés de l'œuf.

Références

Anton M., Nau F., Nys Y., 2006. Bioactive egg components and their potential uses. World's Poult. Sci. J., 62, 429-438.

Bausek N., Waclawek M., Schneider W.J., Wohlrab F., 2000. The major chicken envelope protein ZP1 is different from ZBP and is synthesized in the liver. J. Biol. Chem., 275, 28866-28872.

Boardman P.E., Sanz-Ezquerro J., Overton I.M., Burt D.W., Bosch E., Fong W.T., Tickle C., Brown W.R., Wilson S.A., Hubbard S.J., 2002. A comprehensive collection of chicken cDNAs. Curr. Biol., 12, 1965-1969.

Carre W., Wang X.F., Porter T.E., Nys Y., Tang J.S., Bernberg E., Morgan R., Burnside J., Aggrey S.E., Simon J., Cogburn L.A., 2006. Chicken genomics resource: sequencing and annotation of 35,407 ESTs from single and multiple tissue cDNA libraries and CAP3 assembly of a chicken gene index. Physiol. Genomics, 25, 514-524.

D'Ambrosio C., Arena S., Scaloni A., Guerrier L., Boschetti E., Mendieta M.E., Citterio A., Righetti P.G., 2008. Exploring the egg white proteome with combinatorial peptide ligand libraries. J. Proteome Res., 7, 3461-3474.

Dunn I.C., Joseph N.T., Bain M., Edmond A., Wilson P.W., Nys Y., Gautron J., Schmutz M., Preisinger R., Waddington D., 2008. Polymorphisms in eggshell organic matrix genes are associated with eggshell quality measurements in pedigree Rhode Island Red hens. Anim. Genet., 40, 110-114

Dunn I.C., Wilson P.W., Lu Z., Bain M.M., Crossan C.L., Talbot R.T., Waddington D., 2009. New hypotheses on the function of the avian shell gland derived from microarray analysis comparing tissue from juvenile and sexually mature hens. Gen. Comp. Endocrinol., 163, 225-232.

Etheredge E., Haaland J.E., Rosenberg M.D., 1971. The functional properties of ATPases bound to and solubilized from the membrane complex of the hen's egg. Biochim. Biophys. Acta, 23, 361-372.

Farinazzo A., Restuccia U., Bachi A., Guerrier L., Fortis F., Boschetti E., Fasoli E., Citterio A., Righetti P.G., 2009. Chicken egg yolk cytoplasmic proteome, mined *via* combinatorial peptide lignad libraries. J. Chromatogr. A, 1216, 12141-12152.

Gautron J., Nys Y., 2007a. Function of eggshell matrix proteins. In: Bioactive egg compounds. Huopalahti R., Lopez-Fandino R., Anton M., Schade R., (Eds). Springer-Verlag, Allemagne, 109-115.

Gautron J., Nys Y., 2007b. Eggshell matrix proteins. In: Bioactive egg compounds. Huopalahti R., Lopez-Fandino R., Anton M., Schade R., (Eds). Springer-Verlag, Allemagne, 103-108.

Gautron J., Nys Y., 2010. Coquille et membranes coquillières. In : Science et technologie de l'œuf et des ovoproduits. Nau F., Guérin-Dubiard C., Baron F., Thapon J.L. (Eds). Editions Tec et Doc, Lavoisier, Paris, France, 2, 1-174.

Gautron J., Hincke M.T., Panhéleux M., Garcia-Ruiz J.M., Boldicke T., Nys Y., 2001a. Ovotransferrin is a matrix protein of the hen eggshell membranes and basal calcified layer. Connect. Tissue Res., 42, 255-267.

Gautron J., Hincke M.T., Mann K., Panhéleux M., Bain M., McKee M.D., Solomon S.E., Nys Y., 2001b. Ovocalyxin-32, a novel chicken eggshell matrix protein: Isolation, amino acid sequencing, cloning and immunocytochemical localization. J. Biol. Chem., 276, 39243-39252.

Gautron J., Nau F., Mann K., Guerin-Dubiard C., Rehault S., Hincke M.T., Nys Y., 2007a. Molecular approaches for the identification of novel egg components. World's Poult. Sci. J., 63, 82-90.

Gautron J., Murayama E., Vignal A., Morisson M., McKee M.D., Rehault S., Labas V., Belghazi M., Vidal M.L., Nys Y., Hincke M.T., 2007b. Cloning of ovocalyxin-36, a novel chicken eggshell protein related to lipopolysaccharide-binding proteins, bactericidal permeability-increasing proteins, and plunc family proteins. J. Biol. Chem., 282, 5273-5286.

Gautron J., Réhault-Godbert S., Jonchère V., Cogburn L.A., Hennequet C., Sibut V., Hervé V., Nys Y., 2008. transcriptional profiling to identify novel antimicrobial egg proteins. Proc. XXIII World's Poultry Congr., Brisbane, Australie, 2008/06/30-07/04, World\'s Poultry Science Association, Australian Branch, 4p.

Gautron J., Mann K., Righetti P.G., Réhault-Godbert S., Jonchère V., Hervé-Grépinet V., Nys Y., 2009. Functional genomics reveals numerous novel egg proteins. Proc. XIII Eur. Symp. Quality of Eggs and Egg Products 21-25 June 2009, Turku Finland, WPSA, Finish branch, PL27.pdf.

Guérin-Dubiard C., Pasco M., Mollé D., Désert C., Croguennec T., Nau F., 2006. Proteomic analysis of hen egg white. J. Agric. Food Chem., 54, 3901-3910.

Hao J. J., Narayanan K., Muni T., Ramachandran A., George A., 2007. Dentin matrix protein 4, a novel secretory calcium-binding protein that modulates odontoblast differentiation. J. Biol. Chem., 282, 15357-15365.

Hervé-Grépinet V., Réhault-Godbert S., Gautron J., Hincke M.T., Mine Y., Nys Y., 2009 Avian antimicrobial peptides in hen reproductive tract and egg. Proc. XIII Eur. Symp. Quality of Eggs and Egg Products 21-25 June 2009, Turku Finland, WPSA, Finish Branch, PL13.pdf.

Hernandez-Hernandez A., Vidal M.L., Gomez-Morales J., Rodriguez-Navarro A.B., Labas V., Gautron J., Nys Y., Garcia-Ruiz J.M., 2008. Influence of eggshell matrix proteins on the precipitation of calcium carbonate (CaCO3). J. Crystal Growth, 310, 1754-1759.

Hincke M.T., 1995. Ovalbumin is a component of the chicken eggshell matrix. Connect. Tissue Res., 31, 227-233.

Hincke M.T., Tsang C.P., Courtney M., Hill V., Narbaitz R., 1995. Purification and immunochemistry of a soluble matrix protein of the chicken eggshell (ovocleidin 17). Calcif. Tissue Int., 56, 578-83.

Hincke M.T., Gautron J., Tsang C.P., McKee M.D., Nys Y., 1999. Molecular cloning and ultrastructural localization of the core protein of an eggshell matrix proteoglycan, ovocleidin-116. J. Biol. Chem., 274, 32915-32923.

Hincke M.T., Gautron J., Panheleux M., Garcia-Ruiz J.M., McKee M.D., Nys Y., 2000. Identification and localization of lysozyme as a component of the eggshell membranes and shell matrix. Matrix Biol., 19, 443-453.

Hincke M.T., Wellman-Labadie O., McKee M. D., Gautron J., Nys Y., Mann K., 2008. Biosynthesis and structural assembly of eggshell components. In: Bioscience and biotechnology. Mine Y. (Ed). Egg John Willey & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 97-128.

International Chicken Genome sequencing Consortium, 2004. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. Nature, 432, 695-716.

Jonchère V., Réhault-Godbert, S., Hennequet-Antier, C., Cabau, C., Sibut, V., Cogburn, L., Nys, Y., Gautron J., 2010. Gene expression profiling to identify eggshell proteins involved in the physical defence of the chicken egg. BMC Genomics, 11, 57.

Jungbluth S., Phelps C., Lumsden A., 2001. CEPU-1 expression in the early embryonic chick brain. Mech. Dev., 1001, 195-197.

Li-Chan E., Nakai S., 1989. Biochemical basis for the properties of egg white. Crit. Rev. Poult. Biol., 2, 21-58.

Li-Chan E.C.Y., Powrie, W.D., Nakai S., 1995. The chemistry of eggs and egg products. In: Egg Science and Technology. Stadelman W.J., Cotterill O.J. (Eds). Haworth Press, New-York, USA, 105-175.

Mann K., 2007. The chicken egg white proteome. Proteomics, 7, 3558-3568.

Mann K., 2008. Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. Proteomics, 8, 2322-2332.

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

Mann M., Steen H., 2004. The ABC's and XYZ's of peptide sequencing. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 5, 699-711.

Mann K., Gautron J., Nys Y., McKee M.D., Bajari T., Schneider W.J., Hincke MT., 2003. Disulfide-linked heterodimeric clusterin is a component of the chicken eggshell matrix and egg white. Matrix Biol., 22, 397-407.

Mann K., Macek B., Olsen J.V., 2006. Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer. Proteomics, 6, 3801-3810.

Mann K., Olsen J.V., Macek B., Gnad F., Mann M., 2007. Phosphoproteins of the chicken eggshell calcified layer. Proteomics, 7, 106-115.

Mann K., Olsen J.V., Macek B., Gnad F., Mann F., 2008. Identification of new chicken egg proteins by mass spectrometry-based proteomic analysis. World's Poult. Sci. J., 64, 209-218.

Marillat V., Cases O., Nguyen-Ba-Charvet K.T., Tessier-Lavigne M., Sotelo C., Chédotal A., 2002. Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. J. Comp. Neurol., 442, 130-155.

Mine Y., Kovacks-Nolan J., 2006. New insights in biologically active proteins and peptides derived from hen egg. World's Poult. Sci. J., 62, 87-95.

Mine Y., D'Silva I., 2008. Bioactive components in egg white. In: Bioscience and biotechnology, Mine Y. (Ed). Egg John Willey & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 141-184.

Miksik I., Charvatova J., Eckhardt A., Deyl Z., 2003. Insoluble eggshell matrix proteins - their peptide mapping and partial characterization by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. Electrophoresis, 24, 843-852.

Miksik I., Eckhardt A., Sedlakova P., Mikulikova K., 2007. Proteins of Insoluble Matrix of Avian (*Gallus Gallus*) Eggshell. Connect. Tissue Res., 48, 1-8.

Nys Y., 2010. Structure et formation de l'œuf. chap 5, In : Science et technologie de l'œuf et des ovoproduits. Nau F., Guérin-Dubiard C., Baron F., Thapon J.L. (Eds). Editions Tec et Doc, Lavoisier, Paris, France, 1, Chap. 5, 161-249.

Nys Y., Sauveur B., 2004. Valeur nutritionnelle des oeufs. INRA Prod. Anim., 17, 385-393.

Nys Y., Hincke M.T., Arias J.L., Garcia-Ruiz J.M., Solomon S.E., 1999. Avian eggshell mineralization. Poult. Avian Biol. Rev., 1999, 10, 143-166.

Nys Y., Gautron J., Garcia Ruiz J. M., Hincke, M.T., 2004. Avian Eggshell minéralization : biochimical and fonctional characterization of matrix proteins. C.R. Palevol., 3, 549-562.

Okumura H., Kohno Y., Iwata Y., Mori H., Aoki, N., Sato C., Kitajima K., Nadano D., Matsuda T., 2004. A newly identified zona pellucida glycoprotein, ZPD, and dimeric ZP1 of chicken egg envelope are involved in sperm activation on sperm-egg interaction. Biochem. J., 384, 191-199.

Pines M., Knopov V., Bar A., 1994. Involvement of osteopontin in egg shell formation in the laying chicken. Matrix Biol., 14, 765-771.

Potapov V., Sobolev V., Edelman M., Kister A., Gelfand I., 2004. Protein-protein recognition: juxtaposition of domain and interface cores in immunoglobulins and other sandwich-like proteins. J. Mol. Biol., 342, 665-679.

Raikos V., Hansen R., Campbell L., Euston S.R., 2006. Separation and identification of hen egg protein isoforms using SDS-PAGE and 2D gel electrophoresis with MALDI-TOF mass spectrometry. Food Chem., 99, 702-710.

Réhault S., Anton M., Nau F., Gautron J., Nys Y., 2007. Les activités biologiques de l'oeuf. INRA Prod. Anim., 20, 337-348.

Sakuragi M., Sasai N., Ikeya M., Kawada M., Onai T., Katahira T., Nakamura H., Sasai Y., 2006. Functional analysis of chick ONT1 reveals distinguishable activities among olfactomedin-related signaling factors. Mech. Dev., 123, 114-123.

Seuss-Baum I., 2007. Nutritional evaluation of egg compounds. In: Bioactive egg compounds. Huopalahti R., Lopez-Fandino R., Anton M., Schade R. (Eds), Springer-Verlag, Allemagne, 117-144.

Takeuchi Y., Nishimura K., Aoki N., Adachi T., Sato C., Kitajima K., Matsuda T., 1999. A 42-kDa glycoprotein from chicken egg-envelope, an avian homolog of the ZPC family glycoproteins in mammalian zona pellucida. Its first identification, cDNA cloning and granulosa cell-specific expression. Eur. J. Biochem., 260, 736-742.

Thulasiraman V., Lin S. H., Gheorghiu L., Lathrop J., Lomas L., Hammond D., Boschetti E., 2005. Reduction of the concentration difference of proteins in biological liquids using a library of combinatorial ligands. Electrophoresis, 26, 3561-3571.

Waclawek M., Foisner R., Nimpf J., Schneider W.J., 1998. The chicken homolog of zona pellucida protein 3 is synthesized by granulosa cells. Biol. Reprod., 59, 1230-1239.

Wellman-Labadie O. R., Lakshminarayanan R., Hincke M.T., 2008. Antimicrobial properties of avian eggshell-specific C-type lectin-like proteins. FEBS Letters, 582, 699-704.

Wong K., Park H.T., Wu J.Y., Rao Y., 2002. Slit proteins: Molecular guidance cues for cells ranging from neurons to leukocytes. Curr. Opin. Genet. Dev., 12, 583-591.

Xing J., Wellman-Labadie O., Gautron J., Hincke M.T., 2007. Recombinant eggshell ovocalyxin-32: Expression, purification and biological activity of the glutathione S-transferase fusion protein. Comp. Biochem. Physiol. B, 147, 172-177.

Yazdani U., Terman J.R., 2006. The semaphorins. Genome Biol., 7, 211.

Résumé

L'œuf de poule est le lieu de développement de l'embryon, mais aussi un aliment de base et une source importante de molécules dotées d'activités biologiques largement utilisées en santé humaine et dans les industries agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. L'identification des protéines de l'œuf initialement réalisée par des techniques classiques de biochimie, a connu un essor considérable grâce aux développements d'outils d'analyse à haut débit, la publication de la séquence génomique de la poule et l'essor de la bioinformatique. Dans cette revue, nous décrirons quel est l'apport de la génomique fonctionnelle et comment l'analyse transcriptomique et protéomique constituent des avancées majeures dans la connaissance des protéines de l'œuf. Ces avancées ont permis en quelques années l'identification et la caractérisation dans les différents compartiments de l'œuf de centaines de nouveaux composés aux fonctions riches et variées. Des études expérimentales supplémentaires seront nécessaires pour explorer les fonctions des composés nouvellement identifiés dans l'œuf. Ces nouvelles molécules constituent potentiellement des composés biologiquement actifs aux propriétés bénéfiques pour l'Homme ou l'animal. Certains de ces composés pourront être utilisés comme marqueurs biologiques dont le polymorphisme d'un nucléotide simple (SNP) permettra de développer une Sélection Assistée par Marqueurs (SAM) pour améliorer les défenses naturelles de l'œuf et réduire le risque de toxi-infections alimentaires humaines.

Abstract

High-throughput technology (proteomics and transcriptomics) to identify and functionally characterise new egg proteins

The avian egg is a nutritious food and also a major source of biologically active compounds that are beneficial for human health. These biologically active molecules are widely used by pharmaceutical, cosmetic and food industries. Egg proteins were previously studied using classical biochemical techniques. The development of high-throughput techniques, the recent publication of the chicken genome sequence, and the development of new bioinformatics tools are major scientific advances leading to the identification

and characterisation of a number of minor egg components, which were not previously identified. We illustrate in this review the most recent developments in egg biochemistry (proteomics) and molecular biology (transcriptomics) using recent data on the characterisation of egg proteins. Further experimental studies have been initiated to explore the functional properties of these novel egg proteins. The newly identified molecules may be a source of useful active compounds beneficial for human and animal health. They may be putative biological markers, the single nucleotide polymorphisms (SNP) of which could be used in marker-assisted genetic selection (MAS), to improve egg defencs and to reduce the risk of food-borne disease outbreaks in humans.

GAUTRON J., RÉHAULT-GODBERT S., JONCHÈRE V., HERVÉ-GRÉPINET V., MANN K., NYS Y., 2010. L'apport des techniques à haut débit (protéomique et transcriptomique) dans l'identification et la caractérisation fonctionnelle des protéines de l'œuf. In : Numéro Spécial, Qualité de l'œuf. Nys Y. (Ed). Inra Prod. Anim., 23, 133-142.