HAL
open science

Minéralisation de la coquille de l'œuf : Caractérisation biochimique et fonctionnelle de sa matrice

Joël Gautron, Karlheinz Mann, J.-M. García-Ruiz, Max Hincke, Yves Y. Nys

To cite this version:

Joël Gautron, Karlheinz Mann, J.-M. García-Ruiz, Max Hincke, Yves Y. Nys. Minéralisation de la coquille de l'œuf : Caractérisation biochimique et fonctionnelle de sa matrice. 13èmes journées de la société française de la biologie des tissus minéralisés, May 2011, Paris, France. hal-02744713

HAL Id: hal-02744713

https://hal.inrae.fr/hal-02744713

Submitted on 3 Jun 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.

Minéralisation de la coquille de l'œuf : Caractérisation biochimique et fonctionnelle de sa matrice

J. Gautron, **Y. Nys**
INRA, Fonction et régulation des protéines de l'œuf, UR83 Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly

K. Mann
Max planck institute fur biochemie, Martinsried, Allemagne

J.M. Garcia-Ruiz
CSIC, Universidad de Granada, Espagne

M.T. Hincke
Department of cellular and molecular medicine, Ottawa, Canada

JFBTM 2011

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

INRA

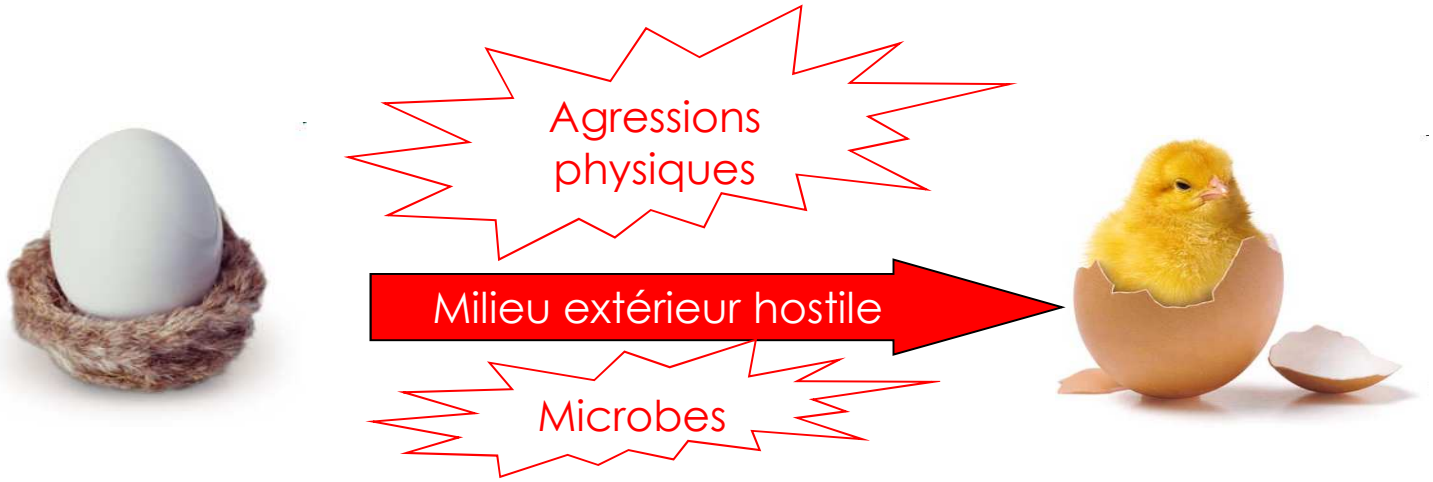
L'œuf des oiseaux

Chambre isolée pour permettre le développement de l'embryon

Doit contenir la totalité des composants nécessaires au développement embryonnaire

→ **Éléments nutritionnels parfaitement équilibrés**

Ingrédient de base pour la consommation humaine



→ **Systèmes de protection (défenses naturelles de l'œuf)**

L'œuf des oiseaux

Chambre isolée pour permettre le développement de l'embryon

- **Source majeure de composés avec un large spectre d'activités biologiques dans le jaune, la membrane vitelline, le blanc et la coquille**
  - → Transport lipides, ions ….
  - → Processus inflammatoires et anti-oxydants
  - → Développement embryonnaire
  - → Défenses naturelles de l'œuf
    - ✓ Biominéralisation de la coquille d'œuf (défense physique)
    - ✓ Molécules antimicrobiennes (défense chimique)

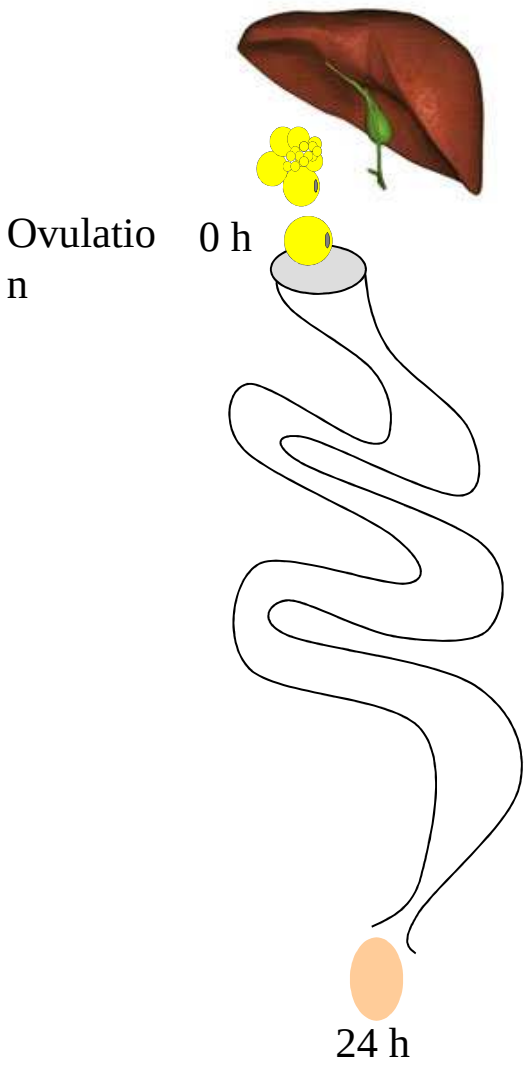
- **Potentiel pour les industries pharmaceutiques, cosmétiques, agroalimentaires et pour la santé humaine et animale**

→ **Valorisation alimentaire et non alimentaire de l'oeuf**

Comprendre et améliorer les défenses naturelles de l'oeuf

→ ***Identifier et caractériser les protéines de l'oeuf***

La formation de l'œuf



Foie
Protéines du jaune
(maturité sexuelle)

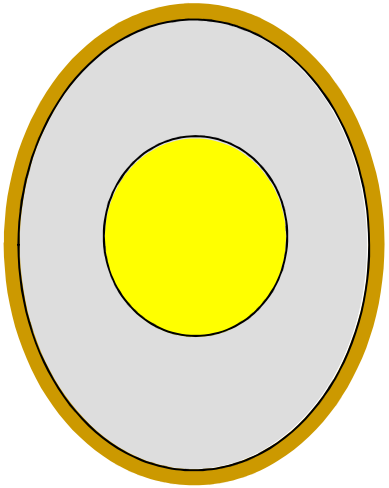
Ovaire

infundibulum
Membranes vitellines
(< 1 h)

Magnum
Protéines du blanc
(1h – 4h30)

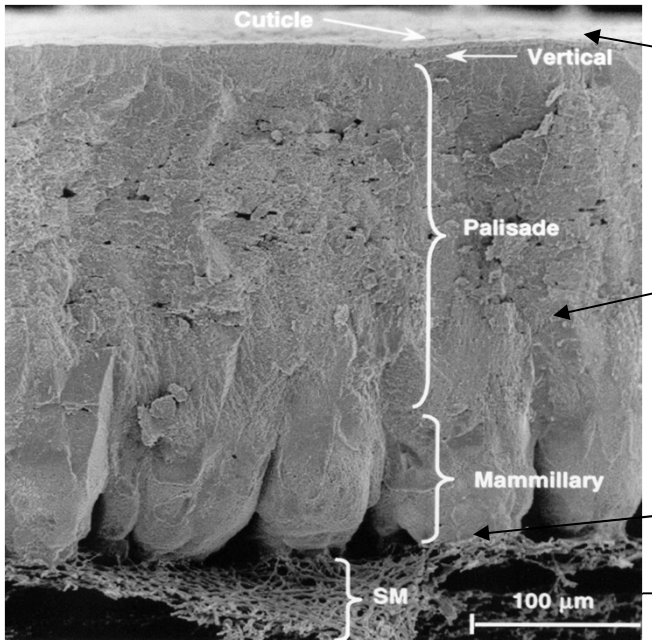
Isthme
Membranes coquilliières
(4h30-6h)

Utérus
Calcification de la coquille
(6h – 24 h)



ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT
INRA

La coquille (défense physique)

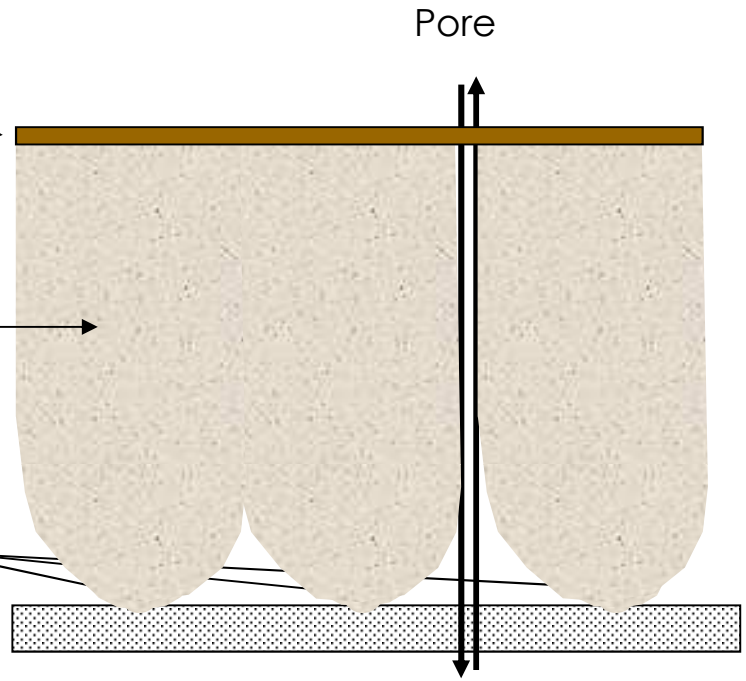


Cuticule

Couche palissadique

Noyaux mamillaires

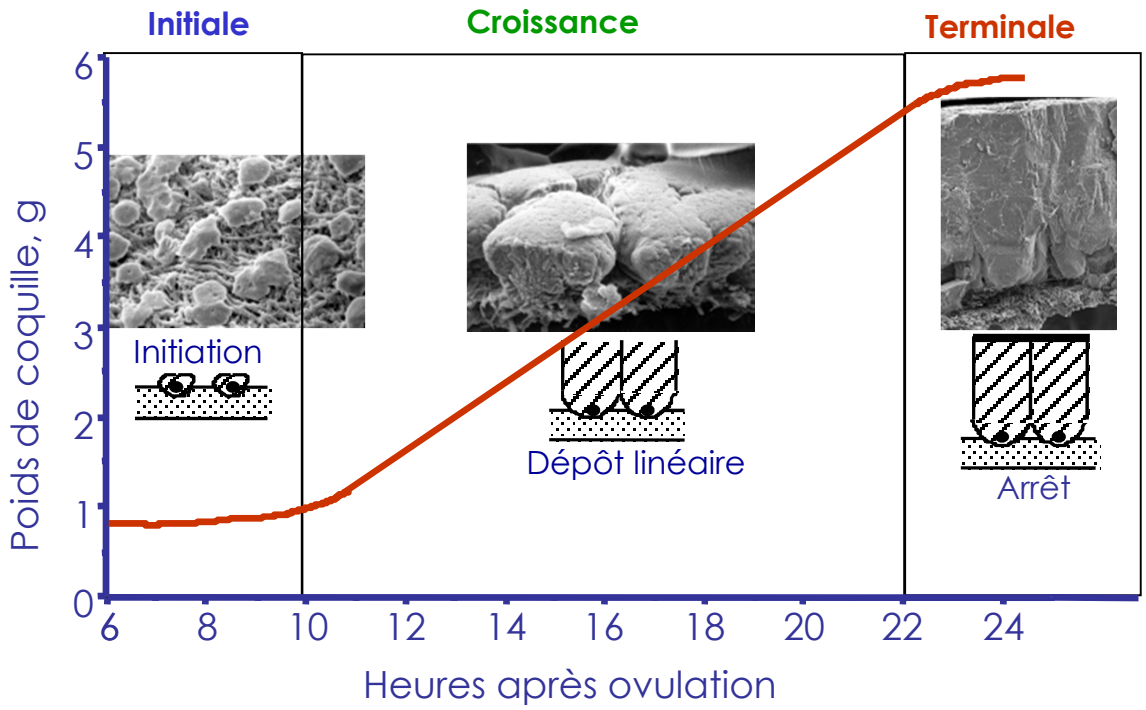
Membranes coquillières



La coquille (défense physique)

→ **Minéralisation de la coquille se produit dans l'utérus (fluide utérin)**

Milieu hypersaturé en calcium et carbonates

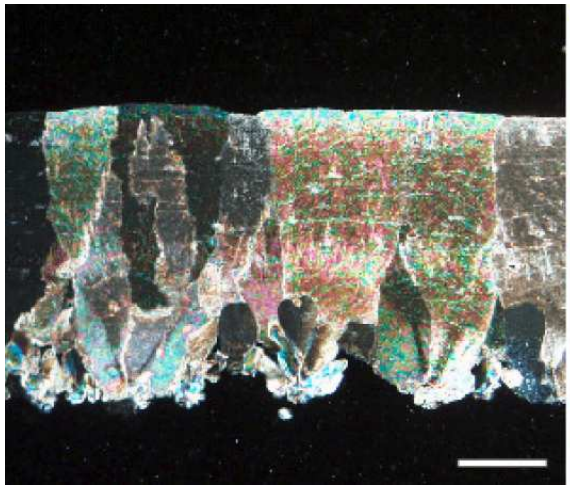


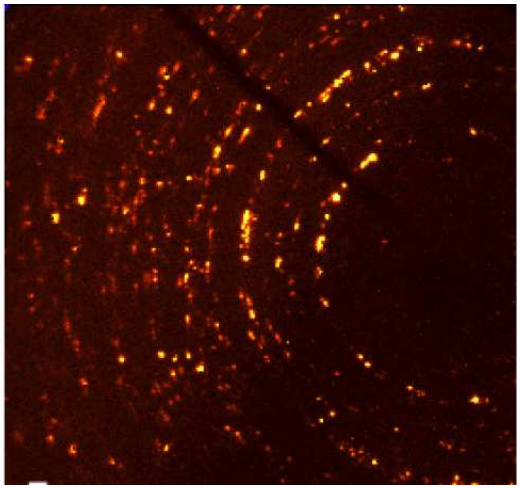
Microstructure de La coquille

Variabilité de la microstructure des coquilles selon les espèces d'oiseaux.

Poule pondeuse

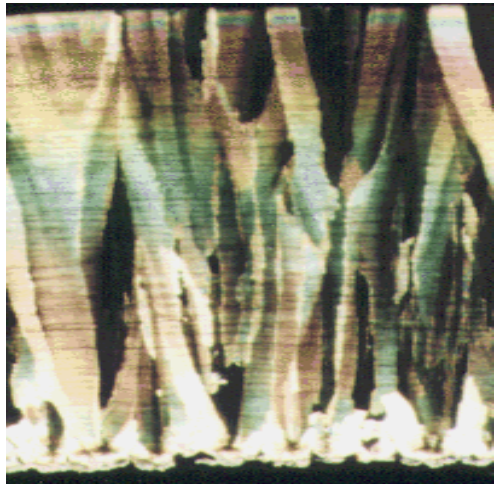
Larges colonnes de cristaux de calcite faiblement orientés

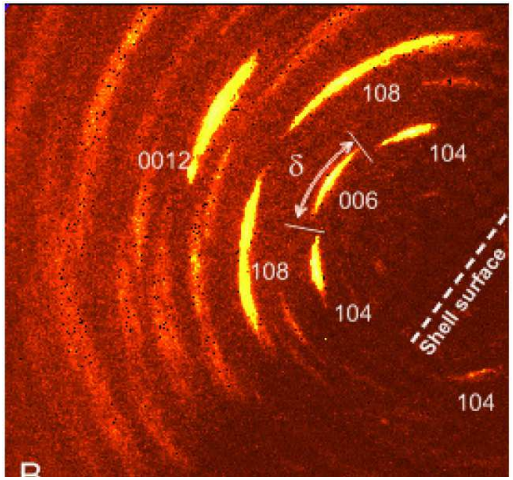




Autruche

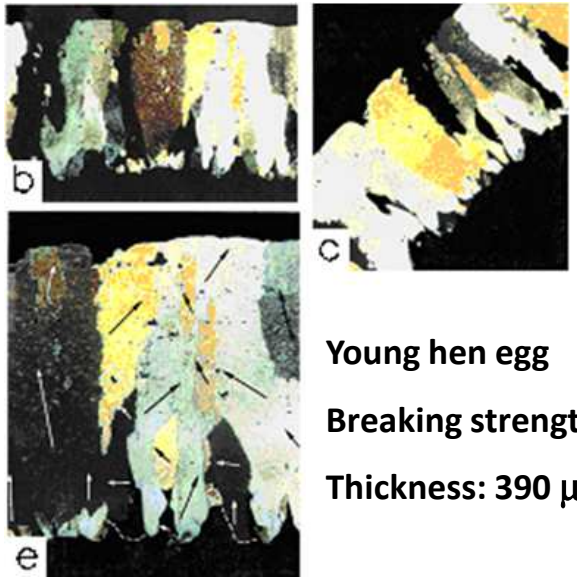
Colonnes étroites de cristaux de calcite fortement orientés





Microstructure de La coquille

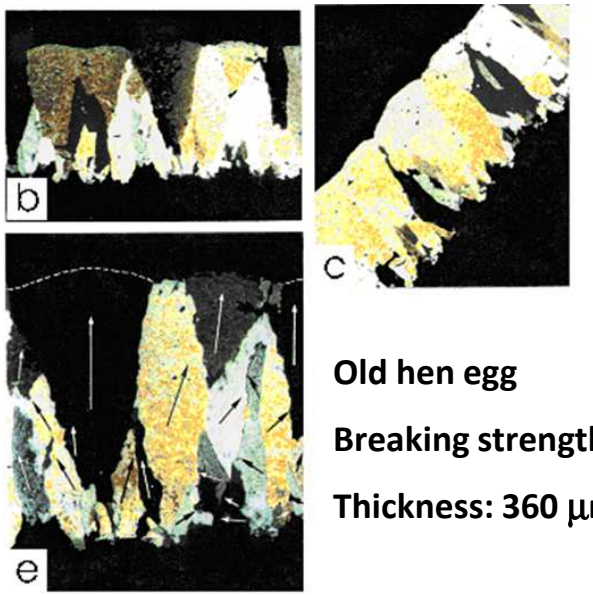
Les caractéristiques microstructurales de la coquille ont une forte influence sur la résistance à la rupture et l'intégrité de la coquille



Young hen egg

Breaking strength: 35 N

Thickness: 390 µm



Old hen egg

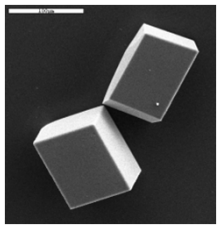
Breaking strength: 4 N

Thickness: 360 µm

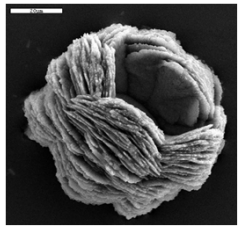
La coquille (défense physique)

→ **95% de carbonate de calcium sous forme de calcite**

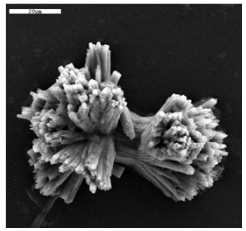
Calcite



Aragonite



Vatérite



Quantité

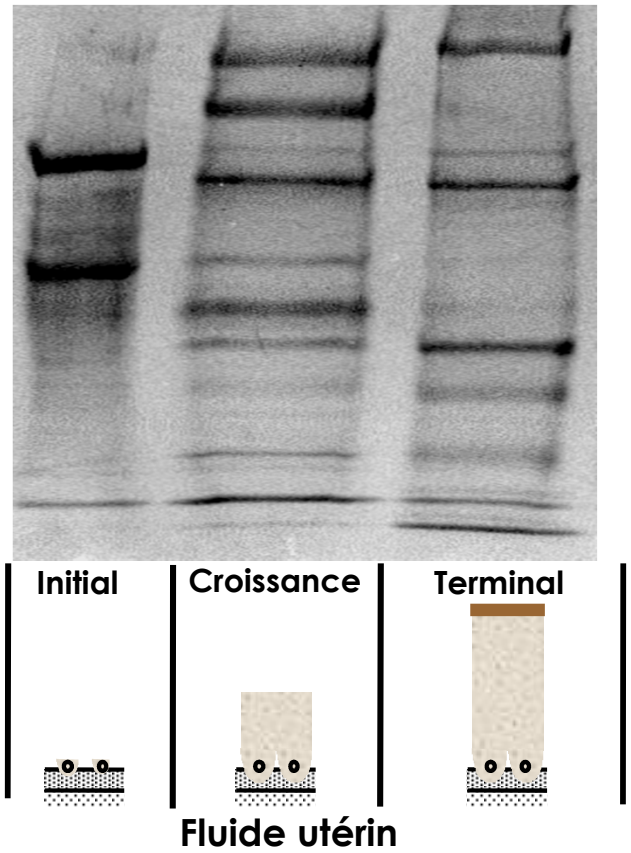
Interaction

Propriétés mécaniques
- Environ 300 µm d'épaisseur
- Résiste à 4 kg de pression

Contrôle du processus de calcification

→ **3,5% de matière organique (matrice organique)**
Protéines et protéoglycanes

Protéines de la matrice et minéralisation de la coquille



Composition variable du fluide utérin au cours du processus de calcification

↓

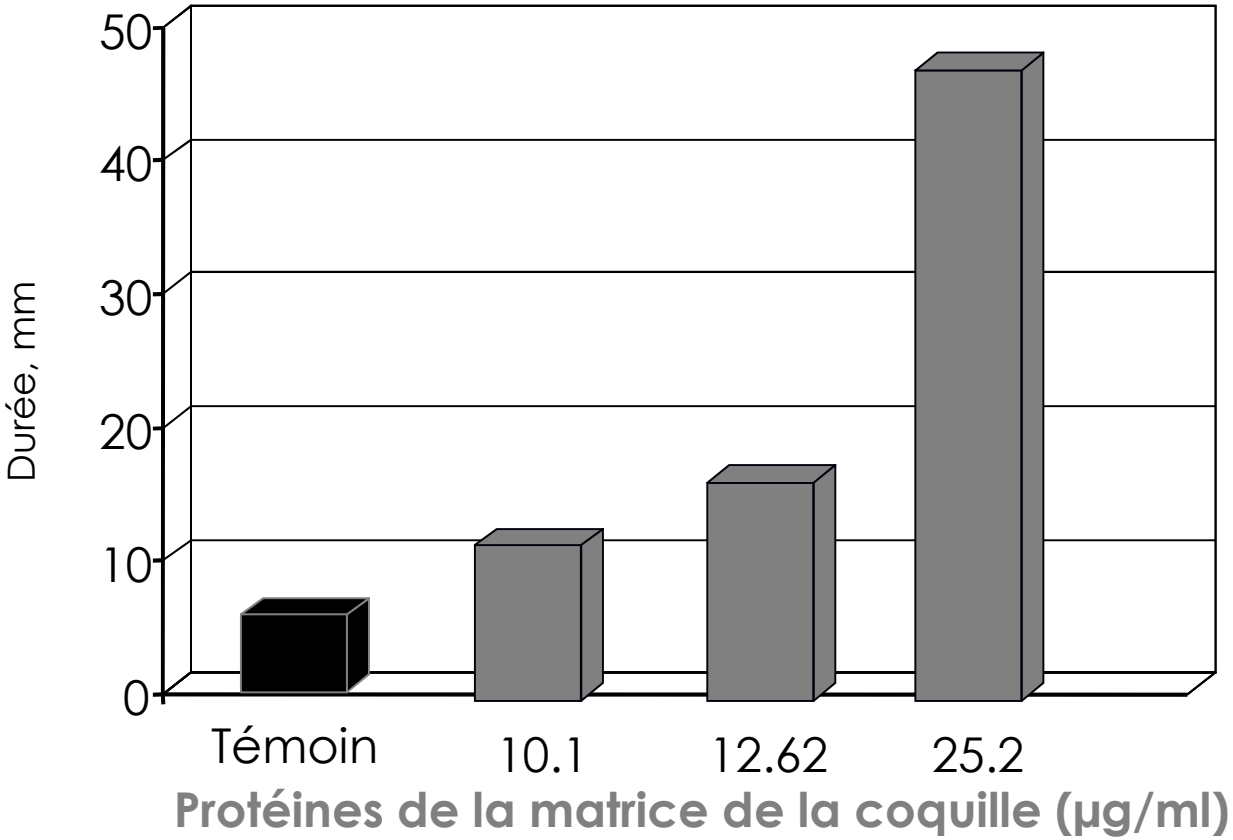
Adaptation du contenu organique selon le stade de minéralisation

Connect. Tissue. Res., 1997, 36, 195-210

Fonction des protéines de la matrice

Protéines de la matrice et minéralisation de la coquille

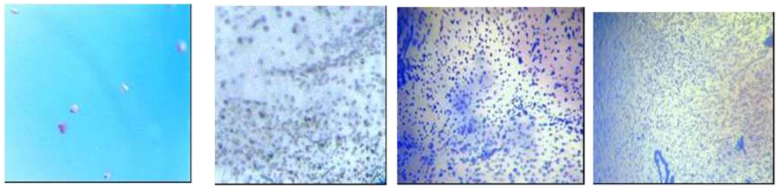
Cinétique *in vitro* de precipitation du $CaCO_3$



ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT
INRA

Protéines de la matrice et minéralisation de la coquille

Augmente le nombre de cristaux



Témoins 40 cristaux | Initiale | Croissance | Terminale

Fluide utérin >10 000 cristaux

Augmente la cinétique de nucléation des cristaux

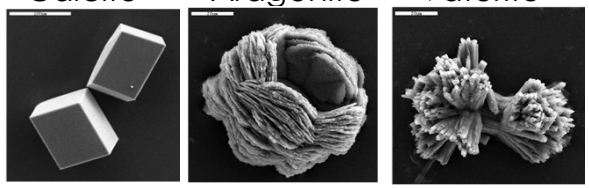
Temps nécessaire pour observer les premiers cristaux

Témoins	900 minutes
Fluide utérin	**< 10 secondes**

Effet du fluide utérin sur la croissance de la calcite *in vitro*

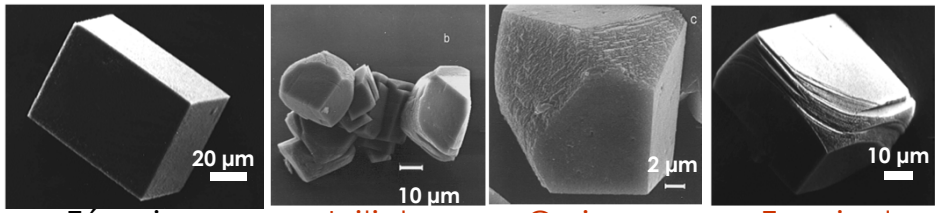
(Poultry Sci., 2000, 79, 901-907 ; J. Crystal Growth, 2008, 310, 1754-1759 ; Cryst. Growth. Des., 2008, 8, 4330-4339)

Favorise la calcite comme type polymorphique



	Calcite	Aragonite	Vatérite
Témoins (%)	**55**	**22.5**	**22.5**
Fluide utérin (%)	**100**	**0**	**0**

Modifie la morphologie des cristaux de calcite



Témoin | Initiale | Croissance | Terminale

Fluide utérin

Fonction des protéines de la matrice

Protéines de la matrice et minéralisation de la coquille

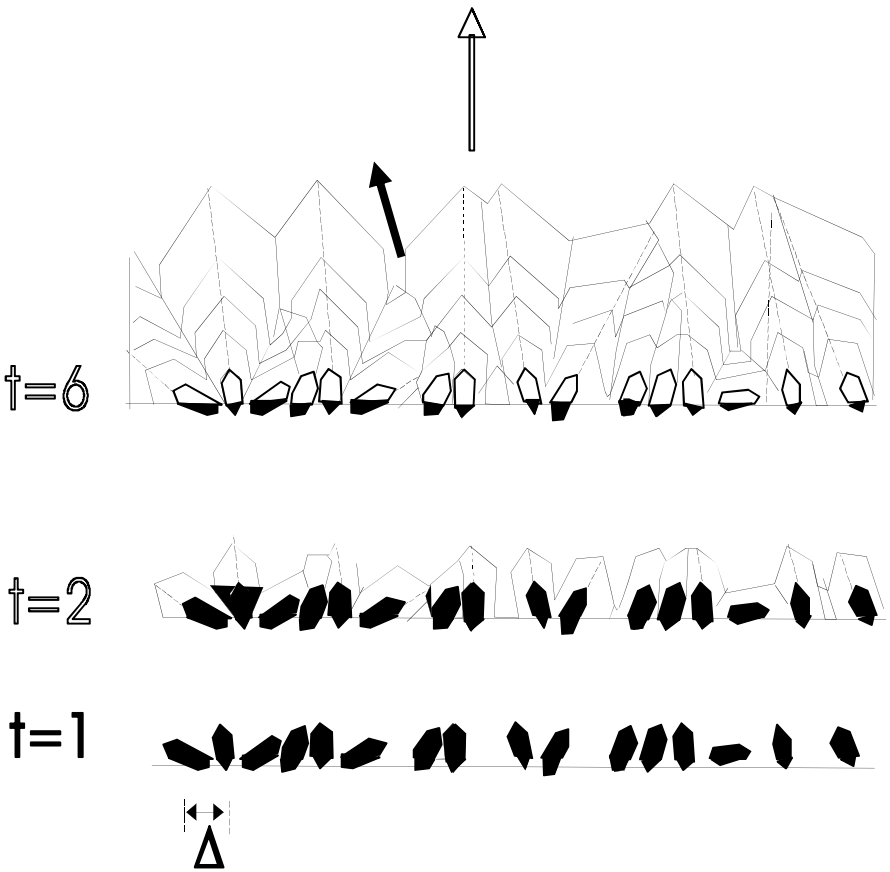
Interaction de la matrice avec la phase minérale (approche *in vivo*)

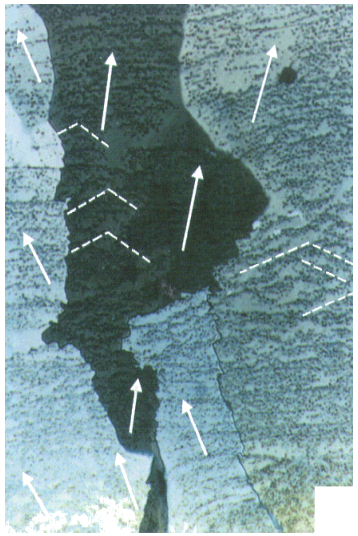
Relation quantitative entre protéines spécifiques de la matrice et qualité de coquille

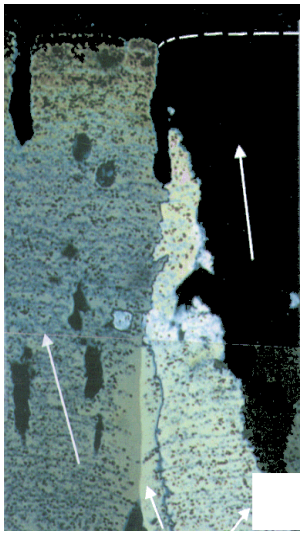
	Avant mue (Coquille fragile)		Après mue (Coquille solide)
Poids de coquille (g)	**6.24**		**6.22**
Résistance à la rupture (N)	**28.1**	***	**36.7**
Taille des cristaux (µm)	**72**	***	**58**
Protéines spécifiques de la coquille	↘	***	↗

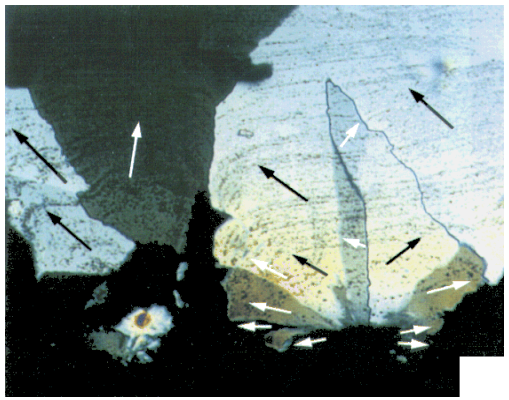
La coquille (défense physique)

Séquence temporale de la nucléation, de la croissance et génération d'une orientation privilégiée des cristaux et de la microstructure









C. R. Palevol (2004), 3, 549-562

Les protéines de la matrice organique

- Caractériser les protéines de la matrice
- Établir lesquelles jouent un rôle crucial lors du processus de minéralisation

Les protéines initialement identifiées dans le blanc d'œuf

Le lysozyme
L'ovotransferrine
L'ovalbumine

Les protéines ubiquitaires

La clusterine
L'ostéopontine,
NEFA

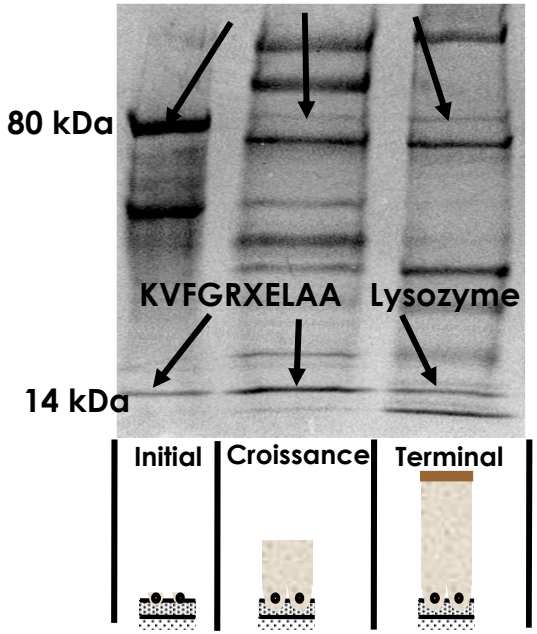
Les protéines spécifiques

L'ovocleidin-17
L'ovocleidine-116
L'ovocalyxine-32
L'ovocalyxine-36
L'ovocalyxine-25
L'ovocalyxine-21

Les protéines initialement identifiées dans le blanc d'œuf

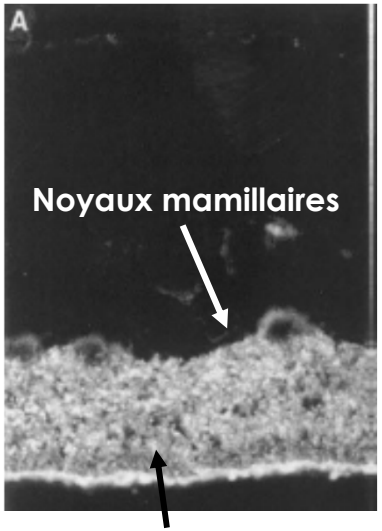
→ **lysozyme** *(Matrix Biol., 2000, 19, 443-453)* **et ovotransferrine** *(Connect. Tissue. Res., 2001, 42, 225-267)*

APPKSVIRXXTISS Ovotransferrine



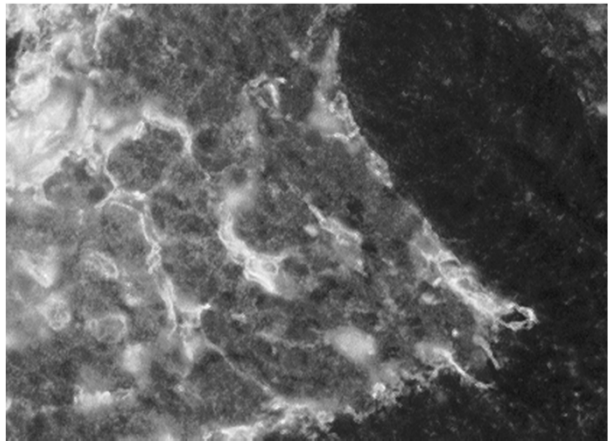
Fluide utérin

Localisation du lysozyme et de l'ovotransferrine dans la coquille



Membranes coquillières

Origine utérine du lysozyme et de l'ovotransferrine



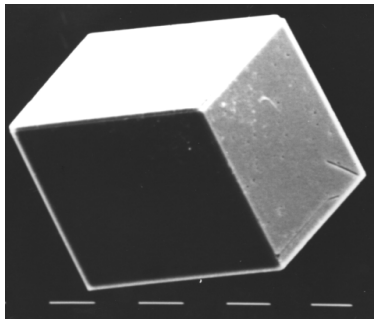
- **Présentes dans la coquille**
- **Sécrétées par les tissus où se forme la coquille**

Les protéines initialement identifiées dans le blanc d'œuf

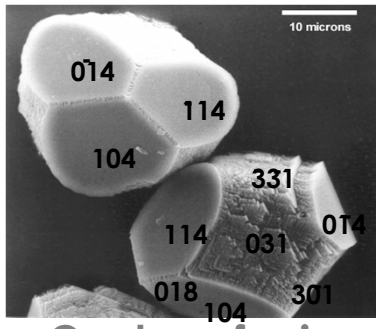
→ **Lysozyme** *(Matrix Biol., 2000, 19, 443-453)* **et ovotransferrine** *(Connect. Tissue. Res., 2001, 42, 225-267)*

➢ **Jouent un rôle dans la protection physique de l'œuf et de l'embryon**

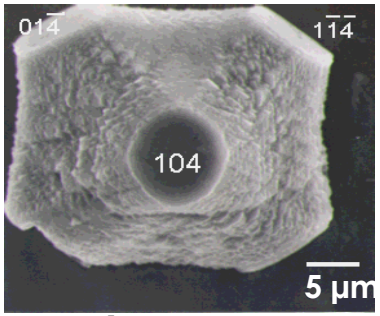
Interaction avec le carbonate de calcium



Témoin



Ovotransferrine



Lysozyme

➢ **Jouent un rôle antimicrobien (protection chimique de l'œuf et de l'embryon)**

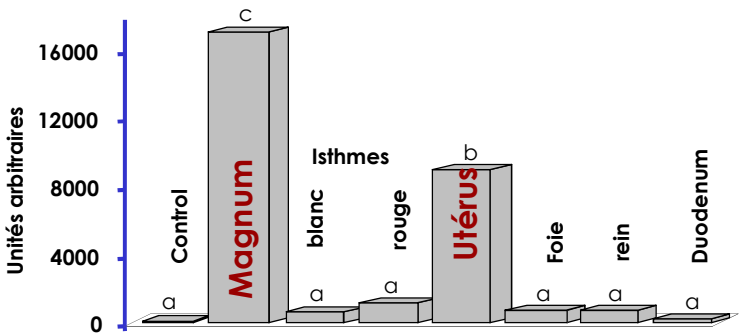
* **Ovotransferrine** → Inhibe la croissance des bactéries par privation de fer

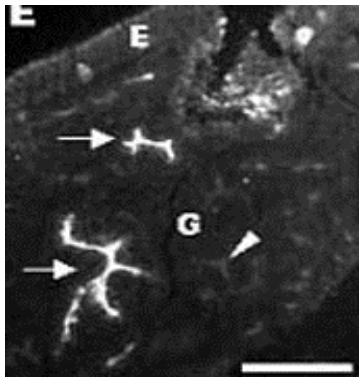
* **Lysozyme** → Hydrolyse la paroi des bactéries

Les protéines ubiquitaires

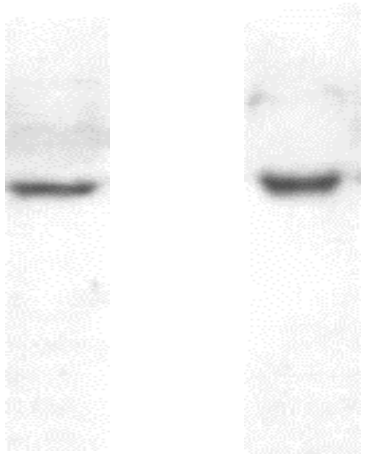
→ **Clusterine** *(Matrix Biol, 2003, 22, 397-407)*

Isolée de la coquille par chromatographie de phase inverse et par criblage d'expression.





Détection par Immunofluorescence de la clusterine dans le magnum



Magnum **Blanc d'oeuf**

Western blot de la clusterine

- **Protéine nouvellement identifiée dans le blanc**
- **Protéine chaperonne** **(contrôle de l'agrégation et de la précipitation de la matrice)**

Les protéines spécifiques de la coquille

→ **Ovocleidin -116** *(J. Biol. Chem., 1999, 274, 32915-32923)*
→ **Ovocalyxines -25 et -21** *(Bioactive egg compounds, 109-115. Springer-Verlag (Ger))*
→ **Ovocalyxine -32** *(J. Biol. Chem., 2001, 276, 39243-39252)* **(1/3)**

➢ **Nouvelles séquences protéiques non identifiées au préalable**

Ovo= Œuf, Calyx=Coquille

Séquences protéiques de l'OCX-32

Séquence N terminale

ERLPWPQVPGVMHPLNPKHREAV

Séquences peptidiques internes

CB3	GLAIVGSSH(I)
CB4	YLV
	ERLPW
K1	X(Q)IRK
K2	(G)NF
K3	KSPXVVHAK
K4	DNAVAFK
K5	X(Q)IRXDNAVAFK
K6a	(Q)IQEED(HR)FYE(YLQ)
K6b	KQIQEED HR FYE(YLQ)
K7a	KQSTEHTGYLLAQVSS(V)K
K7b	QSTEHTGYLLAQVSS(V)K
K8	YLVWTLGHPIRVK
K9	FIVLLHEIPTQQLNVX(H)
K10	KPITANYIPDS(N)GNIA(HDH)

Traduction en séquences nucléotidiques (code dégénéré)

↓

Recherche dans les bases de données (tblastN)

↓

Identification et assemblage des séquences EST correspondantes

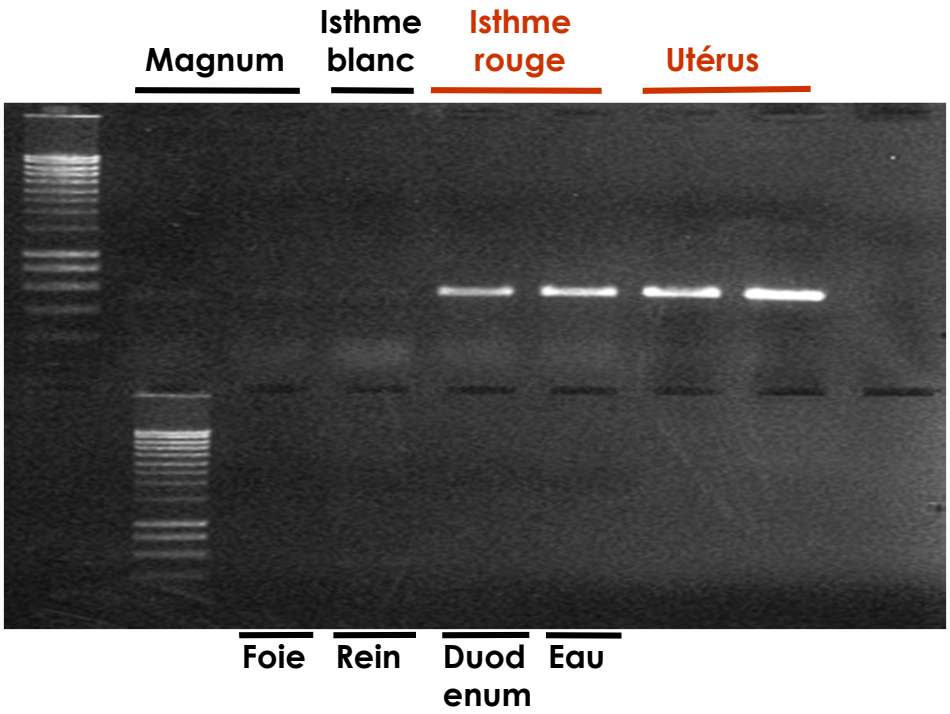
↓

Traduction en protéine du cDNA

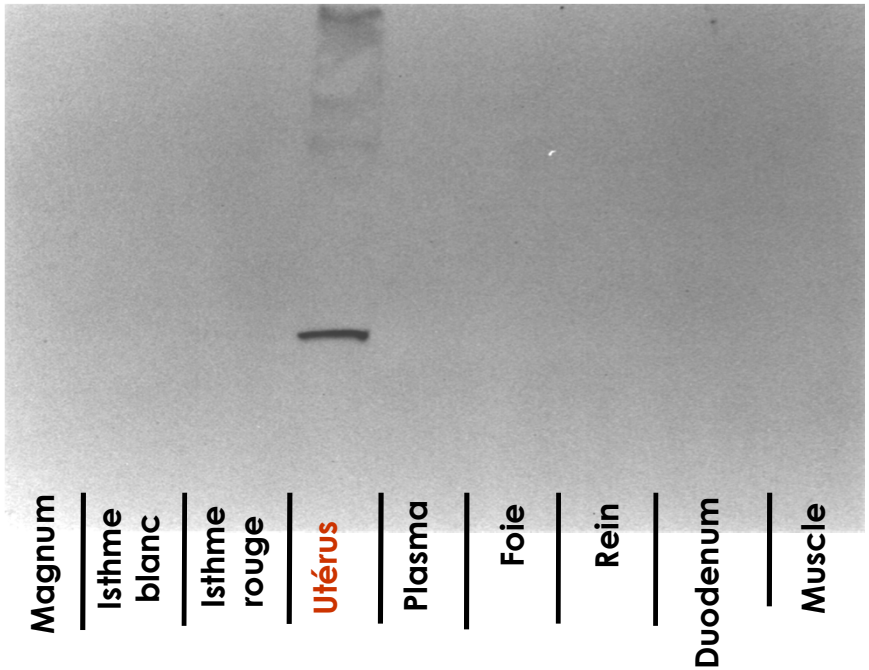
Les protéines spécifiques de la coquille

→ **Ovocalyxine -32** *(J. Biol. Chem., 2001, 276, 39243-39252)* **(2/3)**

➢ **Uniquement exprimée dans les tissus où se forme la coquille**



RT-PCR de l'ovocalyxine-32



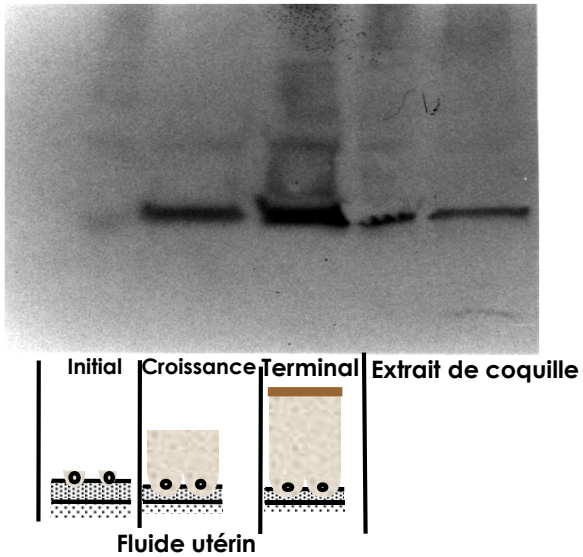
Western blot de l'ovocalyxine-32

Les protéines spécifiques de la coquille

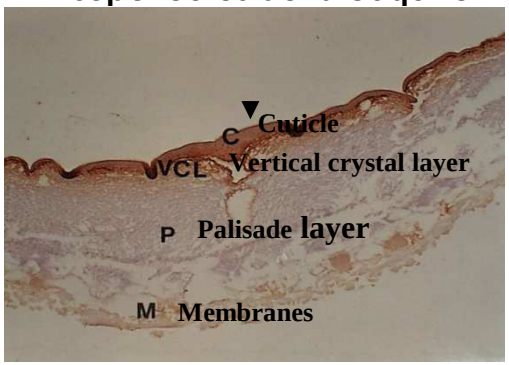
→ Ovocalyxine -32 *(J. Biol. Chem., 2001, 276, 39243-39252)* (3/3)

➢ **Impliquée dans le processus d'arrêt de la calcification**

Abondante au stade terminal



Abondante dans les couches supérieures de la coquille



➢ **Joue un rôle antimicrobien (protection chimique de l'œuf et de l'embryon)**

- **Inhibiteur de carboxypeptidase**
- **inhibe la croissance de *Bacillus subtilis***

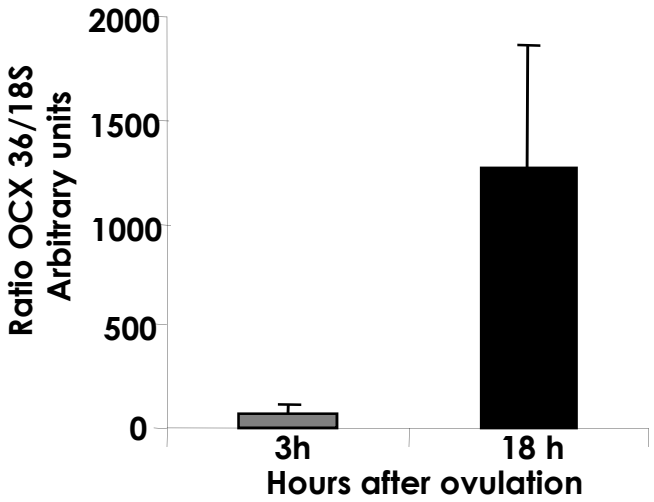
(Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Bio, 2007, 147, 172-177)

Les protéines spécifiques de la coquille

→ Ovocalyxine -36 *(J. Biol. Chem., 2007, 282, 5273-5286)* (1/2)

- Nouvelle séquence protéique non identifiée au préalable
- Uniquement exprimée dans les tissus où se forme la coquille
- Surexprimée dans l'utérus lors de la formation de la coquille

Expression de l'OCX-36 à différentes conditions physiologiques



ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT
INRA

Les protéines spécifiques de la coquille

→ **Ovocalyxine -36** *(J. Biol. Chem., 2007, 282, 5273-5286)* **(2/2)**

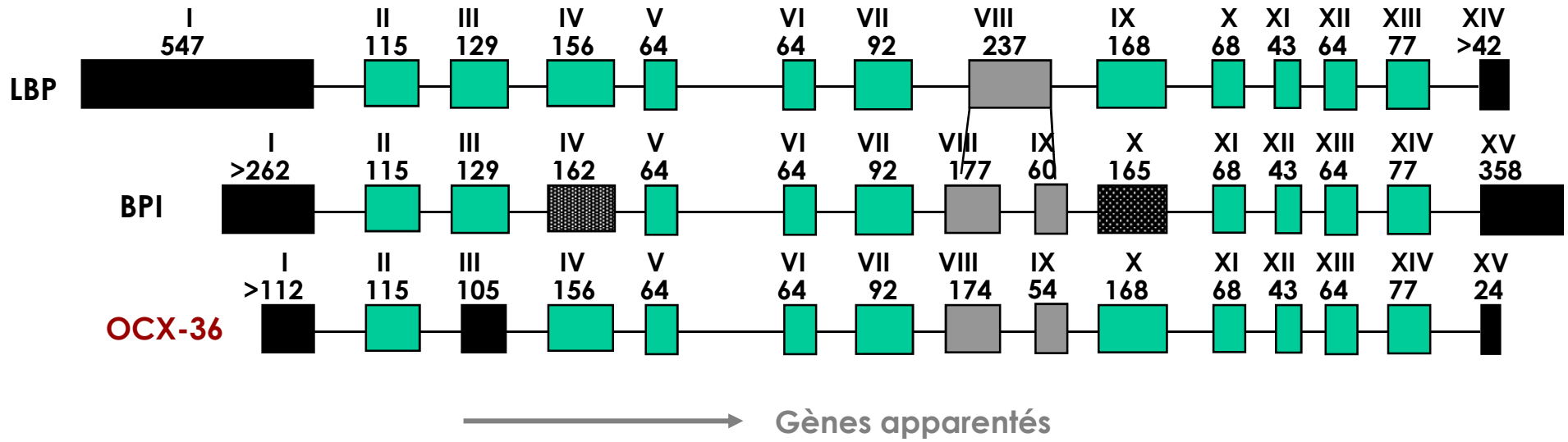
➢ **Joue un rôle antimicrobien (protection chimique de l'œuf et de l'embryon)**

Ovocalyxine-36, protéine apparentée à LBP/BPI et Plunc

Se lient au lipopolysaccharide (LPS) de la paroi des bactéries à Gram négatif
→ Mort de la bactérie

Reconnaissance précoce des produits bactériens dans le système respiratoire supérieur chez les mammifères

Architecture du gène



Première protéine non mammalienne apparentée à LBP/BPI et Plunc

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT
INRA

Ovocalyxin-36

BIOLOGY OF REPRODUCTION 83, 893–900 (2010)
Published online before print 11 August 2010.
DOI 10.1095/biolreprod.110.085019

Minireview

What Makes an Egg Unique? Clues from Evolutionary Scenarios of Egg-Specific Genes[1]

Xin Tian,[3,4,5,6] Joel Gautron,[7] Philippe Monget,[3,4,5,6] and Géraldine Pascal[2,3,4,5,6]

UMR85,[3] Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA, Nouzilly, France
UMR6175,[4] CNRS, Nouzilly, France
Université François Rabelais de Tours,[5] Tours, France
Haras Nationaux,[6] Nouzilly, France
UR83 Recherches Avicoles,[7] INRA, Nouzilly, France

Developmental and Comparative Immunology xxx (2010) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

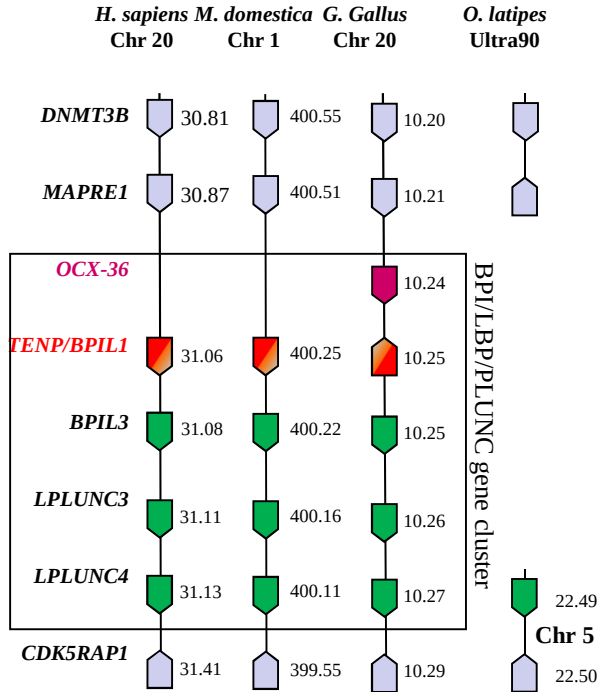
Developmental and Comparative Immunology

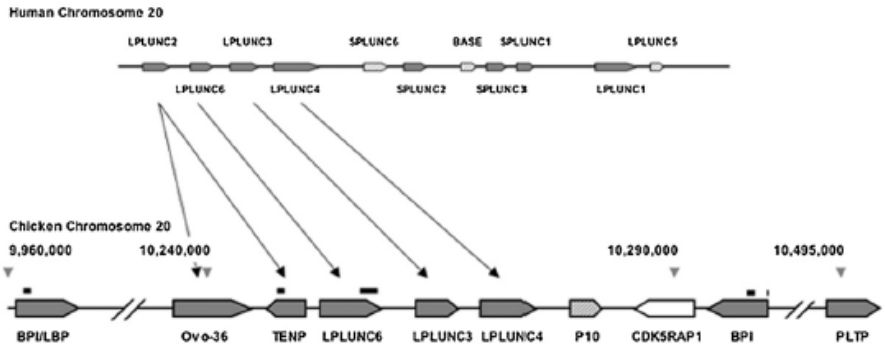
journal homepage: www.elsevier.com/locate/dci

Identification and characterisation of the BPI/LBP/PLUNC-like gene repertoire in chickens reveals the absence of a LBP gene☆

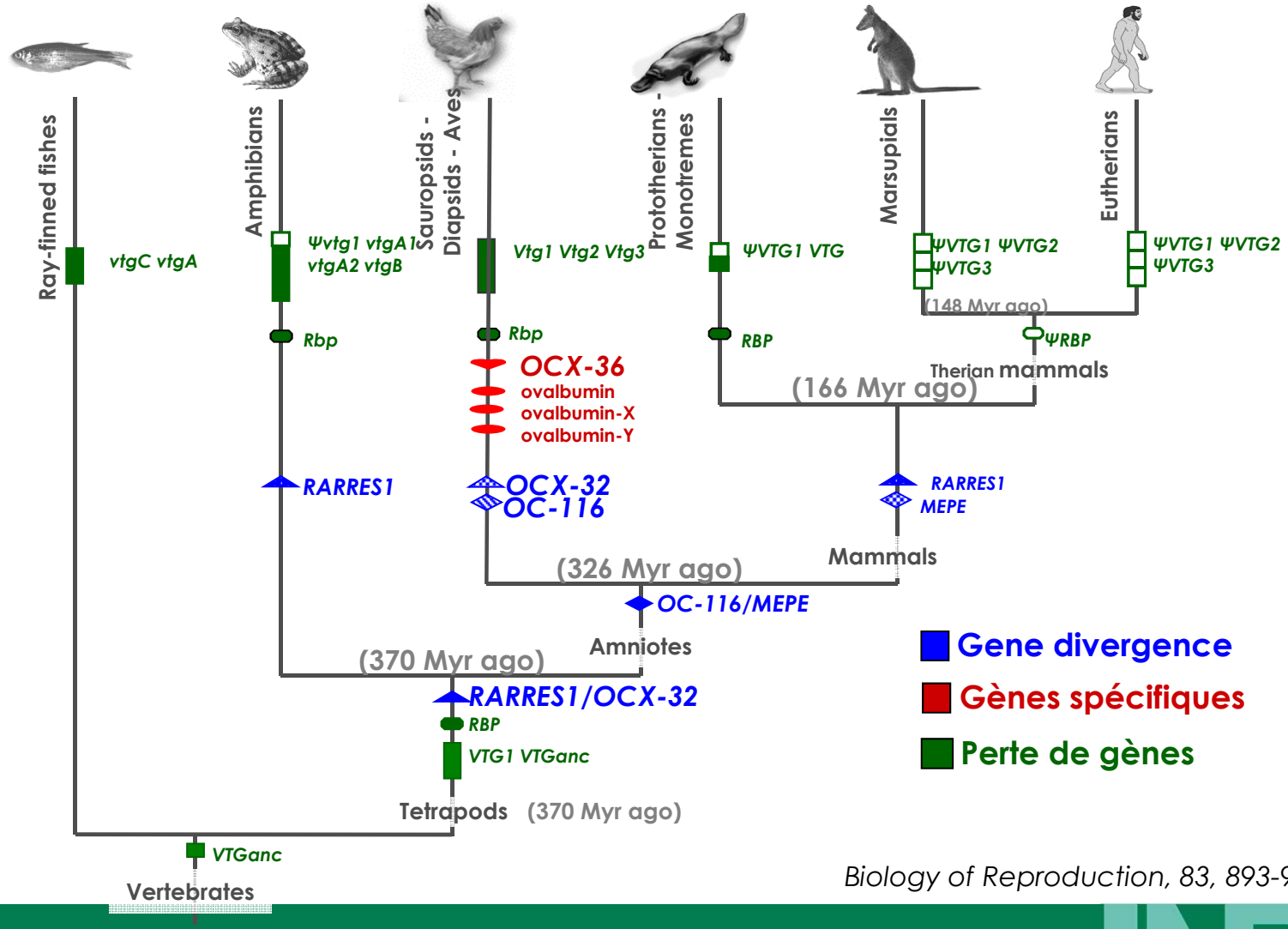
Shih-Chieh Chiang[a,1], Edwin J.A. Veldhuizen[b], Frances A. Barnes[a], C. Jeremy Craven[c], Henk P. Haagsman[b], Colin D. Bingle[a,*]

[a] Academic Unit of Respiratory Medicine, Department of Infection and Immunity, University of Sheffield, Sheffield S10 2JF, UK
[b] Department of Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, P.O. Box 80.165, 3508 TD Utrecht, The Netherlands
[c] Krebs Institute for Biomolecular Research, Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, Sheffield S10 2TN, UK





Evolution des gènes codant les protéines de l'œuf



Biology of Reproduction, 83, 893-900, 2010

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT
INRA

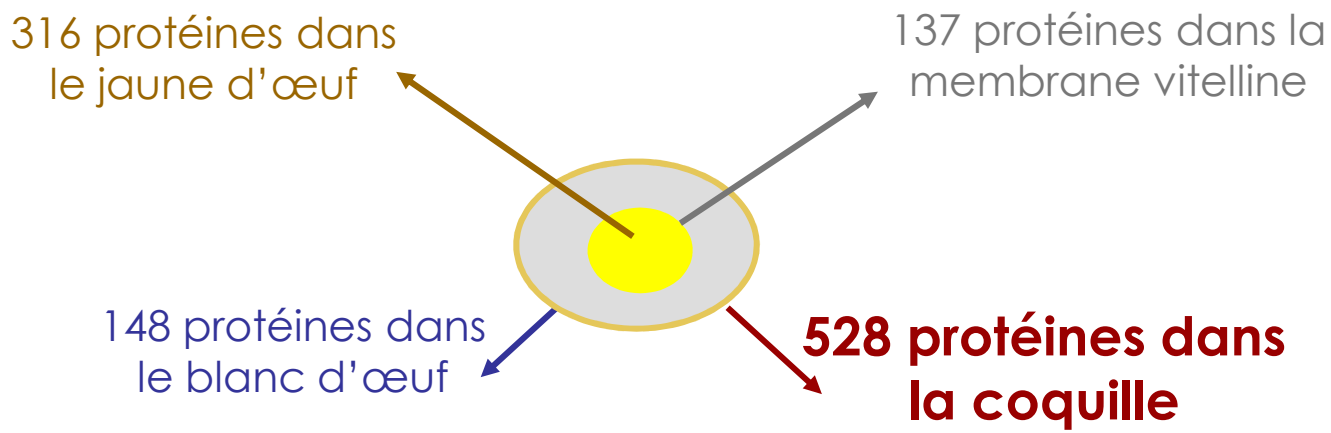
Les développements récents

- 2004, publication de la séquence génomique de la poule (*Gallus gallus*) (2004)
- 2009, plus de 630 000 transcrits fonctionnels identifiés (banques cDNA et ESTs)
- Développement des techniques "omiques" et des outils de fouilles de données

→ 2006, environ 50 protéines de l'œuf

→ 2010, environ 1000 protéines

→ Approche protéomique

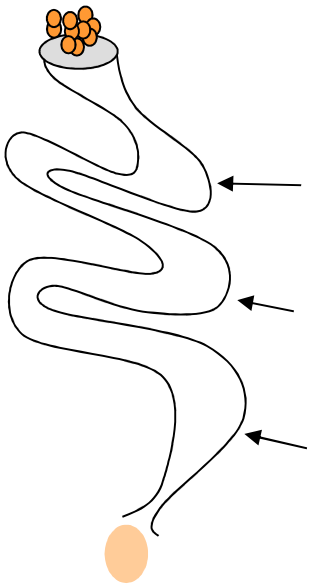


Caractériser les activités biologiques de ces protéines, un challenge en cours de réalisation

Les développements récents

→ Approche transcriptomique (1/3)

Identification des gènes spécifiquement impliqués dans la synthèse du blanc, des membranes coquillières et la calcification de la coquille



Magnum :
Protéines du blanc

Isthme :
Membranes coquillières

Utérus :
Calcification de la coquille

Utilisation de puces à ADN

↓

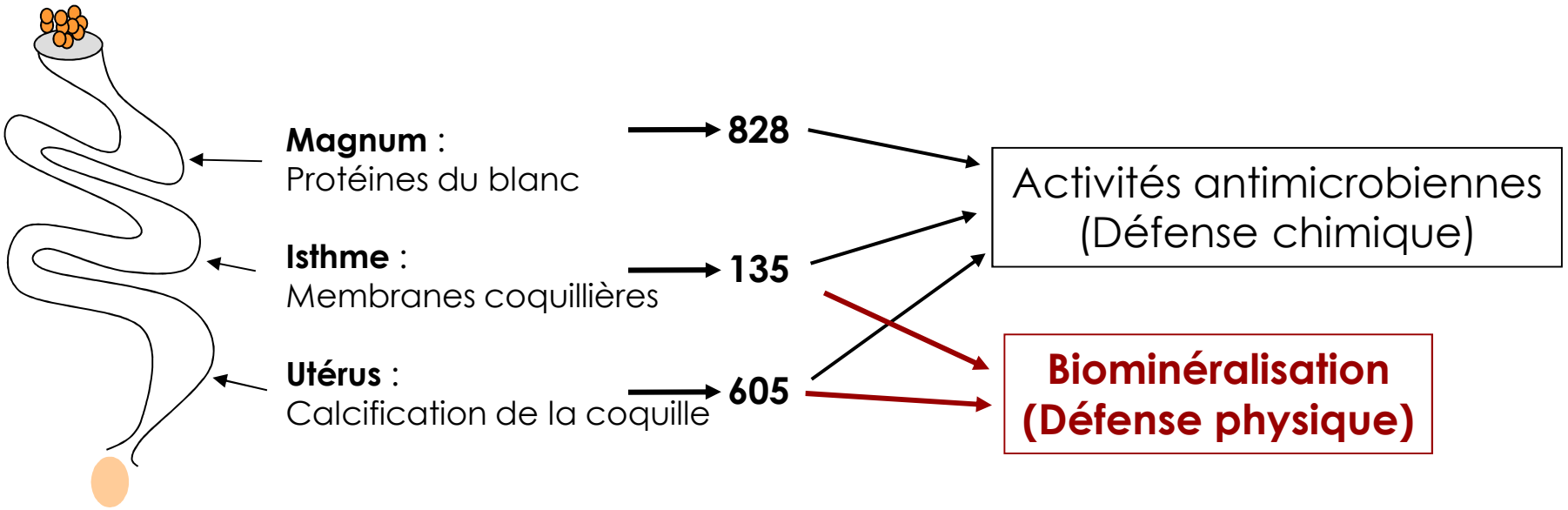
Comparaison de l'expression des gènes entre les différents tissus

BMC Genomics, 2010, 11, 57

Les développements récents

→ Approche transcriptomique (2/3)

Identification des gènes spécifiquement impliqués dans la synthèse du blanc, des membranes coquillières et la calcification de la coquille

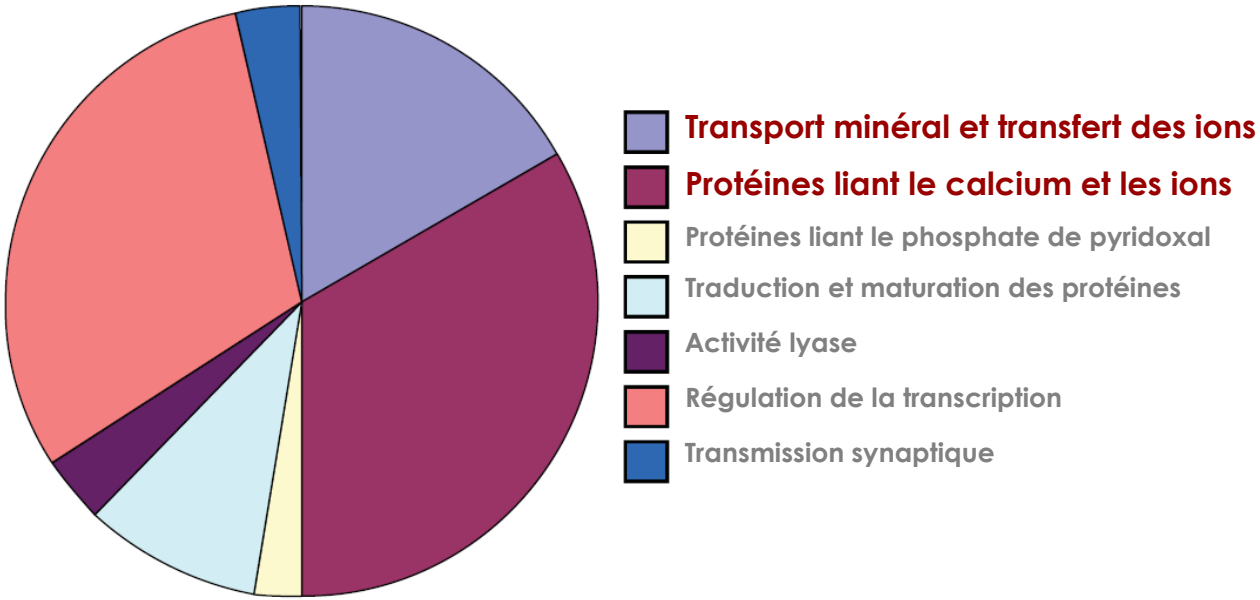


BMC Genomics, 2010, 11, 57

Les développements récents

→ Approche transcriptomique (3/3)

Identification des fonctions surreprésentées dans l'utérus à l'aide des termes Gene Ontology (GO)



BMC Genomics, 2010, 11, 57

Les développements récents

→ Approche génomique (1/2)

Stratégie de sélection pour améliorer les défenses naturelles de l'œuf

Mesure de la variabilité phénotypique

Acquisition de données sur les propriétés mécaniques de la coquille

Mesure de la variabilité génotypique

Étude du polymorphisme (SNP) sur 8 gènes candidats (protéines de la matrice)

→ **Test d'association**

Lien entre les propriétés mécaniques de la coquille et le polymorphisme de 5 gènes codant des protéines de la matrice organique

Ovocleidin-116 Module élastique	P= 0.0004
Ovocalyxine-32 Déformation à la rupture	P= 0.006
Ovocalyxine-32 Résistance à la rupture	P= 0.001

(Dunn et al., 2009)

Les développements récents

→ Approche génomique (2/2)

Stratégie de sélection pour améliorer les défenses naturelles de l'œuf

- Utilisation de souches commerciales en population pedigree (structures familiales définies).
- Mesure de la taille des cristaux sur 899 œufs issus de ces familles

Héritabilité forte de la taille des cristaux **0.61±0.18**

Corrélation génétique importante entre taille des cristaux et des paramètres de solidité de coquille

Résistance à la rupture	***0.45±0.25***
Epaisseur effective de la coquille	***0.51±0.20***

Conclusions – Perspectives

- La coquille est une structure biominérale aux propriétés remarquables

- Biocéramique fabriquée à basse température et basse pression

→ Protège l'intérieur de l'œuf efficacement grâce à sa matrice organique
  Protection physique
  Protection chimique

→ Les efforts conjugués de recherche devraient permettre d'achever rapidement l'identification des composés de l'œuf

La caractérisation fonctionnelle de ces centaines de nouveaux constituants est le challenge à venir

Connaissance de molécules biologiquement actives

Renforcement des défenses naturelles

REMERCIEMENTS

UE-PEAT: J.D. Terlot-Bryssine, J. Sionneau, J.M. Brigant, F. Mercerand…..

URA 83, Equipe FRPO : Y. Nys, S. Réhault-Godbert, V. Herve, A. Brionne, M. Mills, M. Bourin, C. Cabau, A. Travel, V. Jonchere, L Bedrani, J.C. Poirier

UMR-PRC : G. Pascal, V. Labas, P. Monget

EggDefence (2001-2004)
(Coordinateur : Y. Nys, INRA, UR83, Recherches avicoles, 37380 Nouzilly)

RESCAPE (2006-2009) (Coordinateur : Y. Nys, INRA, UR83, Recherches avicoles, 37380 Nouzilly)

SABRE CUTTING EDGE GENOMICS FOR SUSTAINABLE ANIMAL BREEDING
2006-2010
(Coordinator Chris Warkup, Genesis Faraday, Roslin BioCentre, Roslin, EH25 9PS, United Kingdom)

***BIOCRISTAL*, (2006-2009)**
(Coordinateur : Y. Dauphin, CNRS, UMR IDES 8148, Université Paris XI, Orsay)

***OVO-Mining*, (2009-2012)**
(Coordinateur : Y. Nys, INRA, UR83, Recherches avicoles, 37380 Nouzilly)

Equipe FRPO

Chercheurs

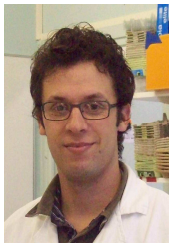
Yves NYS
Responsable

Joël
GAUTRON

Sophie REHAULT
-GODBERT

Nicolas
GUYOT

Doctorants



Larbi
BEDRANI

Marie
BOURIN

AI - TR

Aurélien
BRIONNE

Maryse
MILLS

Jean-Claude
POIRIER

Magali
BERGES

Cédric
CABAU

Angélique
TRAVEL

Microbiologie de l'œuf et des ovoproduits

→ Au moment de la ponte, le contenu des œufs est généralement stérile
→ Le pourcentage d'œufs frais contaminés reste souvent inférieur à 1 %
→ Contamination verticale est rare

→ La contamination horizontale est beaucoup plus fréquente
→ Se produit après la ponte par contact avec les microorganismes

* fientes
* environnement élevage
* centre de conditionnement
* circuit de commercialisation
* consommateur…

→ Les œufs et produits d'œufs sont impliqués dans la très grande majorité des salmonelloses

Le risque de contamination par les microorganismes et notamment *Salmonella* est donc une préoccupation pour la filière œufs et ovoproduits