



**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)

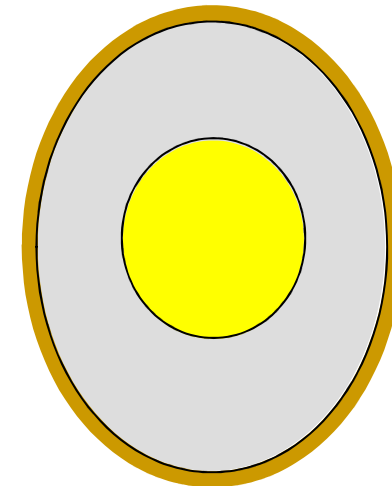
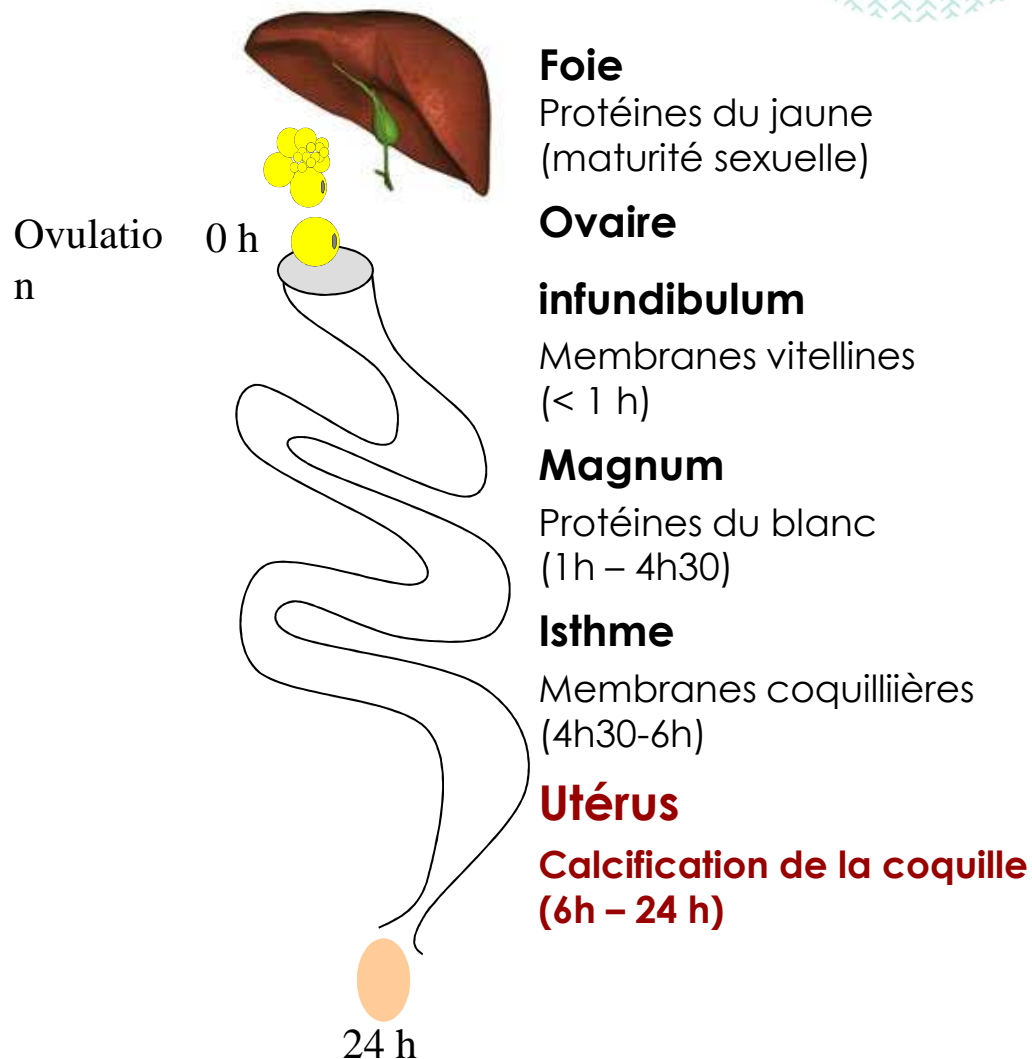
➤ Potentiel pour les industries pharmaceutiques, cosmétiques, agroalimentaires et pour la santé humaine et animale

→ Valorisation alimentaire et non alimentaire de l'œuf

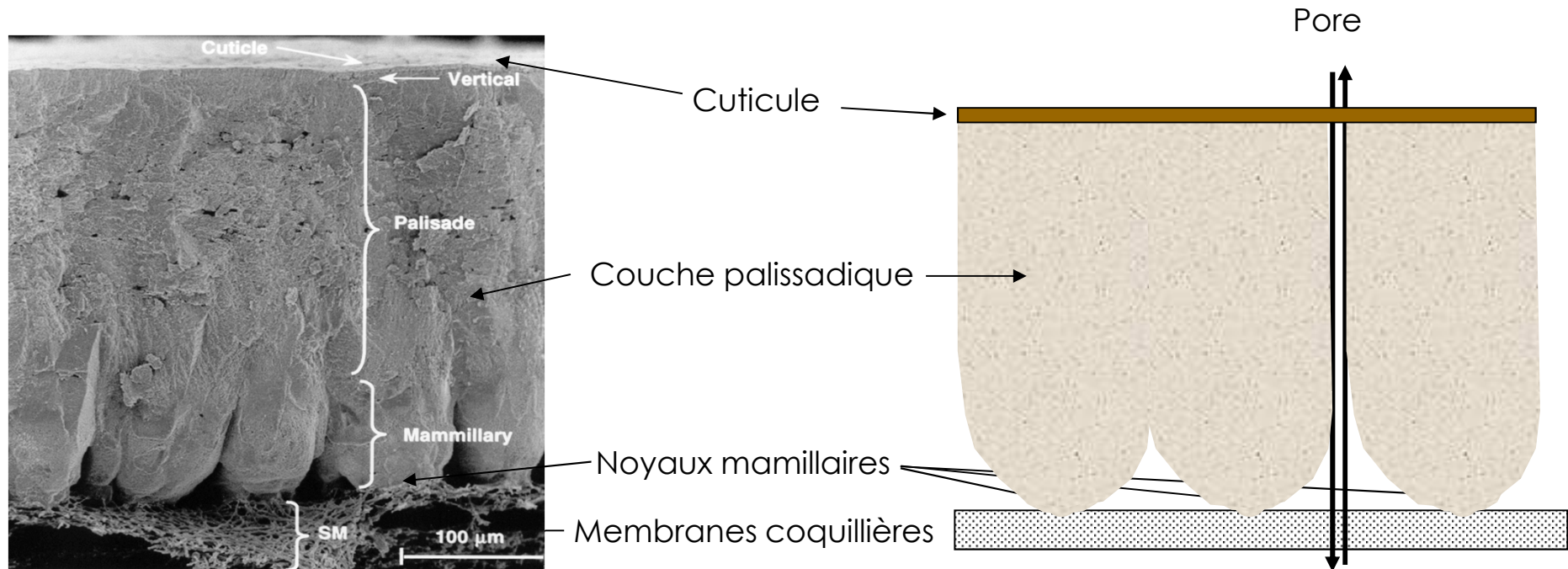
**Comprendre et améliorer les défenses naturelles de l'œuf**

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

# La formation de l'œuf



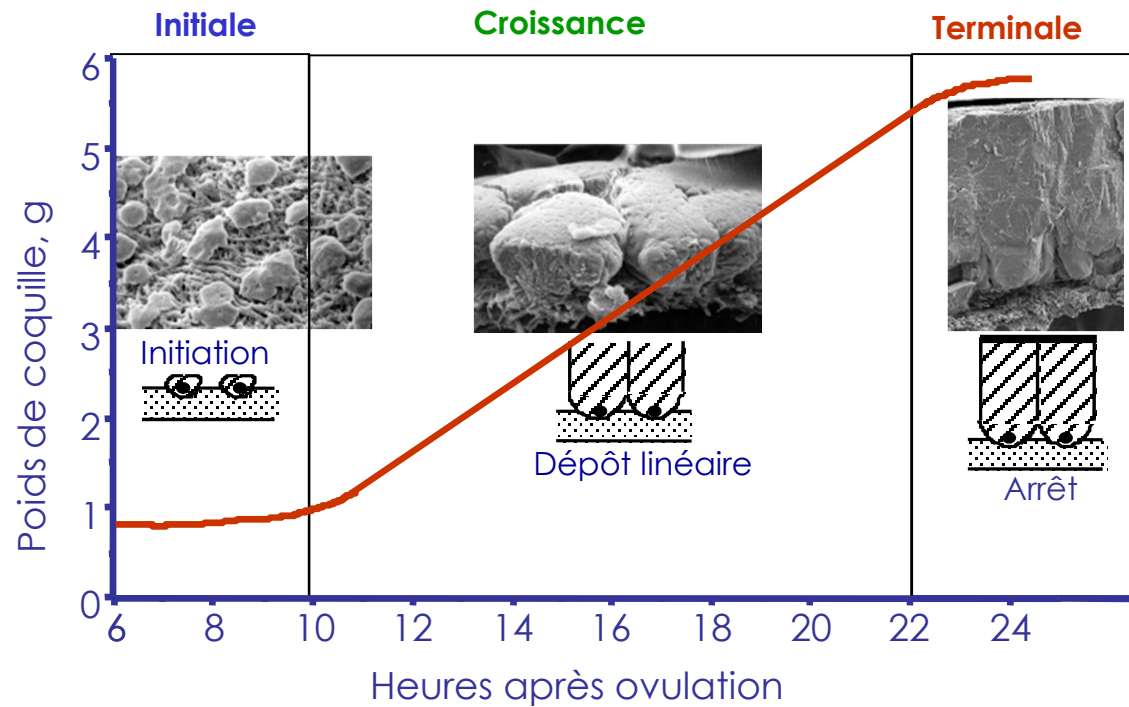
# La coquille (défense physique)



# La coquille (défense physique)

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

*Milieu hypersaturé en calcium et carbonates*

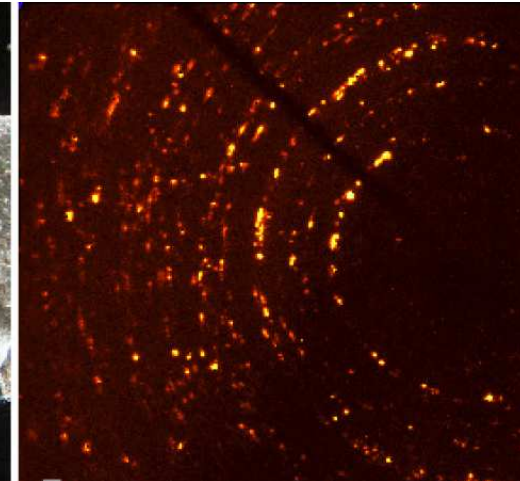
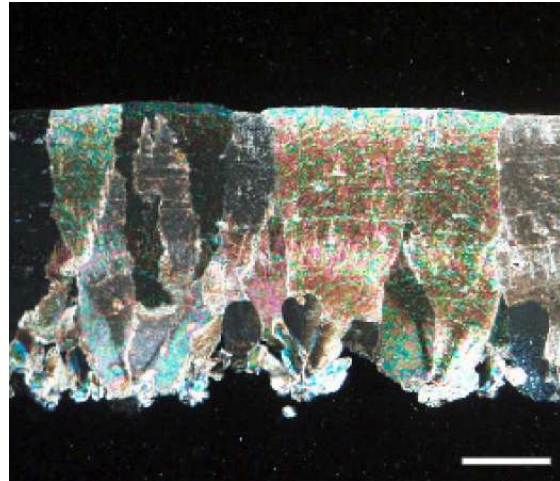


# Microstructure de La coquille

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

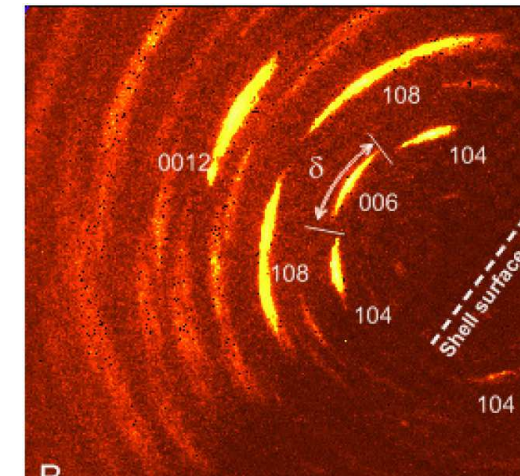
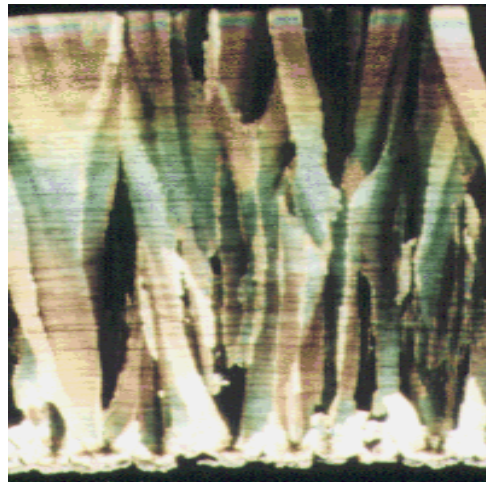
## Poule pondeuse

Larges colonnes de cristaux de calcite faiblement orientés



## Autruche

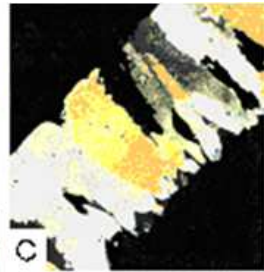
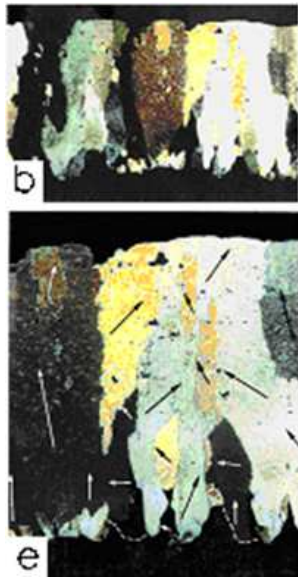
Colonnes étroites de cristaux de calcite fortement orientés



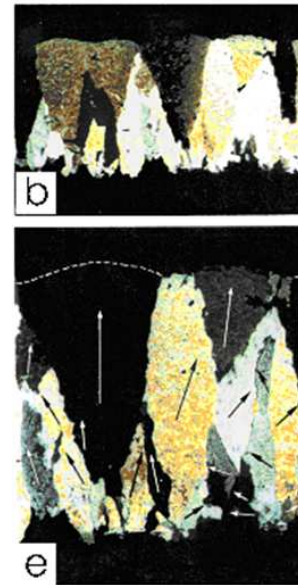


# Microstructure de La coquille

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  $\mu\text{m}$

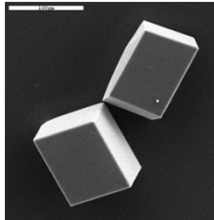


Old hen egg  
Breaking strength: 4 N  
Thickness: 360  $\mu\text{m}$

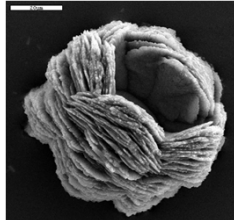
# La coquille (défense physique)

→ 95% de carbonate de calcium sous forme de calcite

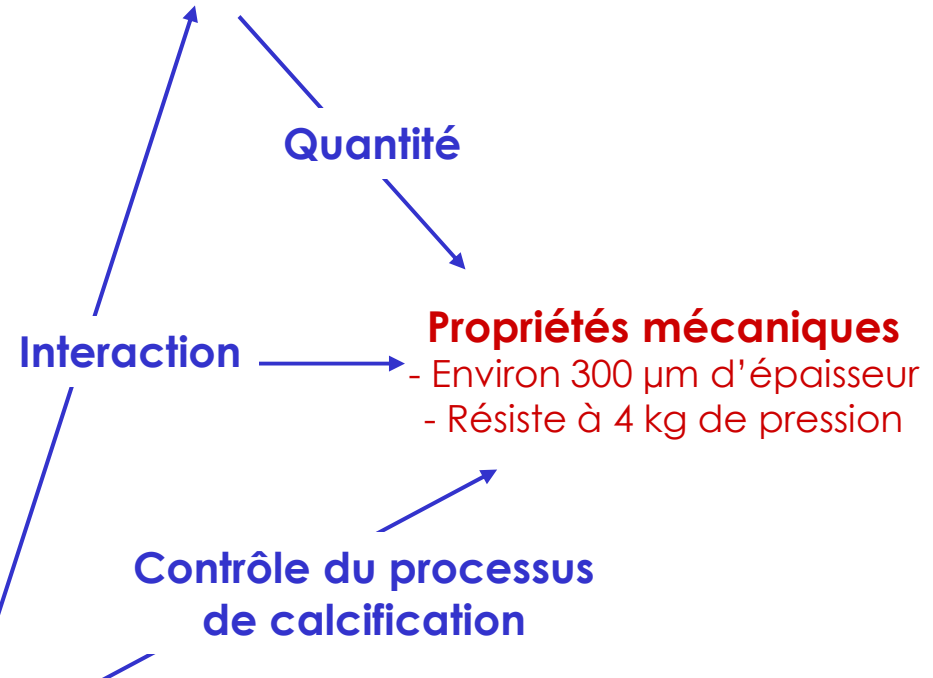
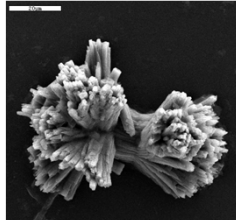
Calcite



Aragonite

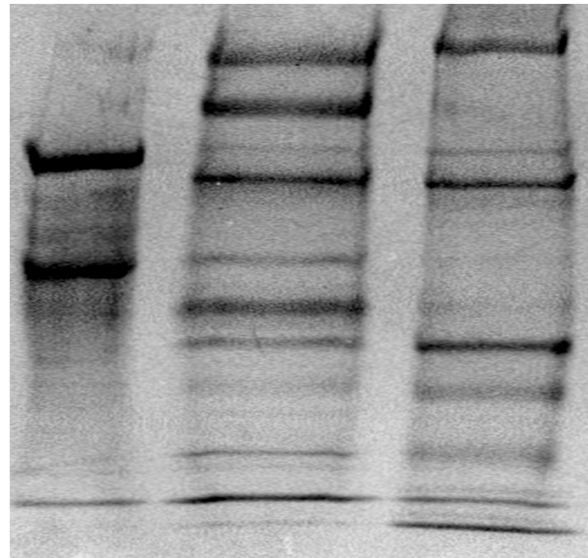


Vatérite



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

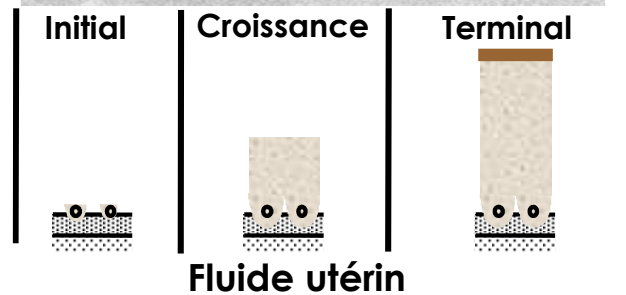
# Protéines de la matrice et minéralisation de la coquille



Composition variable du fluide utérin  
au cours du processus de calcification



Adaptation du contenu organique  
selon le stade de minéralisation

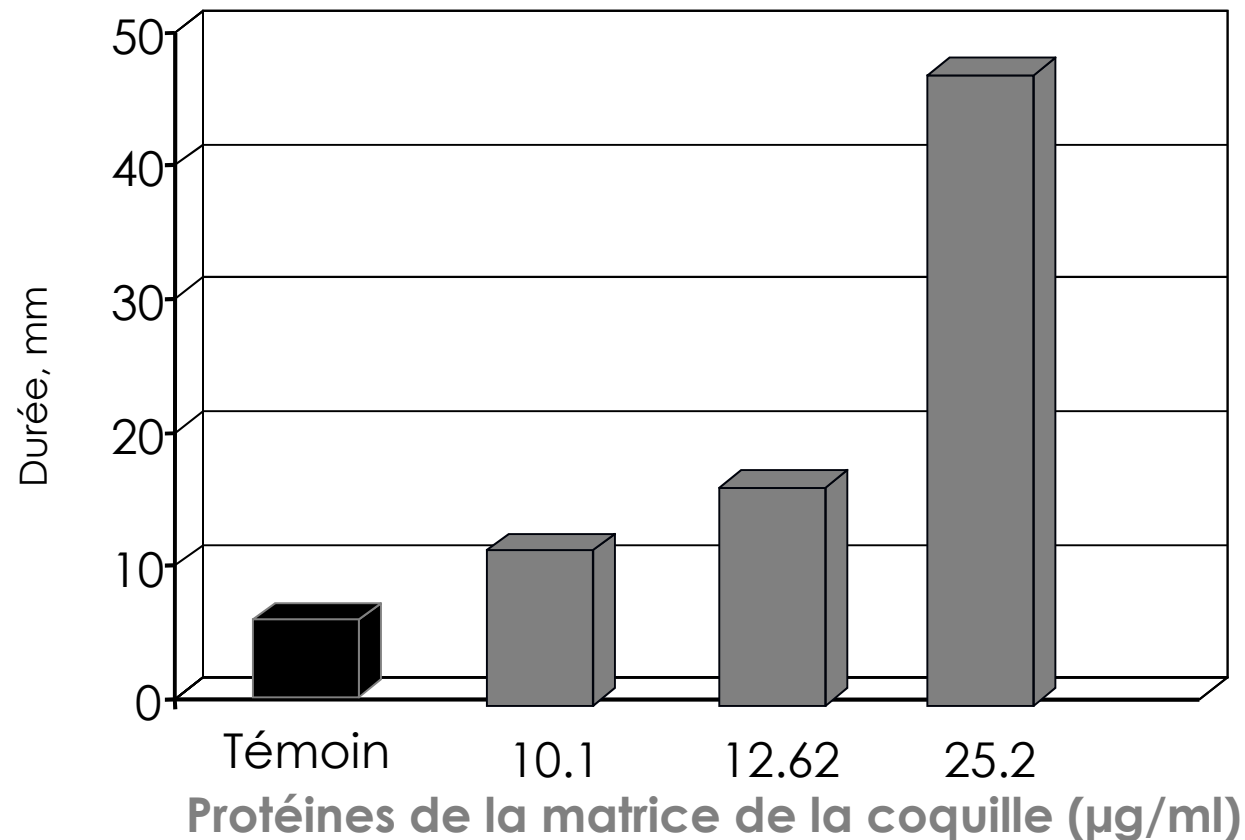


*Connect. Tissue. Res.*, 1997, 36, 195-210

# Fonction des protéines de la matrice

## Protéines de la matrice et minéralisation de la coquille

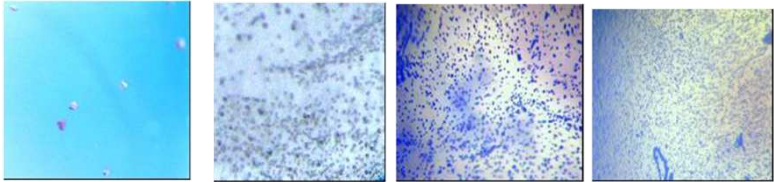
Cinétique *in vitro* de précipitation du  $\text{CaCO}_3$



# Protéines de la matrice et minéralisation de la coquille

**Augmente la cinétique de nucléation des cristaux**  
 Temps nécessaire pour observer les premiers cristaux  
 Témoins 900 minutes  
**Fluide utérin < 10 secondes**

**Augmente le nombre de cristaux**



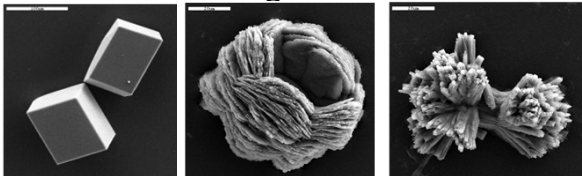
Témoins 40 cristaux  
 Initiale Croissance Terminale  
**Fluide utérin > 10 000 cristaux**

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

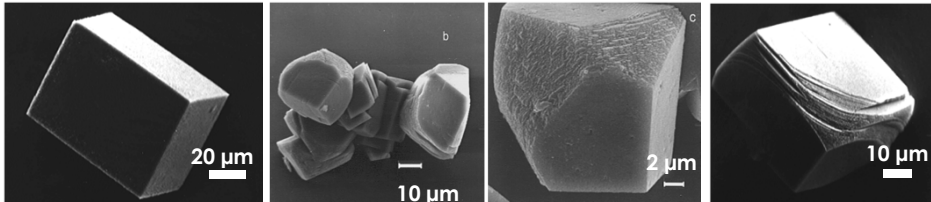
(Poultry Sci., 2000, 79, 901-907 ; J. Crystal Growth, 2008, 310, 1754-1759 ; Cryst. Growth. Des., 2008, 8, 4330-4339)

**Favorise la calcite comme type polymorphique**

	Calcite	Aragonite	Vatérite
Témoins (%)	55	22.5	22.5
<b>Fluide utérin (%)</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>0</b>



**Modifie la morphologie des cristaux de calcite**





Témoins 20 µm  
 Initiale 10 µm  
 Croissance 2 µm  
 Terminale 10 µm  
**Fluide utérin**

# Fonction des protéines de la matrice

## Protéines de la matrice et minéralisation de la coquille

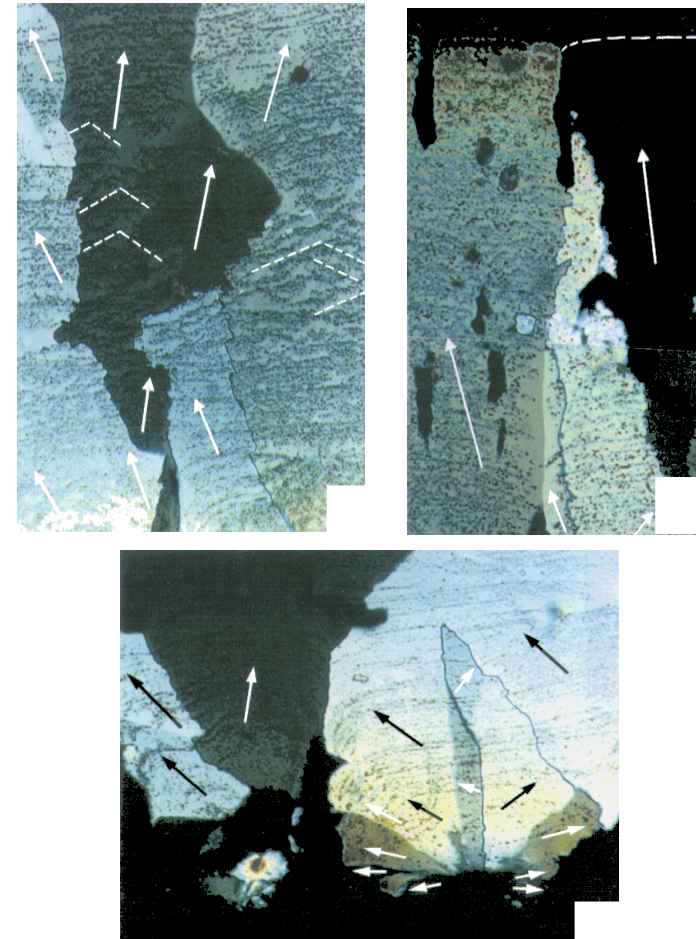
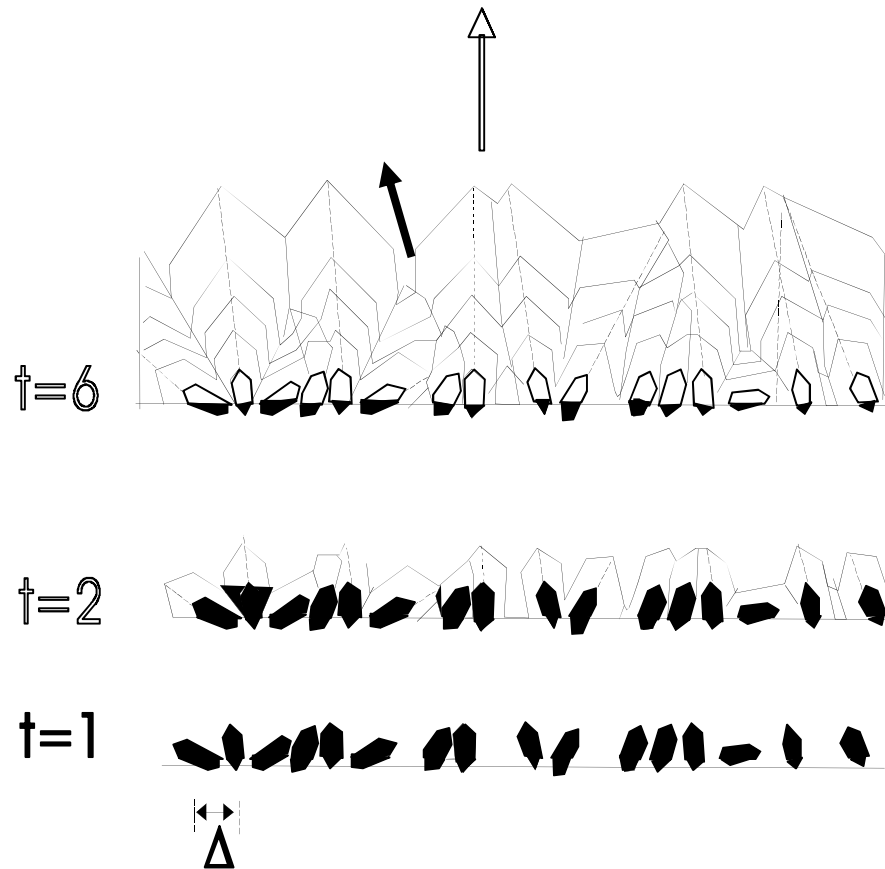
Interaction de la matrice avec la phase minérale (approche *in vivo*)

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 temporelle 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

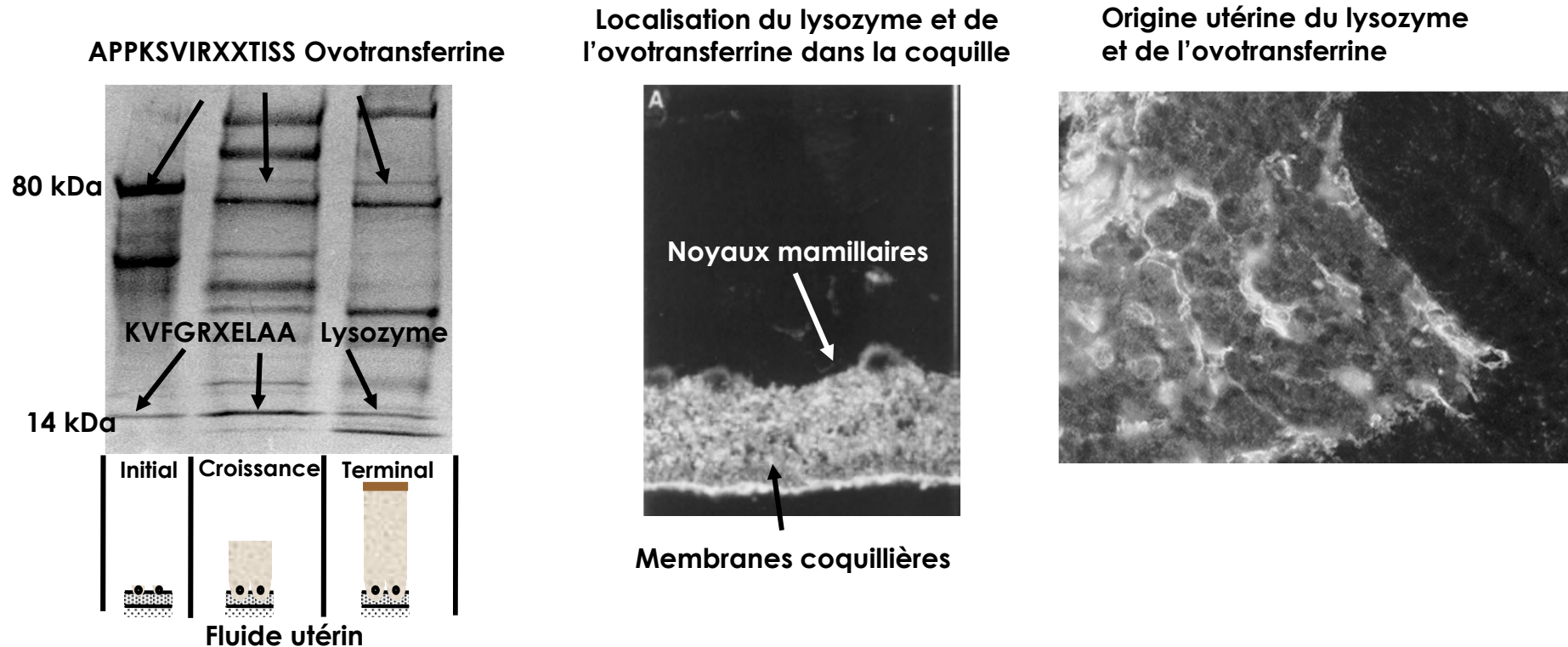
## Les protéines spécifiques

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)



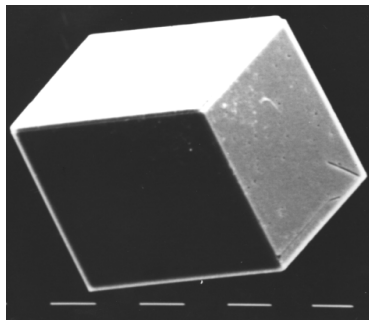
- Présentes dans la coquille
- Sécrétées par les tissus où se forme la coquille

# Les protéines initialement identifiées dans le blanc d'œuf

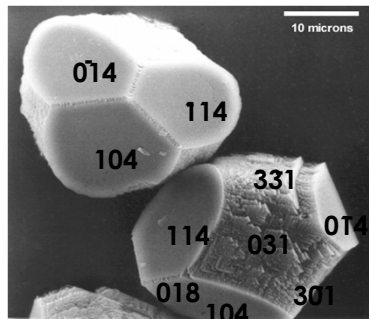
→ **Lysozyme** (*Matrix Biol.*, 2000, 19, 443-453) **et ovotransferrine** (*Connect. Tissue. Res.*, 2001, 42, 225-267)

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

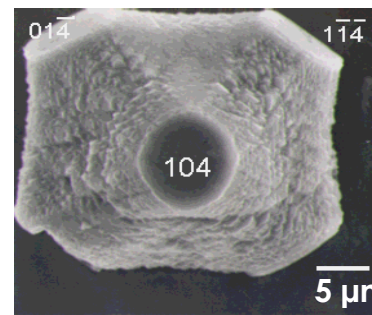
Interaction avec le carbonate de calcium



Témoin



Ovotransferrine



Lysozyme

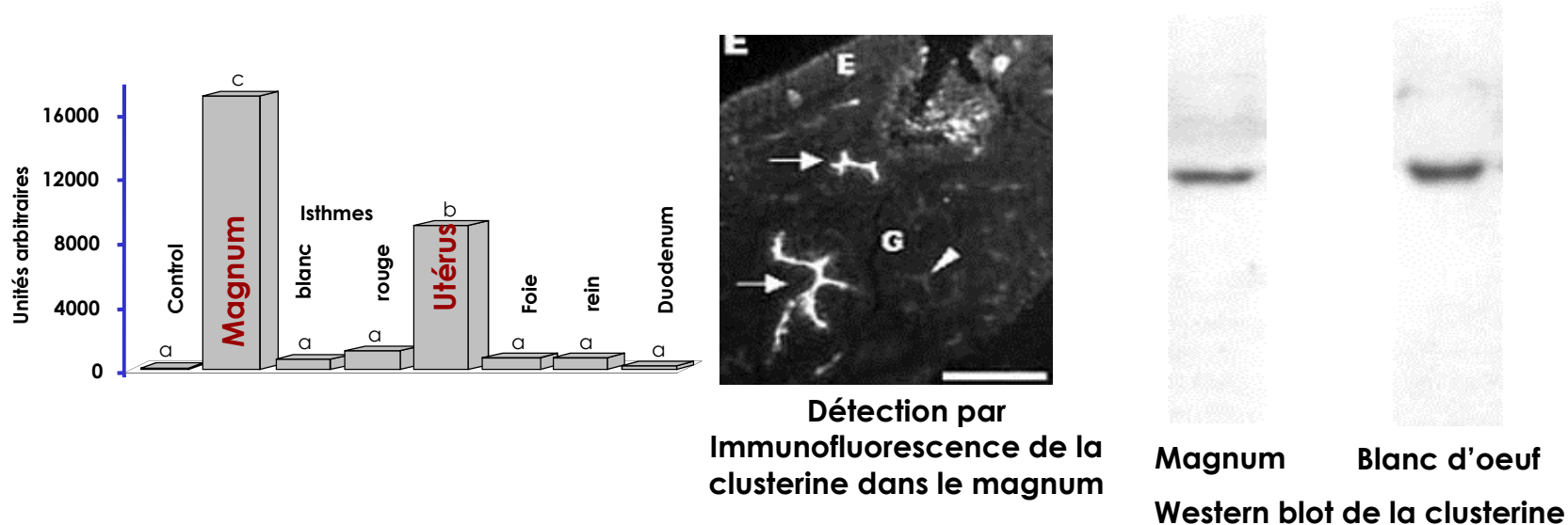
➤ Jouent un rôle antimicrobien (protection chimique de l'œuf et de l'embryon)

- \* 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.



➤ **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)

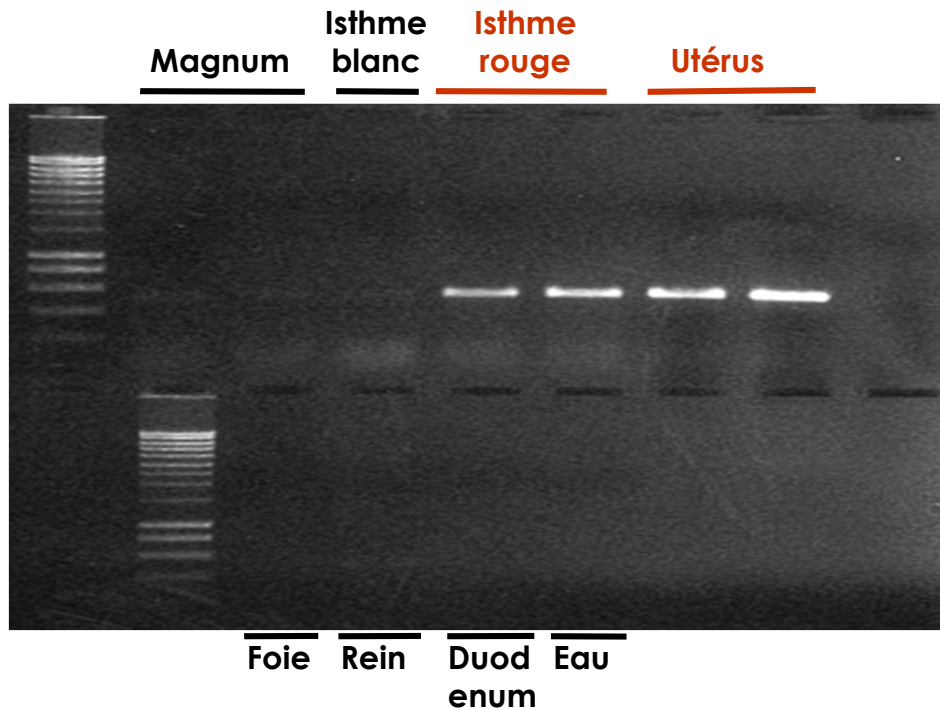
Identification et assemblage des séquences  
EST correspondantes

Traduction en protéine du cDNA

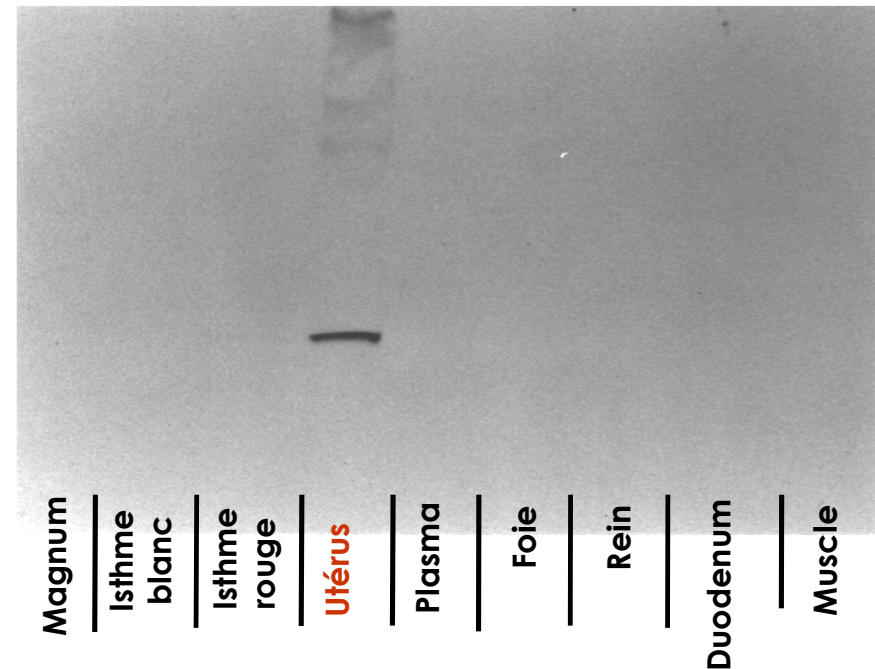
# Les protéines spécifiques de la coquille

→ **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



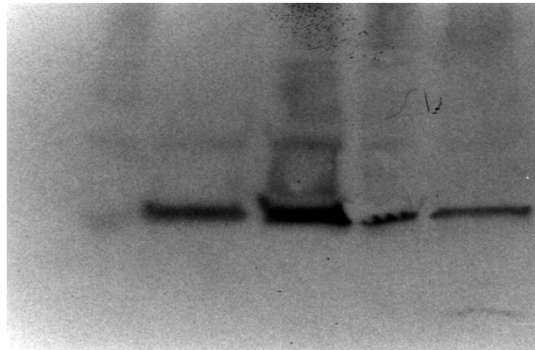
Western blot de l'ovocalyxine-32

# Les protéines spécifiques de la coquille

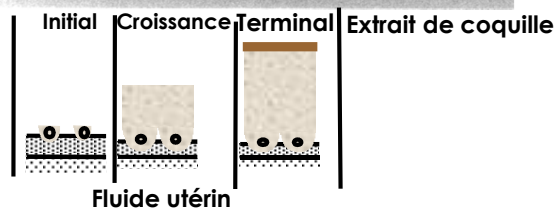
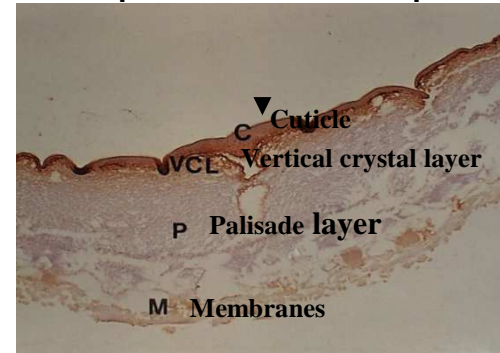
→ **Ovocalyxine -32** (*J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 39243-39252) **(3/3)**

➤ 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*

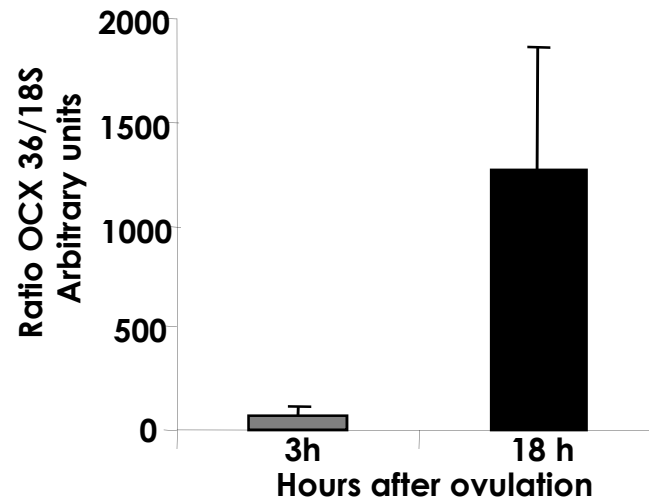
(*Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Bio.*, 2007, 147, 172-177)

# 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



# 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)**

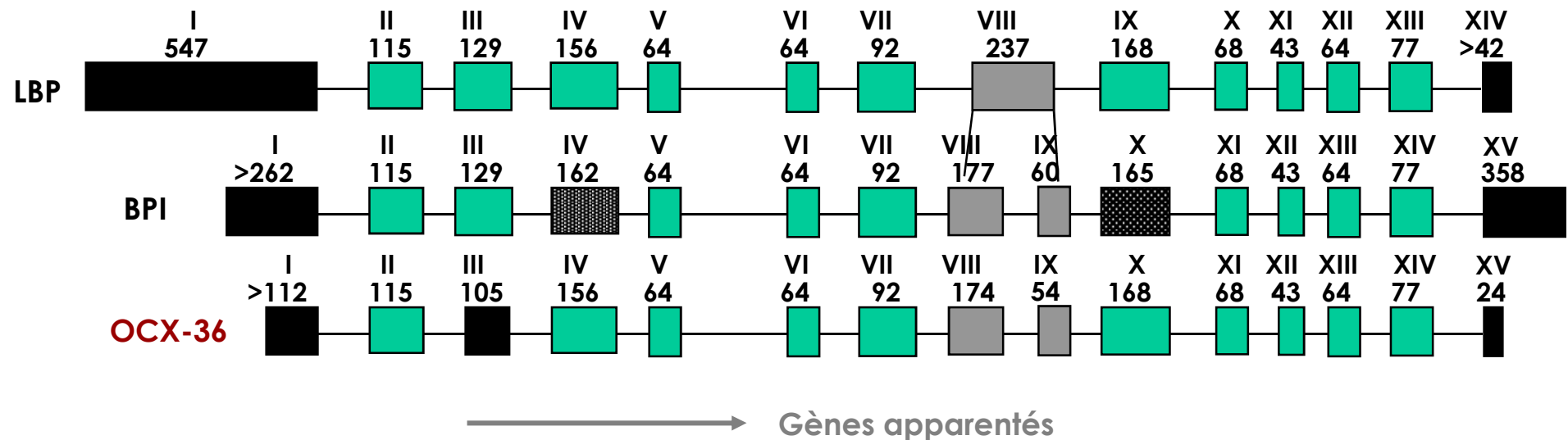
Ovocalyxine-36, protéine apparentée à LBP/BPI et Plunc

Se lie 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**



# 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<sup>1</sup>

Xin Tian,<sup>3,4,5,6</sup> Joel Gautron,<sup>7</sup> Philippe Monget,<sup>3,4,5,6</sup> and Géraldine Pascal<sup>2,3,4,5,6</sup>

UMR85,<sup>3</sup> Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA, Nouzilly, France  
 UMR6175,<sup>4</sup> CNRS, Nouzilly, France  
 Université François Rabelais de Tours,<sup>5</sup> Tours, France  
 Haras Nationaux,<sup>6</sup> Nouzilly, France  
 UR83 Recherches Avicoles,<sup>7</sup> 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](http://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<sup>☆</sup>

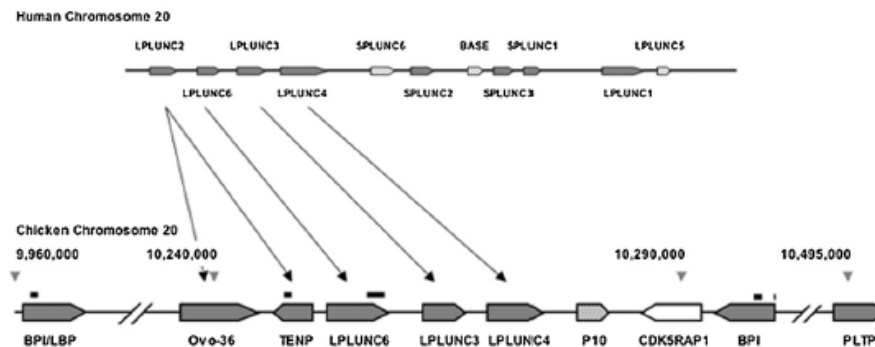
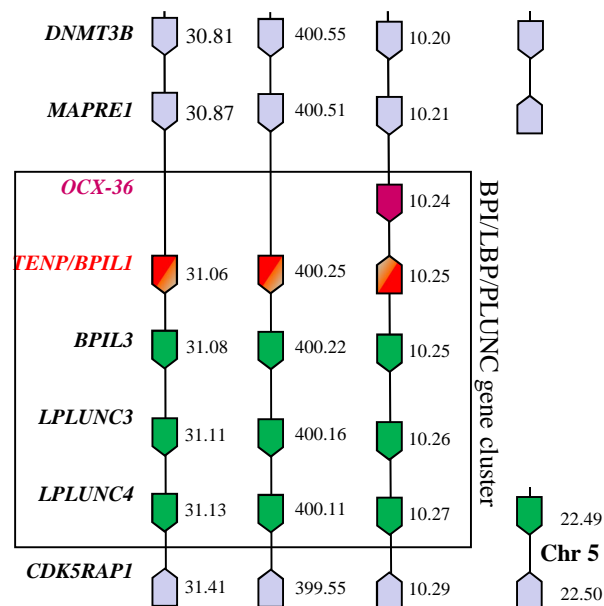
Shih-Chieh Chiang<sup>a,1</sup>, Edwin J.A. Veldhuizen<sup>b</sup>, Frances A. Barnes<sup>a</sup>, C. Jeremy Craven<sup>c</sup>,  
 Henk P. Haagsman<sup>b</sup>, Colin D. Bingle<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Academic Unit of Respiratory Medicine, Department of Infection and Immunity, University of Sheffield, Sheffield S10 2JF, UK

<sup>b</sup> Department of Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, P.O. Box 80.165, 3508 TD Utrecht, The Netherlands

<sup>c</sup> Krebs Institute for Biomolecular Research, Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, Sheffield S10 2TN, UK

*H. sapiens* Chr 20    *M. domestica* Chr 1    *G. Gallus* Chr 20    *O. latipes* Ultra90

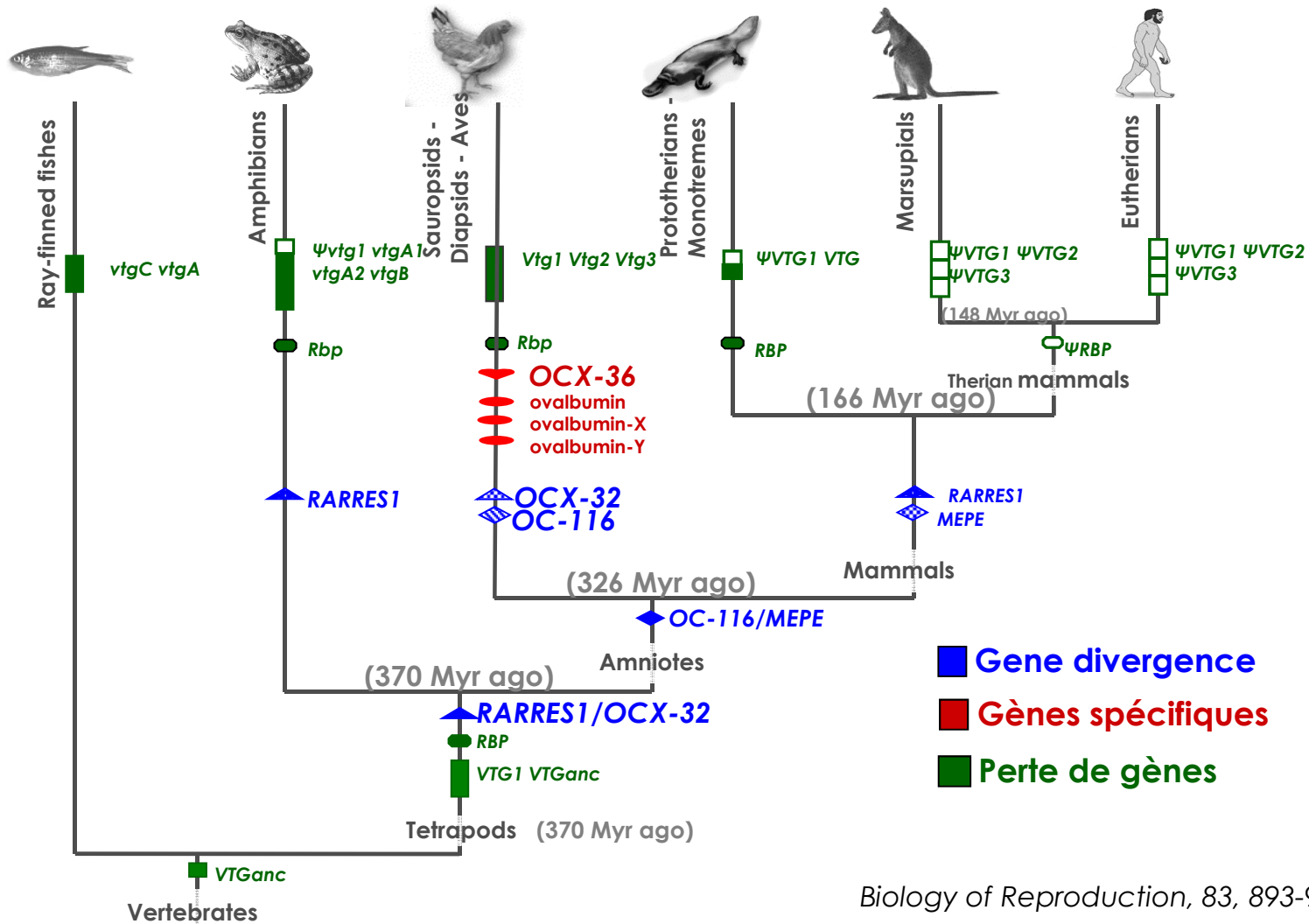


JFBTM 2011

ALIMENTATION  
 AGRICULTURE  
 ENVIRONNEMENT



# Evolution des gènes codant les protéines de l'œuf



Biology of Reproduction, 83, 893-900, 2010

# 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**

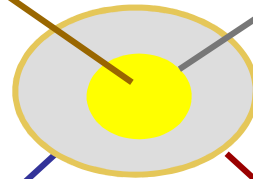
## → Approche protéomique

316 protéines dans  
le jaune d'œuf

137 protéines dans la  
membrane vitelline

148 protéines dans  
le blanc d'œuf

**528 protéines dans  
la coquille**

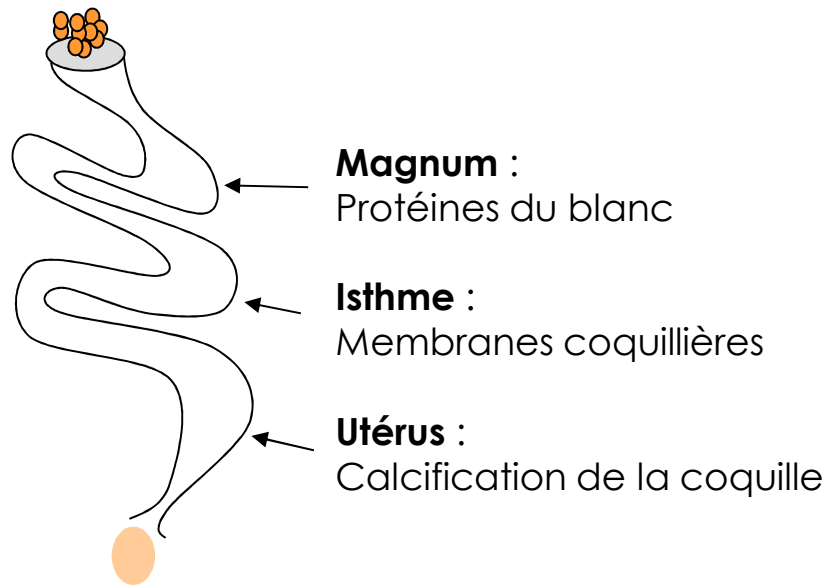


Caractériser les activités biologiques de ces protéines, un challenge en cours de réalisation

# 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



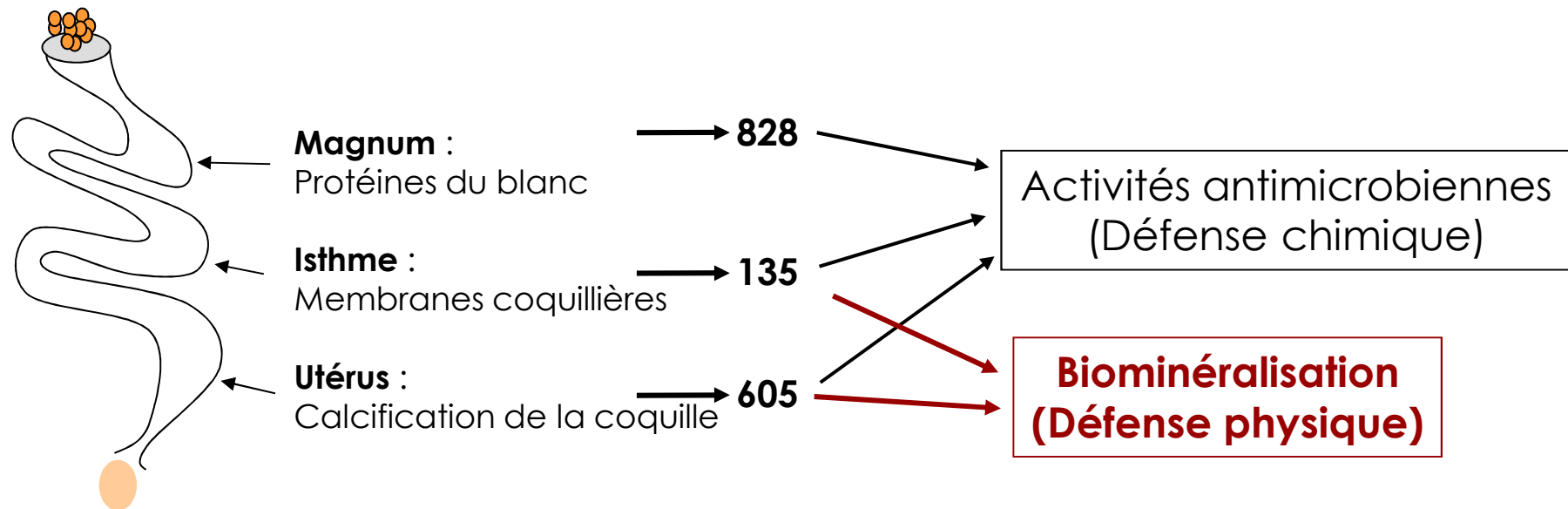
Utilisation de puces à ADN  
↓  
Comparaison de l'expression des gènes entre les différents tissus

*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

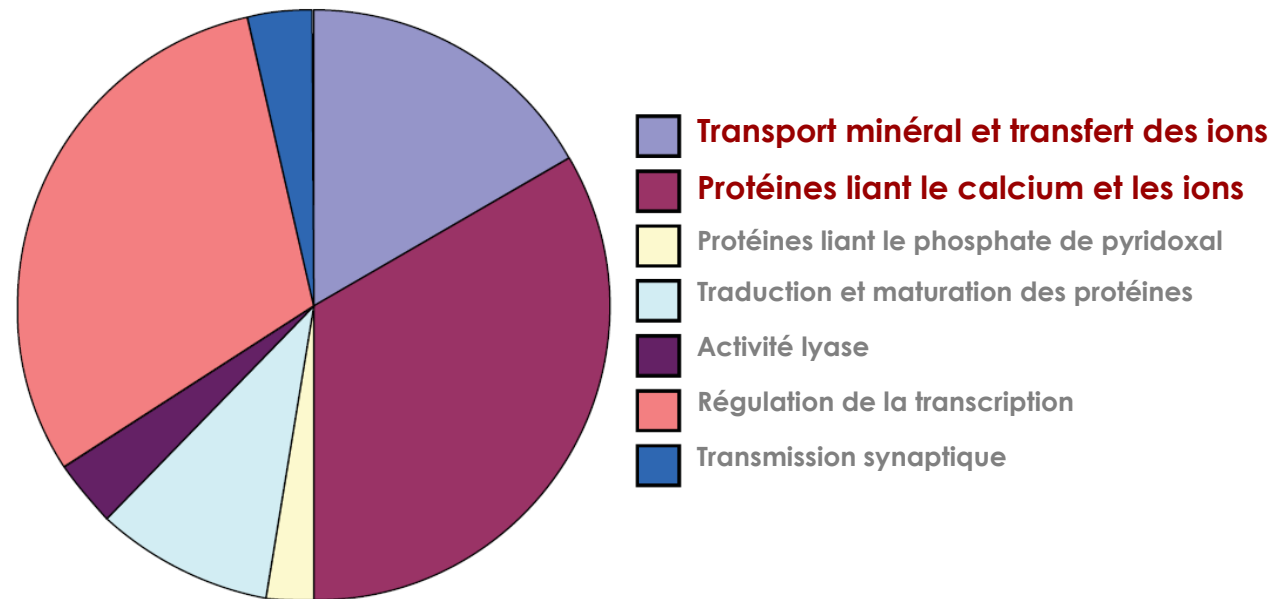


*BMC Genomics, 2010, 11, 57*

# 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**

***Épaisseur 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**

**2006-2010**

(Coordinator Chris Warkup, Genesis Faraday, Roslin BioCentre, Roslin, EH25 9PS, United Kingdom)

CUTTING EDGE GENOMICS FOR SUSTAINABLE ANIMAL BREEDING



**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)

JFBTM 2011

ALIMENTATION  
AGRICULTURE  
ENVIRONNEMENT



# 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

SIGEN@



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**