

La coquille, un système de protection efficace de l'œuf

J. Gautron, S. Réhault-Godbert, Y. Nys

INRA, Fonction et régulation des protéines de l'œuf, UR83 Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly

K. Mann

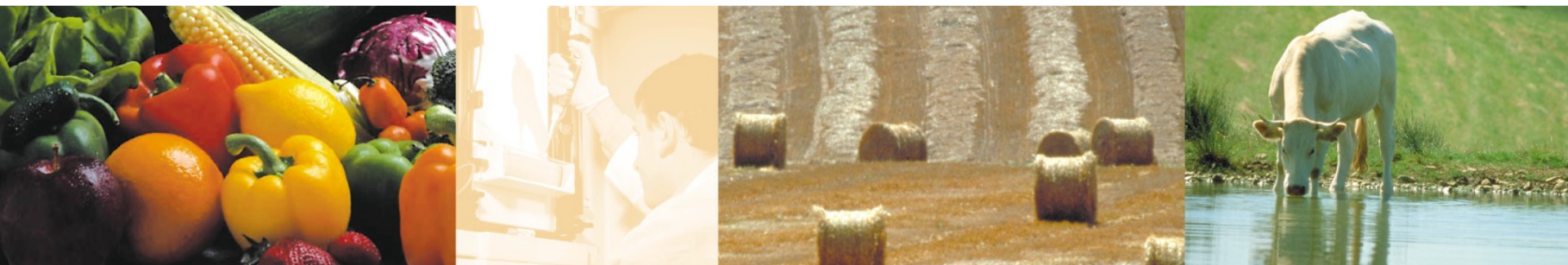
Max planck institute fur biochemie, Martinsried, Allemagne

J.M. Garcia-Ruiz

CSIC, Universidad de Granada, Espagne

M.T. Hincke

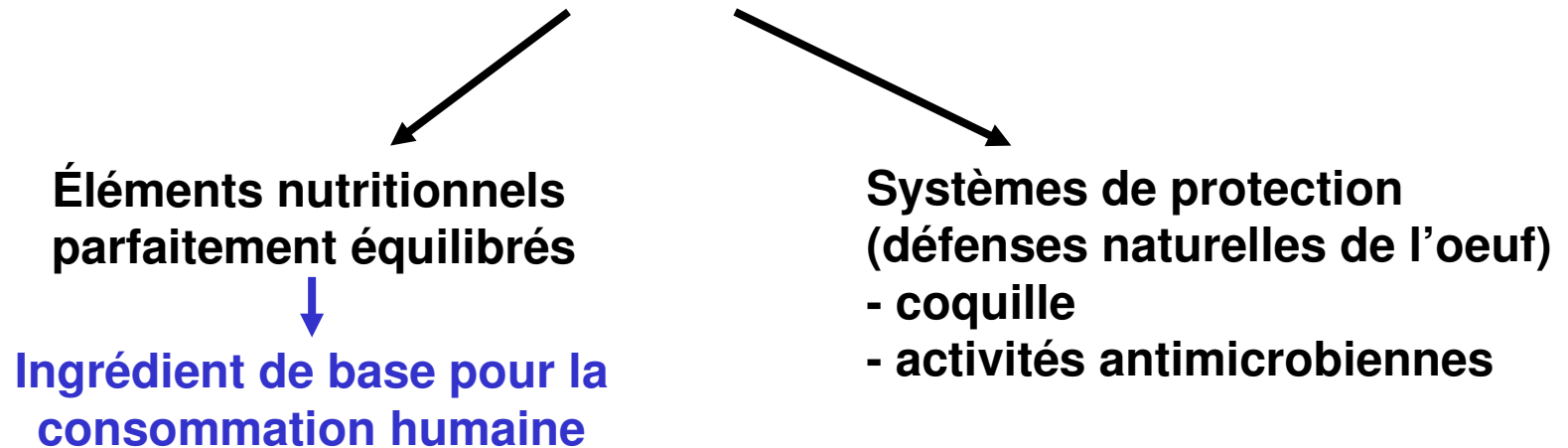
Department of cellular and molecular medicine, Ottawa, Canada



L'œuf des oiseaux

Chambre isolée pour permettre le développement de l'embryon

Doit contenir la totalité des composants nécessaires au développement embryonnaire



L'œuf de poule

Chambre isolée pour permettre le développement de l'embryon

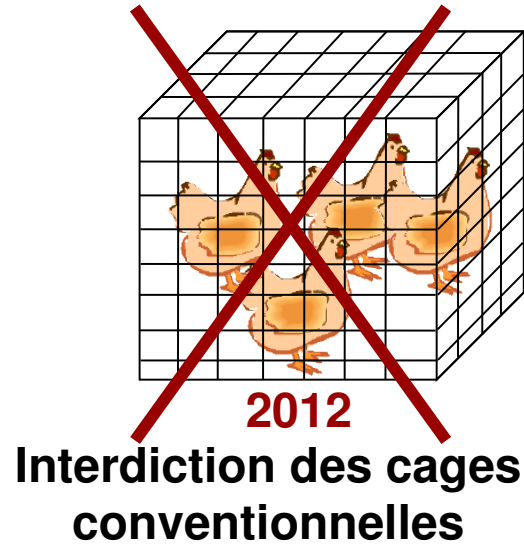


Source majeure de composés avec un large spectre d'activités biologiques

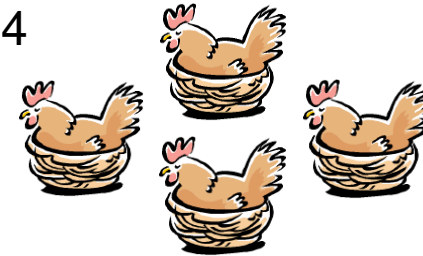
Potentiel pour les industries pharmaceutiques, cosmétiques, agroalimentaires et pour la santé humaine et animale

→ Valorisation alimentaire et non alimentaire de l'oeuf

Le contexte européen



Directive EU 1999/74
Animal welfare

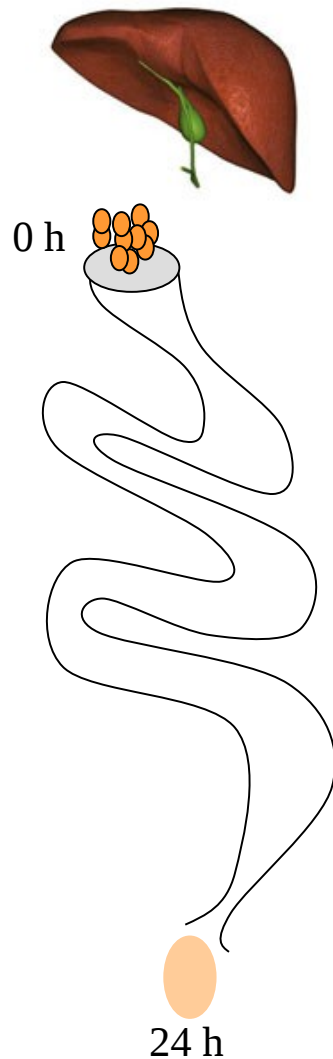


**Cages aménagées, volières
ou autres systèmes au sol**

Impact sur la qualité hygiénique de l'oeuf ?

➤ **Salmonellose ?**

La formation de l'œuf



Foie

Protéines du jaune
(maturité sexuelle)

Ovaire

infundibulum

Membranes vitellines
(< 1 h)

Magnum

Protéines du blanc
(1h – 4h30)

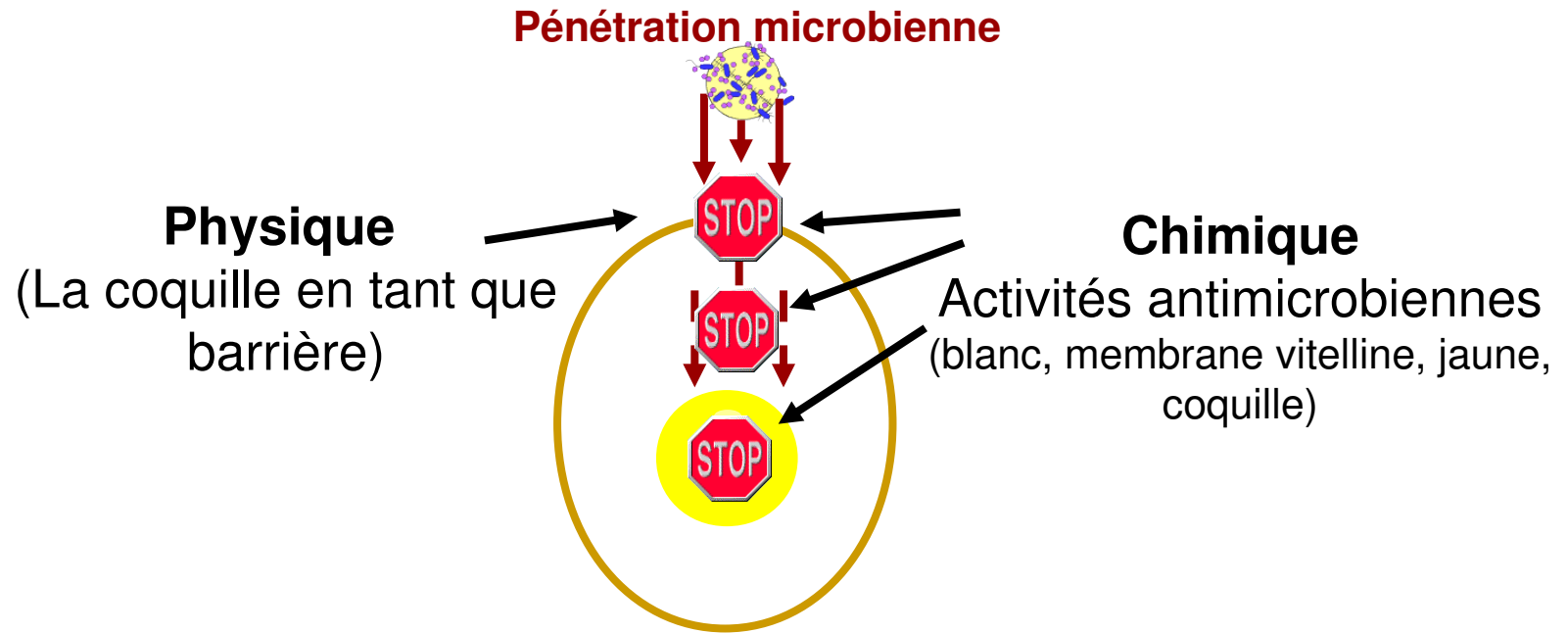
Isthme

Membranes coquillières
(4h30-6h)

Utérus

Calcification de la coquille
(6h – 24 h)

Les défenses naturelles de l'œuf



Qualité microbienne des oeufs ?



Toxi-infections humaines

Les défenses naturelles de l'œuf

Chambre isolée pour permettre le développement de l'embryon

Large spectre d'activités biologiques dans le jaune, la membrane vitelline, le blanc et la coquille

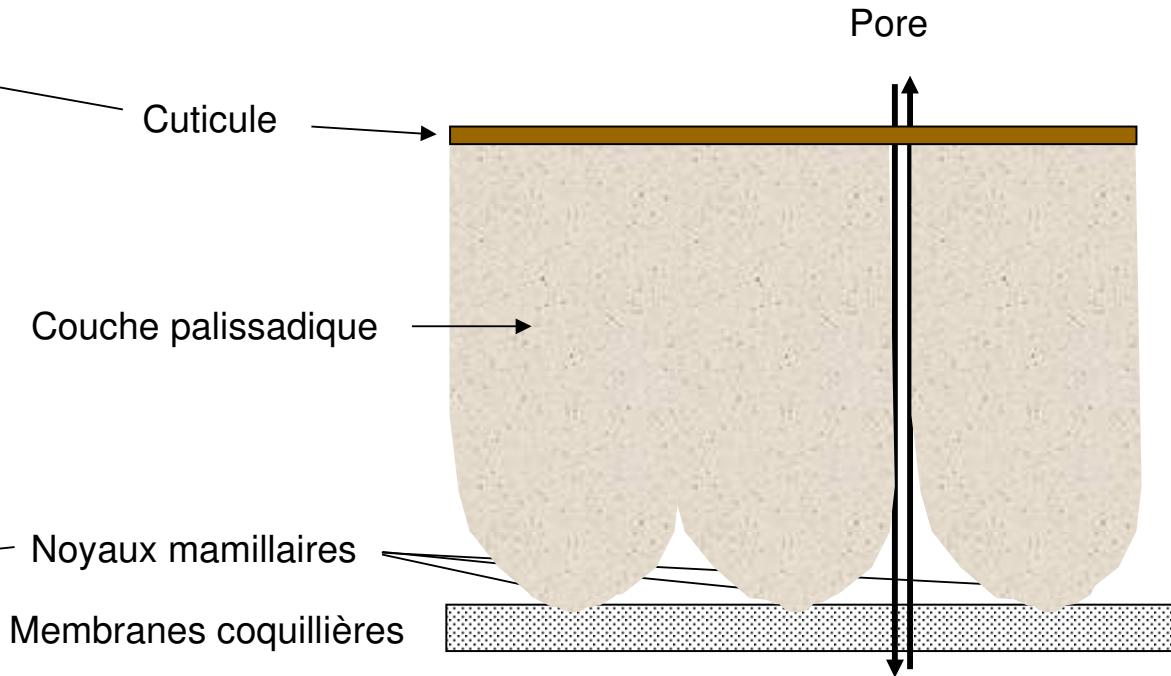
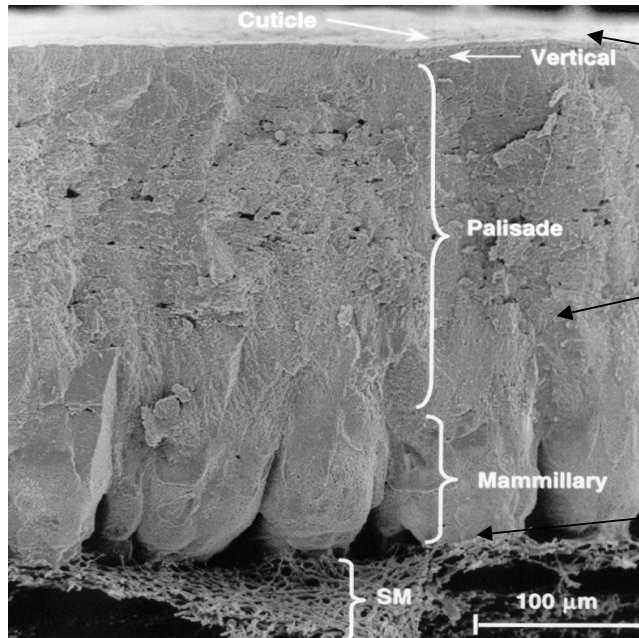
- Transport lipides, ions
- Processus inflammatoires et anti-oxydants
- Développement embryonnaire
- Défenses naturelles de l'œuf
 - ✓ Biominéralisation de la coquille d'œuf (défense physique)
 - ✓ Molécules antimicrobiennes (défense chimique)

Comprendre et améliorer les défenses naturelles de l'oeuf



Identifier et caractériser les protéines de l'oeuf

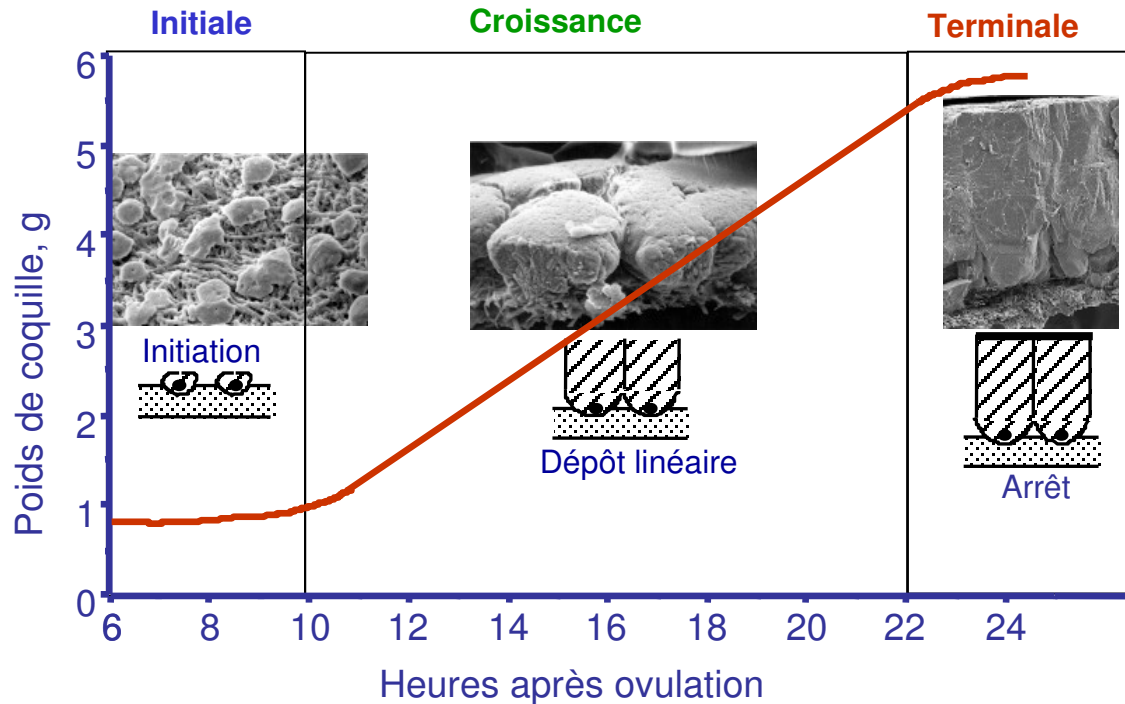
La coquille (défense physique)



La coquille (défense physique)

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

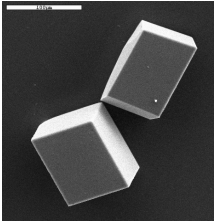
Milieu hypersaturé en calcium et carbonates



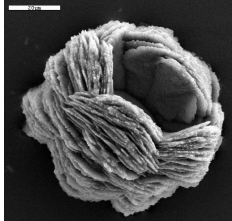
La coquille (défense physique)

→ 95% de carbonate de calcium sous forme de calcite

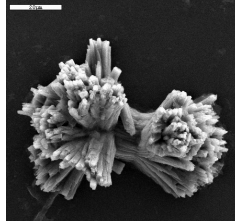
Calcite



Aragonite



Vatérite



Interaction

Quantité

Propriétés mécaniques

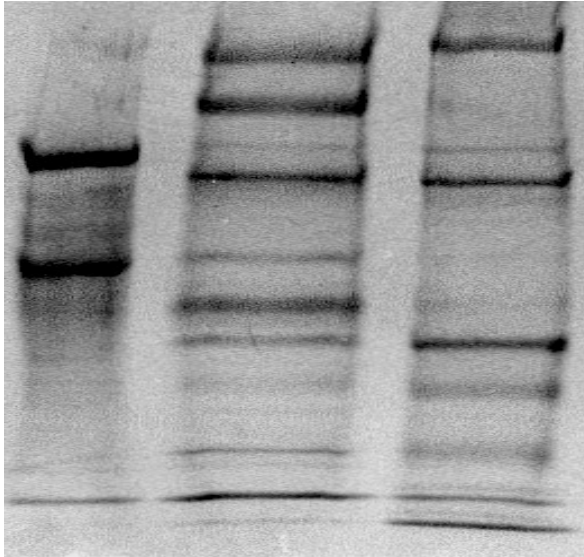
- Environ 300 μm d'épaisseur
- Résiste à 4 kg de pression

Contrôle du processus
de calcification

→ 3,5% de matière organique (matrice organique)

Protéines et protéoglycanes

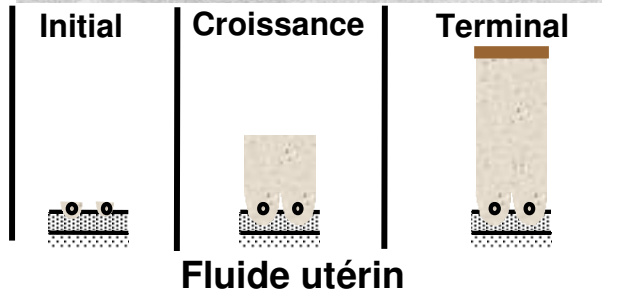
Protéines de la matrice et minéralisation de la coquille



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

Protéines de la matrice et minéralisation de la coquille

Augmente la cinétique de nucléation des cristaux

Temps nécessaire pour observer les premiers cristaux

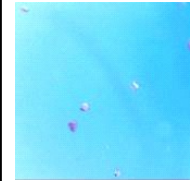
Témoins

900 minutes

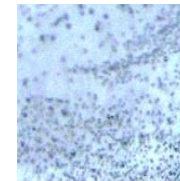
Fluide utérin

< 10 secondes

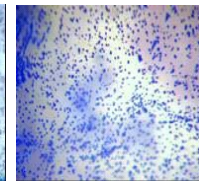
Augmente le nombre de cristaux



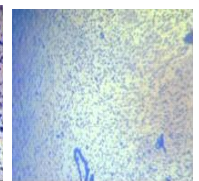
Témoins
40 cristaux



Initiale



Croissance



Terminale

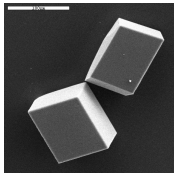
Fluide utérin > 10 000 cristaux

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

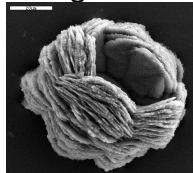
(Poultry Sci., 2000, 79, 901-907 ; J. Crystal Growth, 2008, 310, 1754-1759 ; Cryst. Growth. Des., 2008, 8, 4330-4339)

Favorise la calcite comme type polymorphique

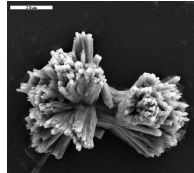
Calcite



Aragonite



Vatélite

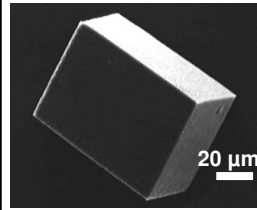


Témoins (%) 55
Fluide utérin (%) 100

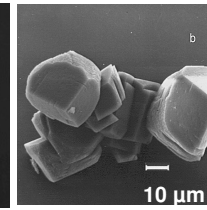
22.5
0

22.5
0

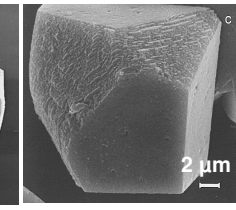
Modifie la morphologie des cristaux de calcite



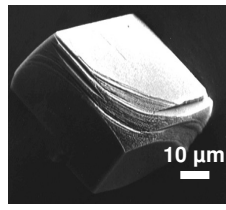
Témoin



Initiale



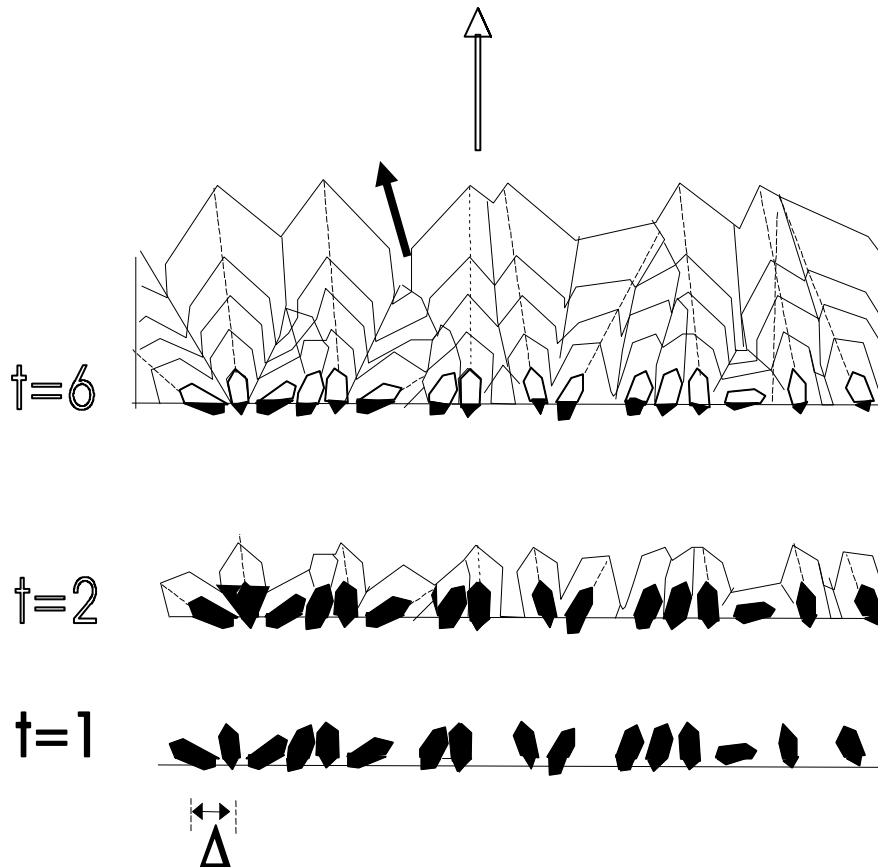
Croissance
Fluide utérin



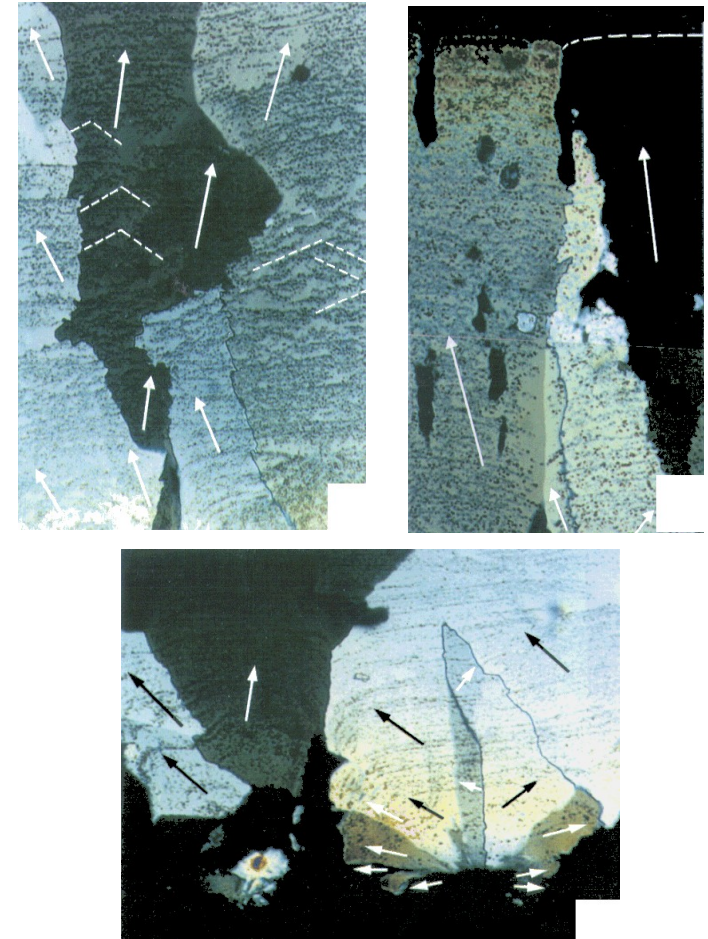
Terminale

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 préalablement identifiées dans le blanc d'œuf

Le lysozyme
L'ovotransferrine
L'ovalbumine

Les protéines ubiquitaires

La clusterine
L'ostéopontine,
NEFA

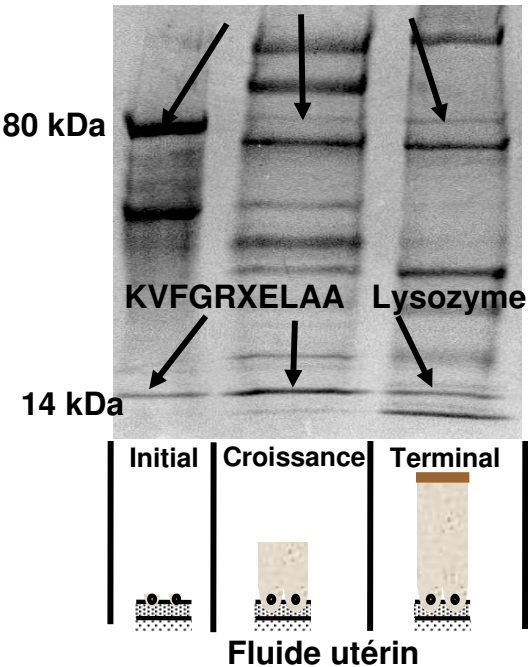
Les protéines spécifiques

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

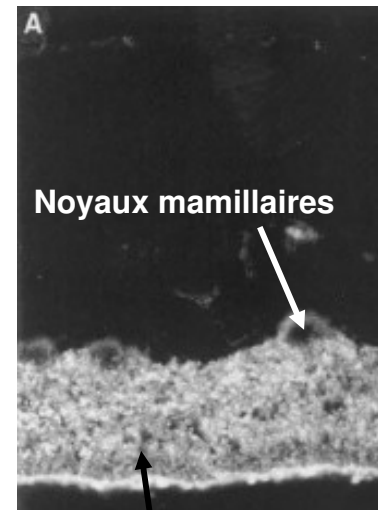
Les protéines préalablement identifiées dans le blanc d'œuf

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

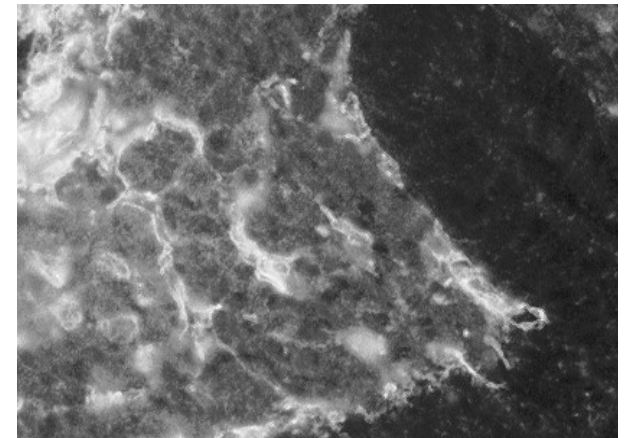
APPKSVIRXXTISS Ovotransferrine



Localisation du lysozyme dans la coquille



Origine utérine de l'ovotransferrine



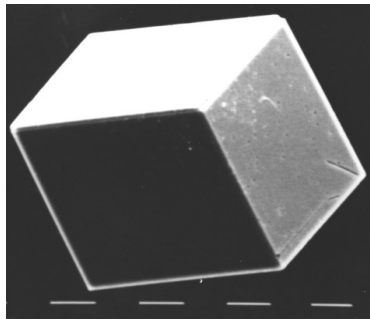
- **Présentes dans la coquille**
- **sécrétées par les tissus où se forme la coquille**

Les protéines préalablement identifiées dans le blanc d'œuf

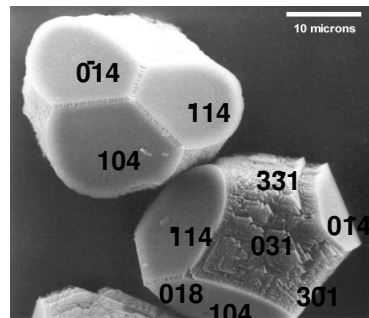
→ **lysozyme** (*Matrix Biol.*, 2000, 19, 443-453) **et ovotransferrine** (*Connect. Tissue. Res.*, 2001, 42, 225-267)

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

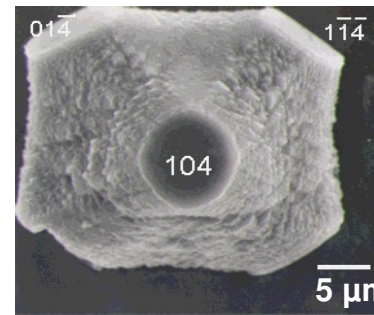
Interaction avec le carbonate de calcium



Témoin



Ovotransferrine



Lysozyme

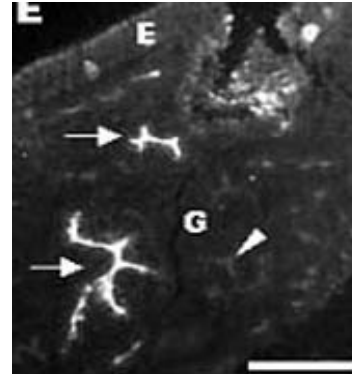
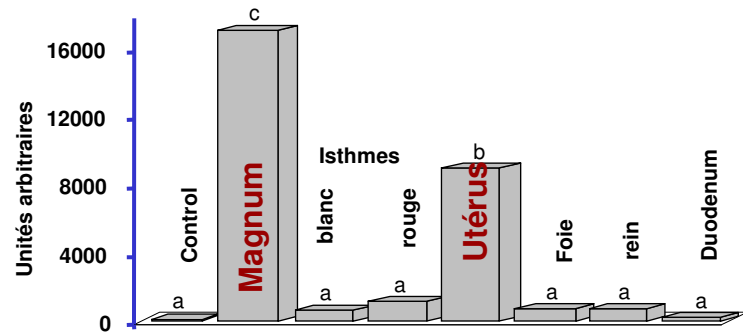
➤ Jouent un rôle antimicrobien (protection chimique de l'œuf et de l'embryon)

- * Ovotransferrine → Inhibe la croissance des bactéries à Gram négatif par privation de fer
- * Lysozyme → Hydrolyse la paroi des bactéries à Gram positif

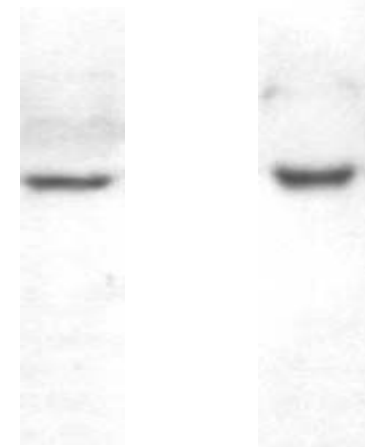
Les protéines ubiquitaires

→ **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

➤ **Nouvelle protéine du 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

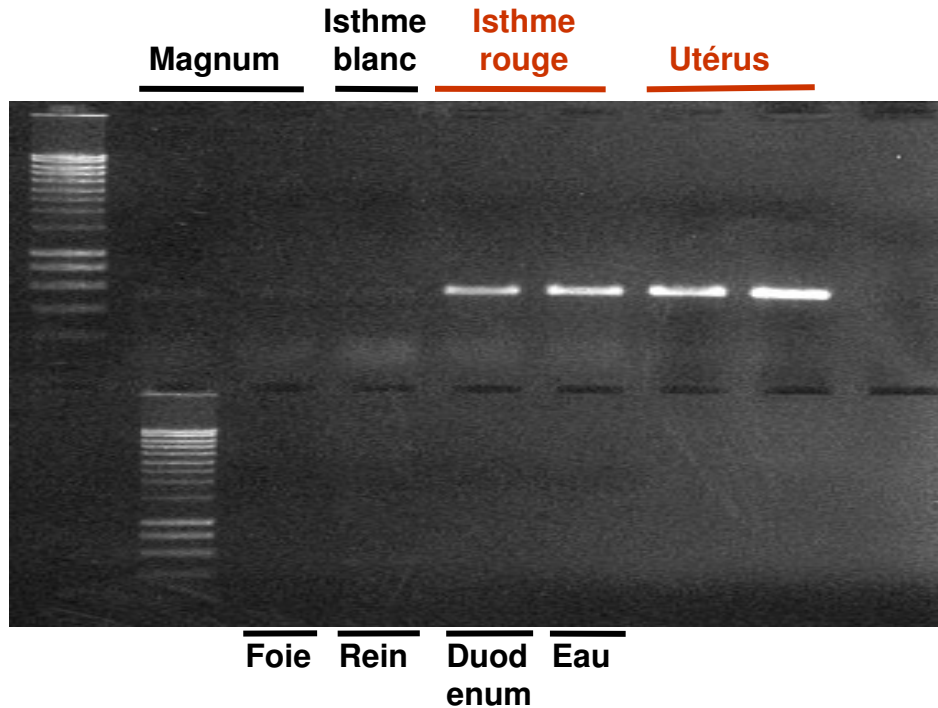


Traduction en protéine du cDNA

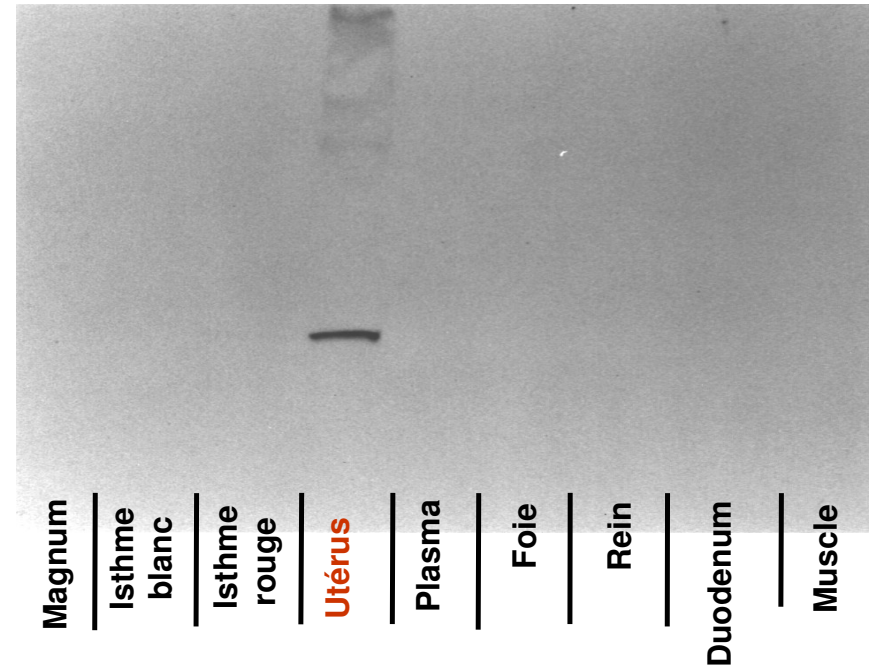
Les protéines spécifiques de la coquille

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

➤ Uniquement exprimées dans les tissus où se forme la coquille



RT-PCR de l'ovocalyxine-32



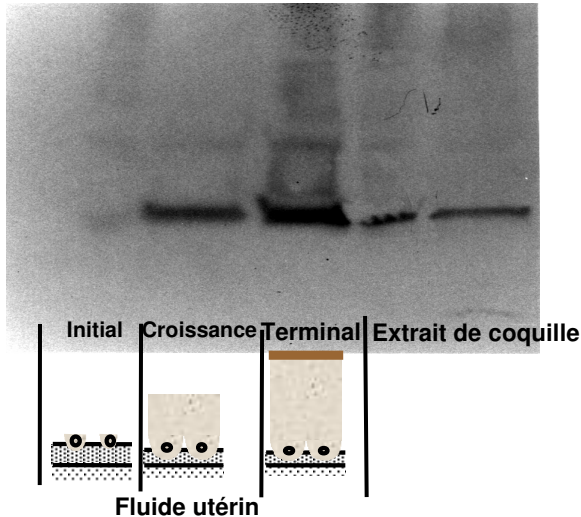
Western blot de l'ovocalyxine-32

Les protéines spécifiques de la coquille

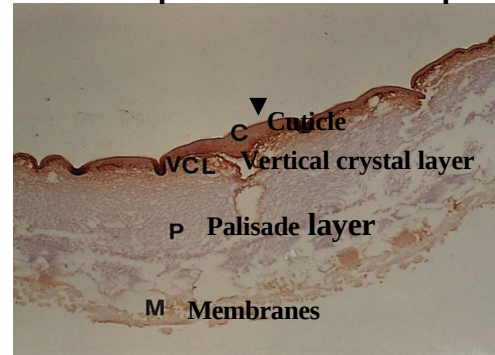
→ **Ovocalyxine -32** (*J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 39243-39252) **(3/3)**

➤ **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*

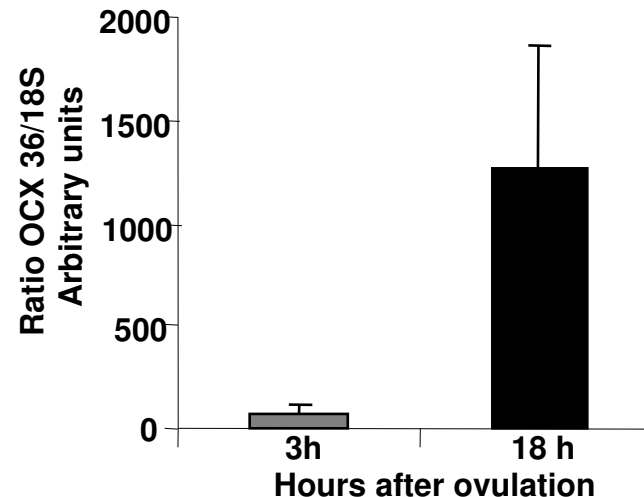
(*Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Bio*, 2007, 147, 172-177)

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)

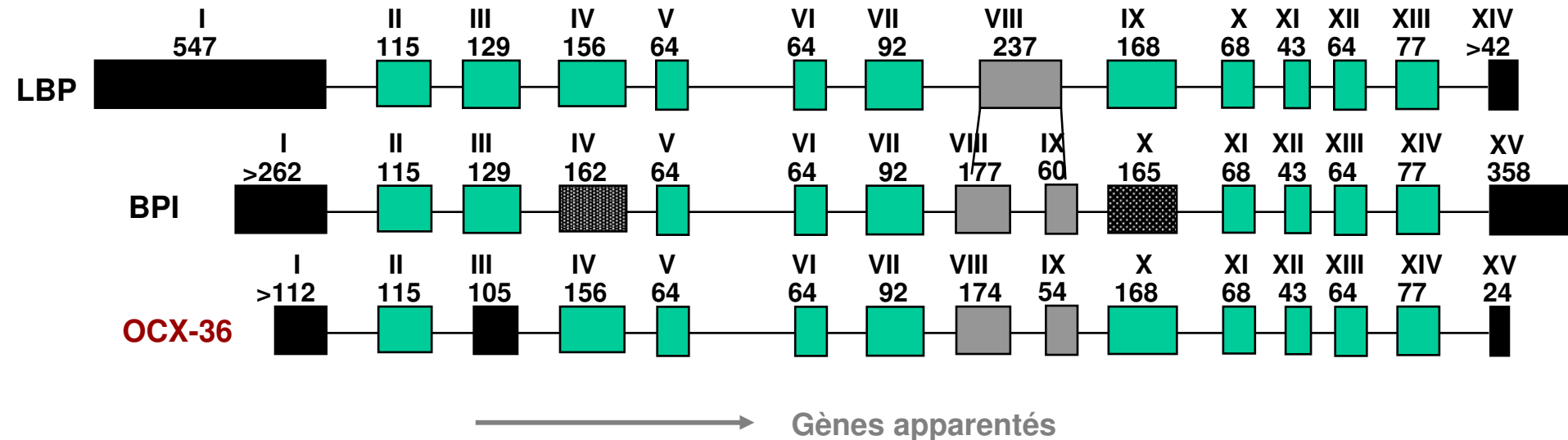
➤ Joue un rôle antimicrobien (protection chimique de l'œuf et de l'embryon)

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

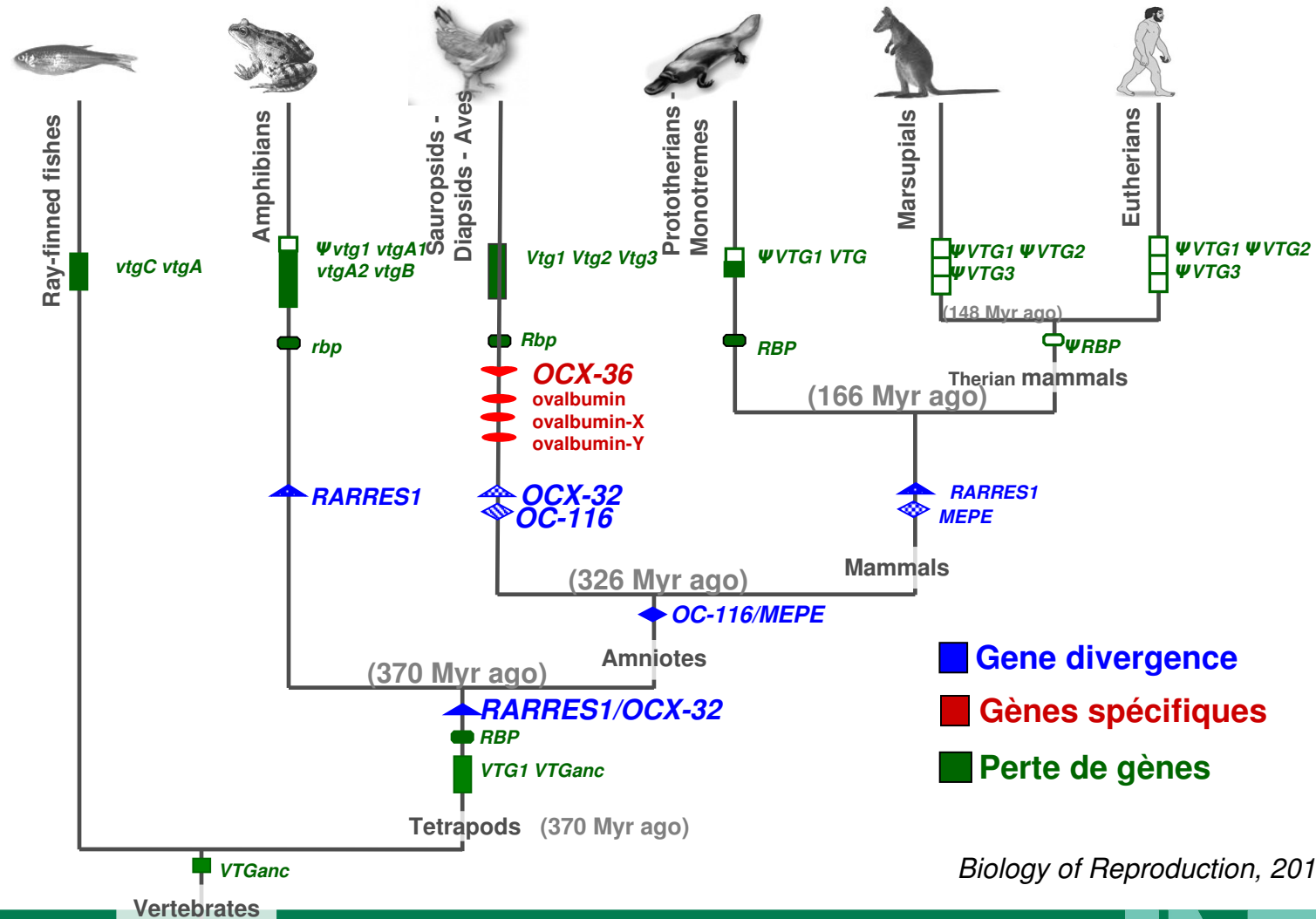
Se lie au lipopolysaccharide (LPS) de la paroi des bactéries à Gram négatif
→ Mort de la bactérie

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

Architecture du gène



Evolution des gènes codant les protéines de l'oeuf



Biology of Reproduction, 2010, In Press

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'oeuf

→ **2010, environ 1000 protéines**

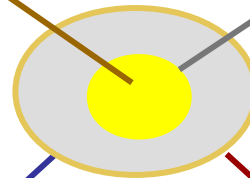
→ Approche protéomique

316 protéines dans le
jaune d'oeuf

137 protéines dans la
membrane vitelline

148 protéines dans le
blanc d'oeuf

**528 protéines dans
la coquille**

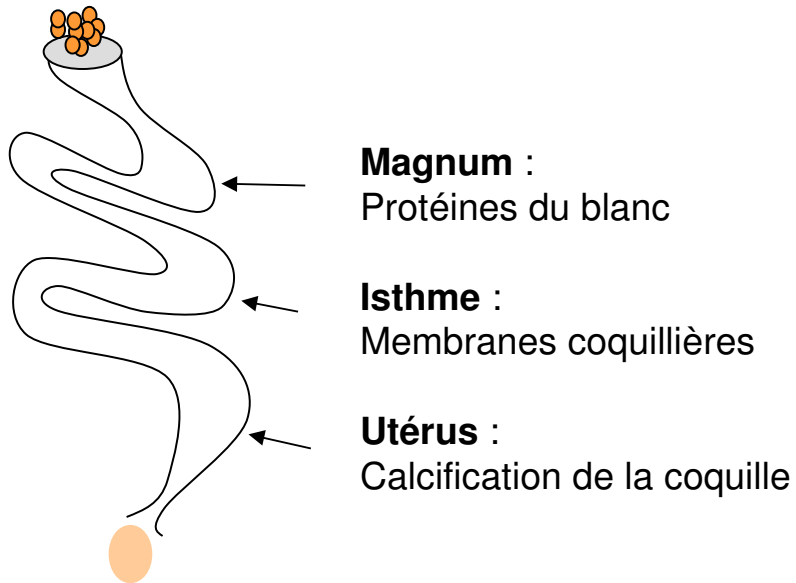


Caractériser les activités biologiques de ces protéines, un challenge en cours de réalisation

Les développements récents

→ Approche transcriptomique (1/4)

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



Utilisation de puces à ADN

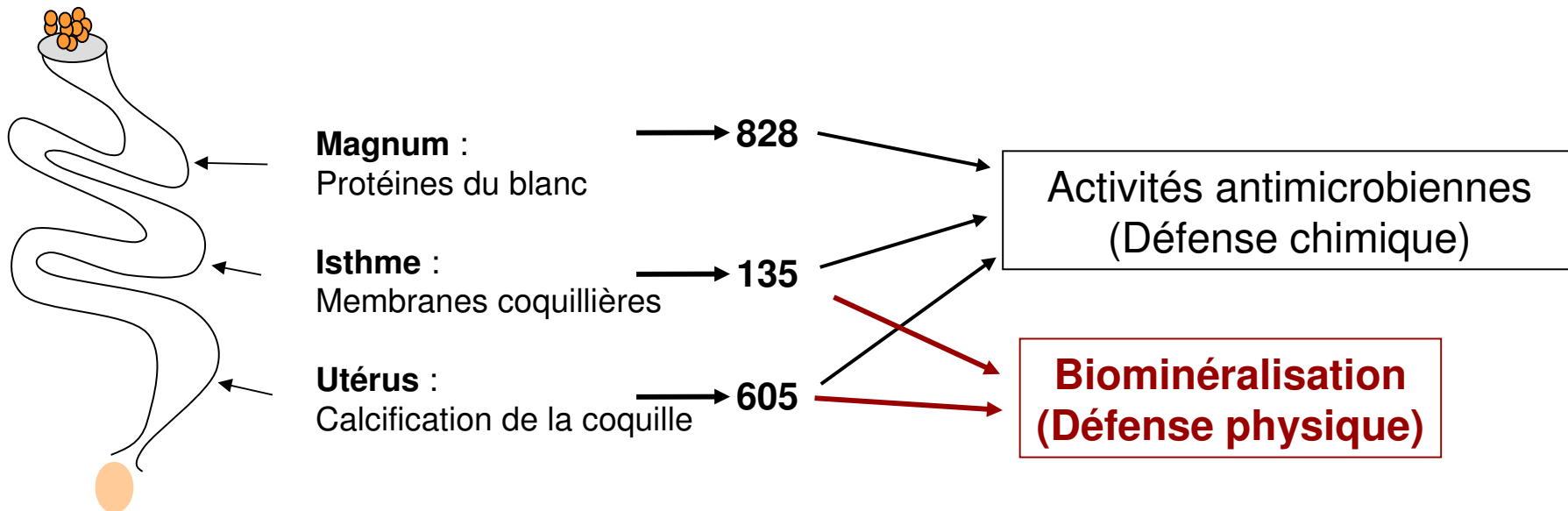
↓
Comparaison de l'expression des gènes entre les différents tissus

BMC Genomics, 2010, 11, 57

Les développements récents

→ Approche transcriptomique (2/4)

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

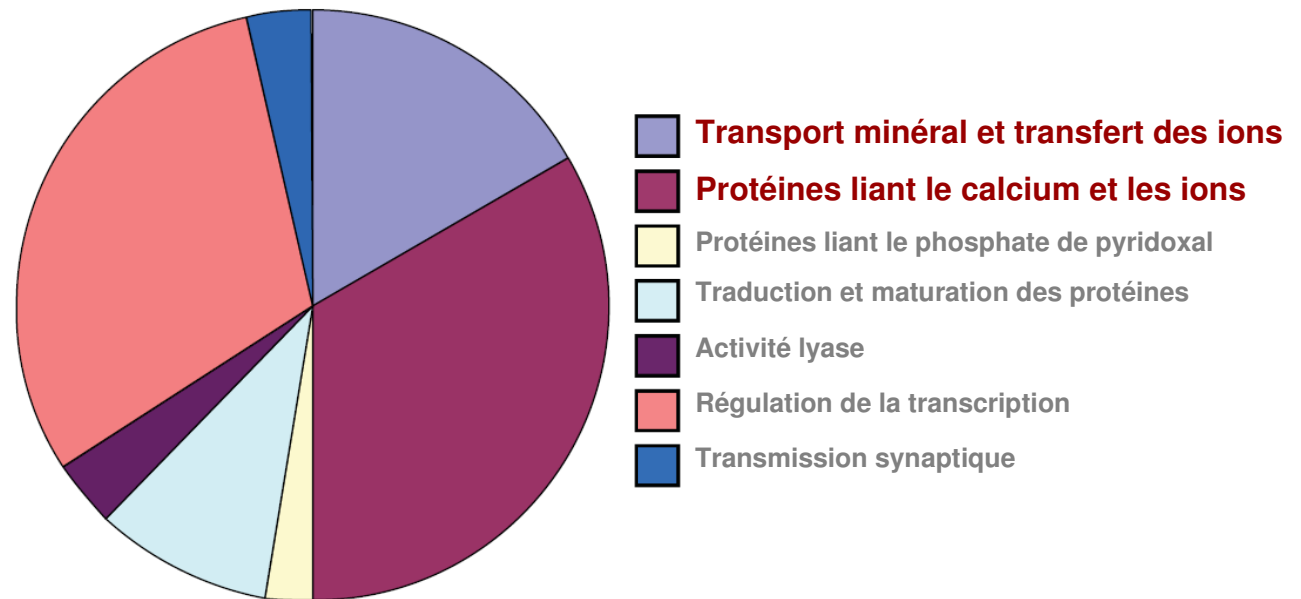


BMC Genomics, 2010, 11, 57

Les développements récents

→ Approche transcriptomique (3/4)

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



BMC Genomics, 2010, 11, 57

Les développements récents

→ Approche transcriptomique (4/4)

➤ Nouvelles protéines spécifiques de la coquille avec des activités antibactériennes

β défensine 9 aviaire

Peptide antimicrobien à large spectre

Mannose-binding protein C

Molécule contenant un domaine C-type lectin like

Activité antimicrobienne potentielle

Amyloid beta A4 protein / Beta amyloid protein 751

Domaine de liaison à l'héparine suggéré comme pouvant lier les LPS bactériens

Activité antimicrobienne potentielle

ETC....

Les développements récents

→ Approche génomique

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

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)

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'oeuf

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. Mercierand.....

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)



S A B R E

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)



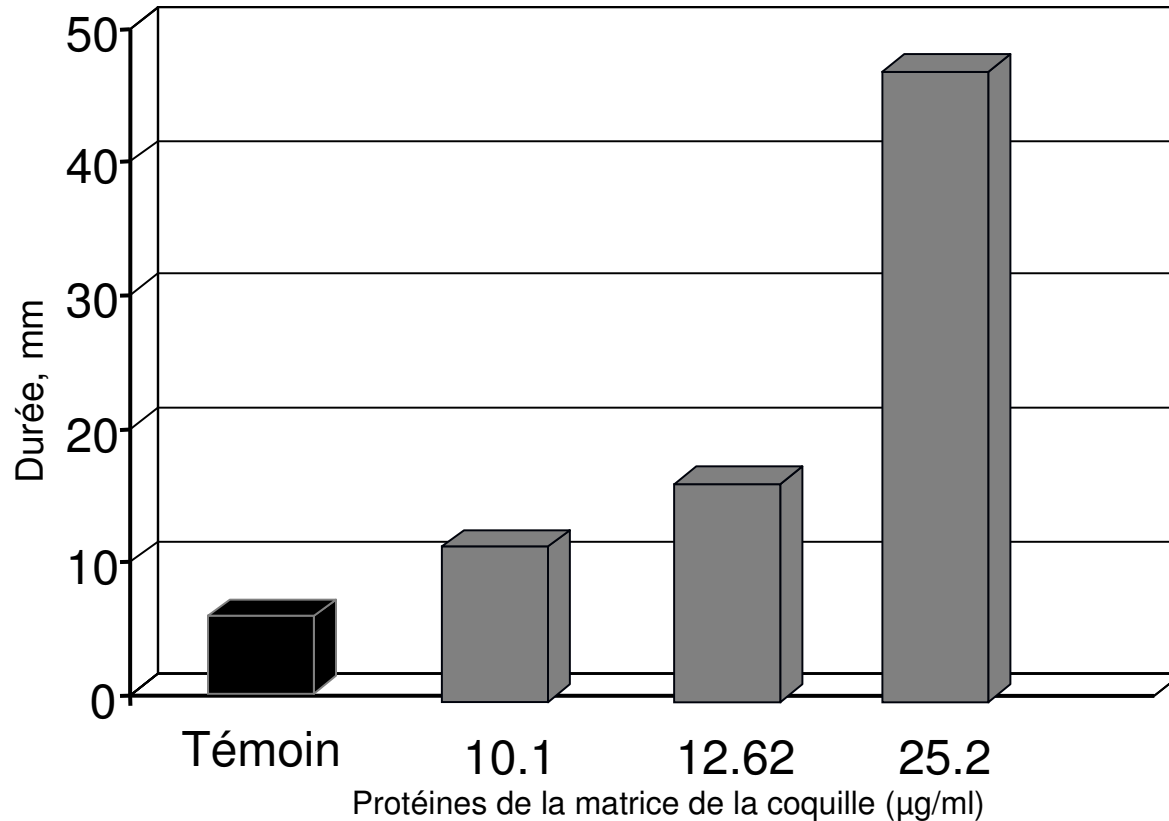
Microbiologie de l'œuf et des ovoproduits

- 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

Protéines de la matrice et minéralisation de la coquille

Cinétique *in vitro* de précipitation du CaCO_3



British Poultry Sci., (1995), 37, 853-866