



Biominéralisation de la coquille d'oeufs d'oiseaux

Joël Gautron

► To cite this version:

Joël Gautron. Biominéralisation de la coquille d'oeufs d'oiseaux. UE biominéralisation, 2017, pp.87.
hal-02788200

HAL Id: hal-02788200

<https://hal.inrae.fr/hal-02788200>

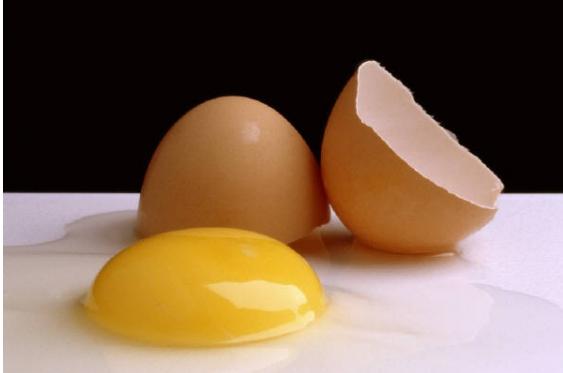
Submitted on 5 Jun 2020

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License



Biominéralisation de la coquille d'œufs d'oiseaux

Joël Gautron

INRA, UR83 Recherches

Avicoles

37380 Nouzilly

L'œuf de poule

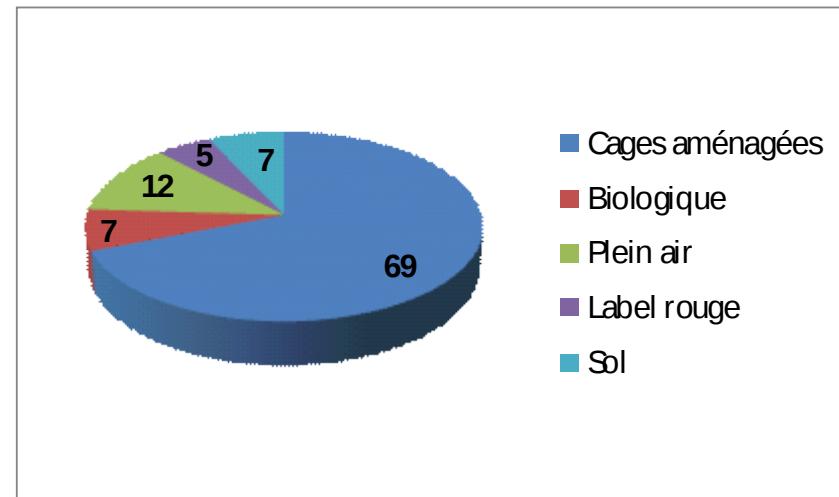
L'Œuf, un produit de base pour l'alimentation humaine

Au niveau mondial en 2012

- 66,4 millions de tonnes par an (>1200 milliards d'œufs)
- Accroissement du marché de 2.2 %
- Premier producteur est la Chine (24,5 MT – 37 % de la production mondiale)
- Union européenne second producteur mondial (6 MT- 9 % de la production mondiale)

Filière française en 2013

- 15,2 milliards d'œufs
(47 millions de poules pondeuses)
- 1.37 milliards d'Euros
- 4 % de la valeur des productions animales
- 1.7 % de la valeur des productions agricoles



Consommation

- 145 œufs par an et par habitant dans le monde
- 216 œufs par an et par personne en France
- 60% sous forme d'œufs en coquille
- 40% sous forme d'ovoproduits

Source ITAVI

Microbiologie de l'œuf et des ovoproducts

- 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 consommés crus (mayonnaise...)
- Impliqués dans 45% des salmonelloses (62 % pour *Salmonella enteritidis*)

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

L'Œuf, un produit naturellement protégé

Chambre isolante et défenses naturelles

Doit contenir la totalité des composants nécessaires au développement embryonnaire

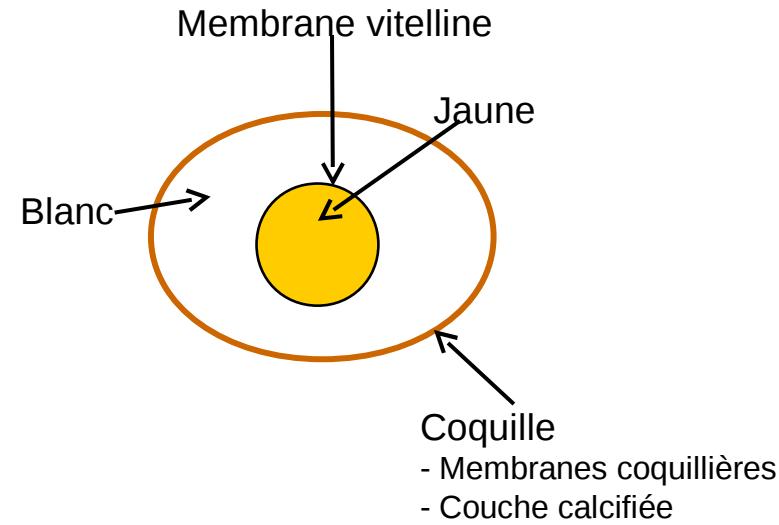
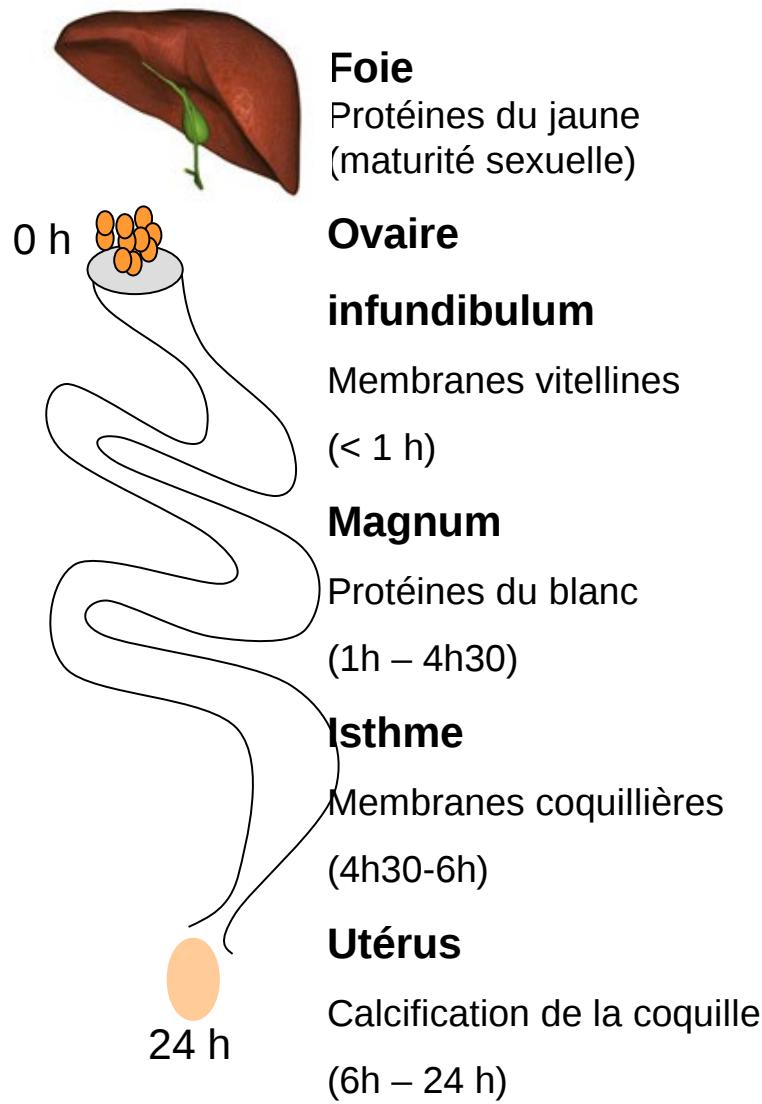


Agressions physiques

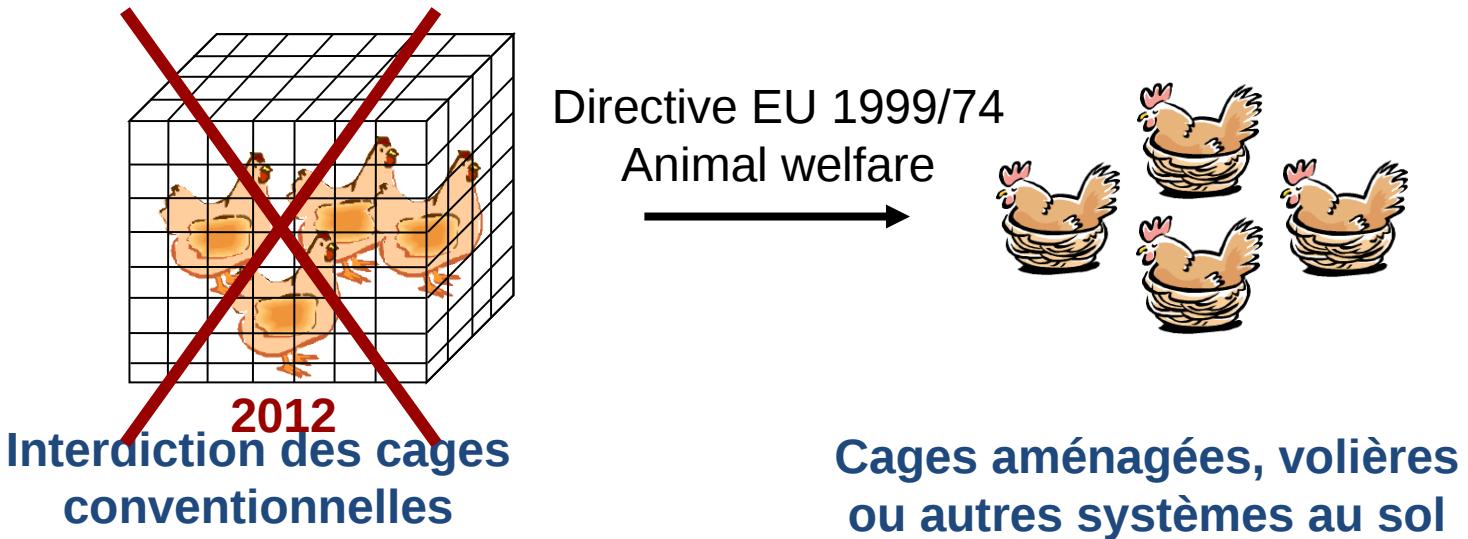
Microbes

- Éléments nutritionnels parfaitement équilibrés
- Nombreux composés avec un large spectre d'activités biologiques
- Systèmes de protection (défenses naturelles)
 - Défense physique (coquille principalement)
 - Défense chimique (activité antimicrobienne des protéines de l'œuf)

La formation de l'œuf



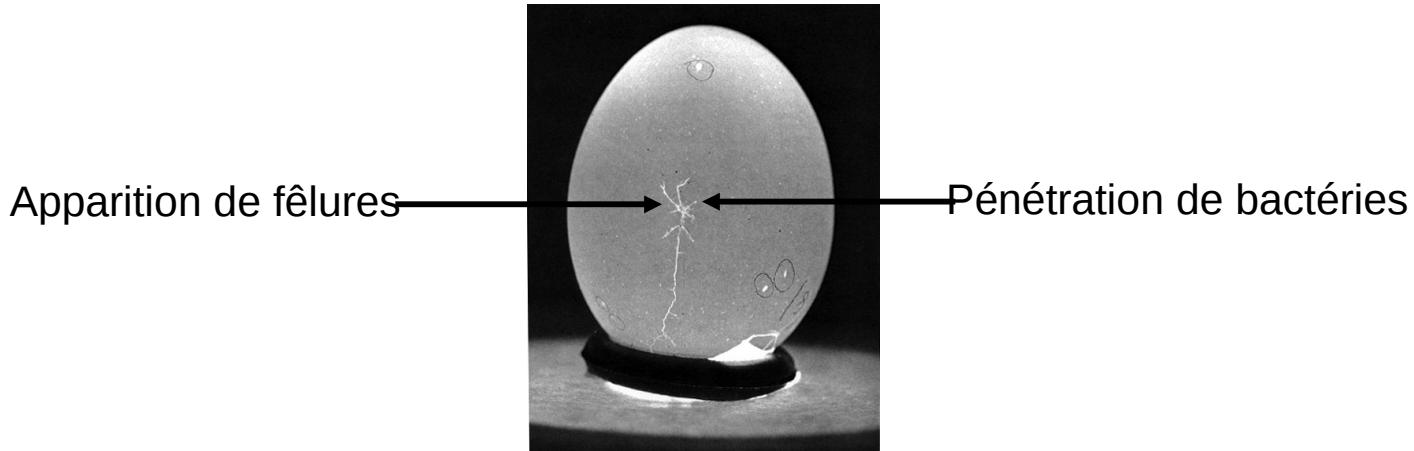
Le contexte européen



Impact sur la qualité hygiénique de l'oeuf ?

La coquille : une barrière physique contre la pénétration bactérienne

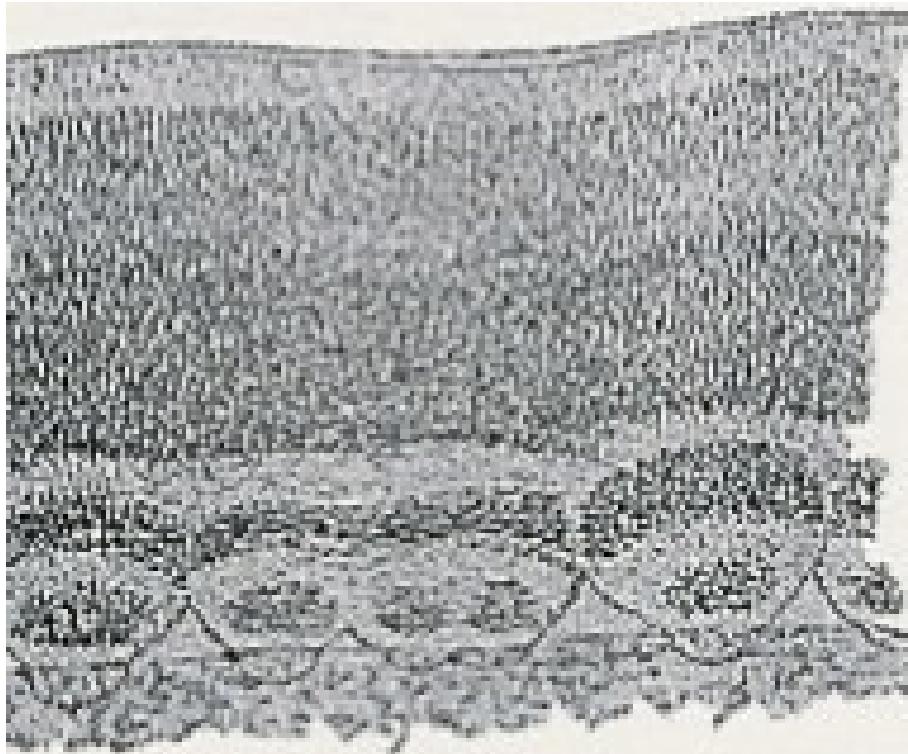
□ L'intégrité de la coquille est cruciale pour la sécurité alimentaire du consommateur



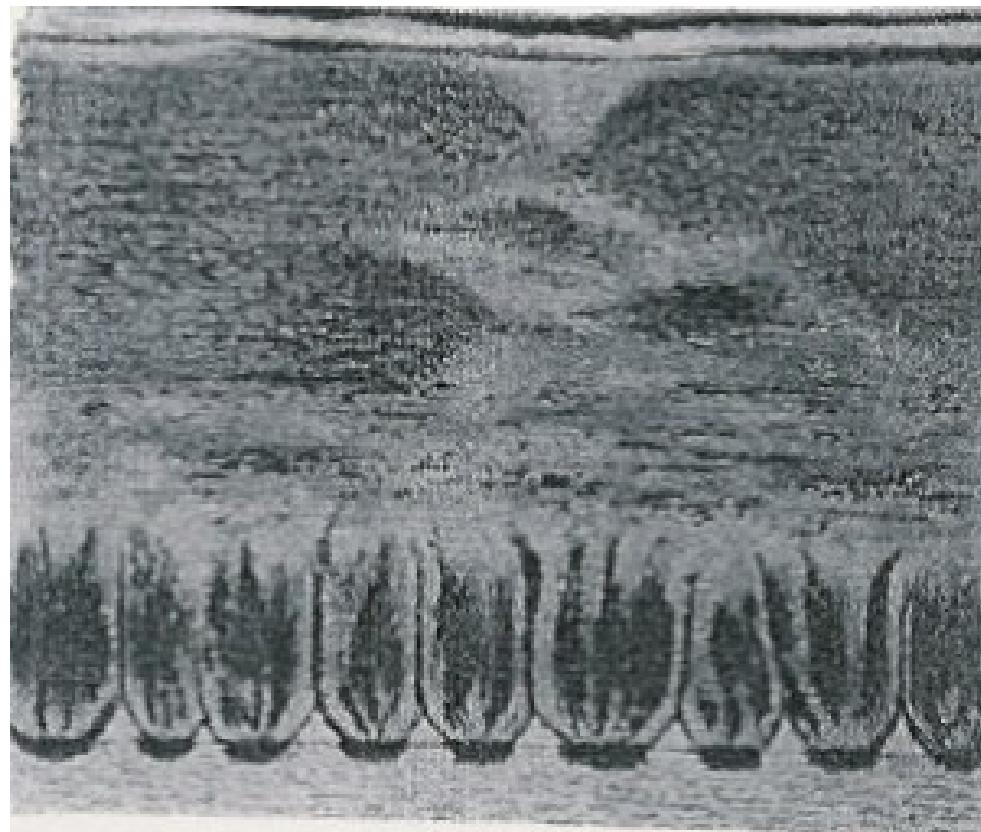
Comprendre les mécanismes de fabrication de la coquille et déterminer l'origine de ses faiblesses

Développer de nouveaux outils pour la sélection

La coquille (défense physique)



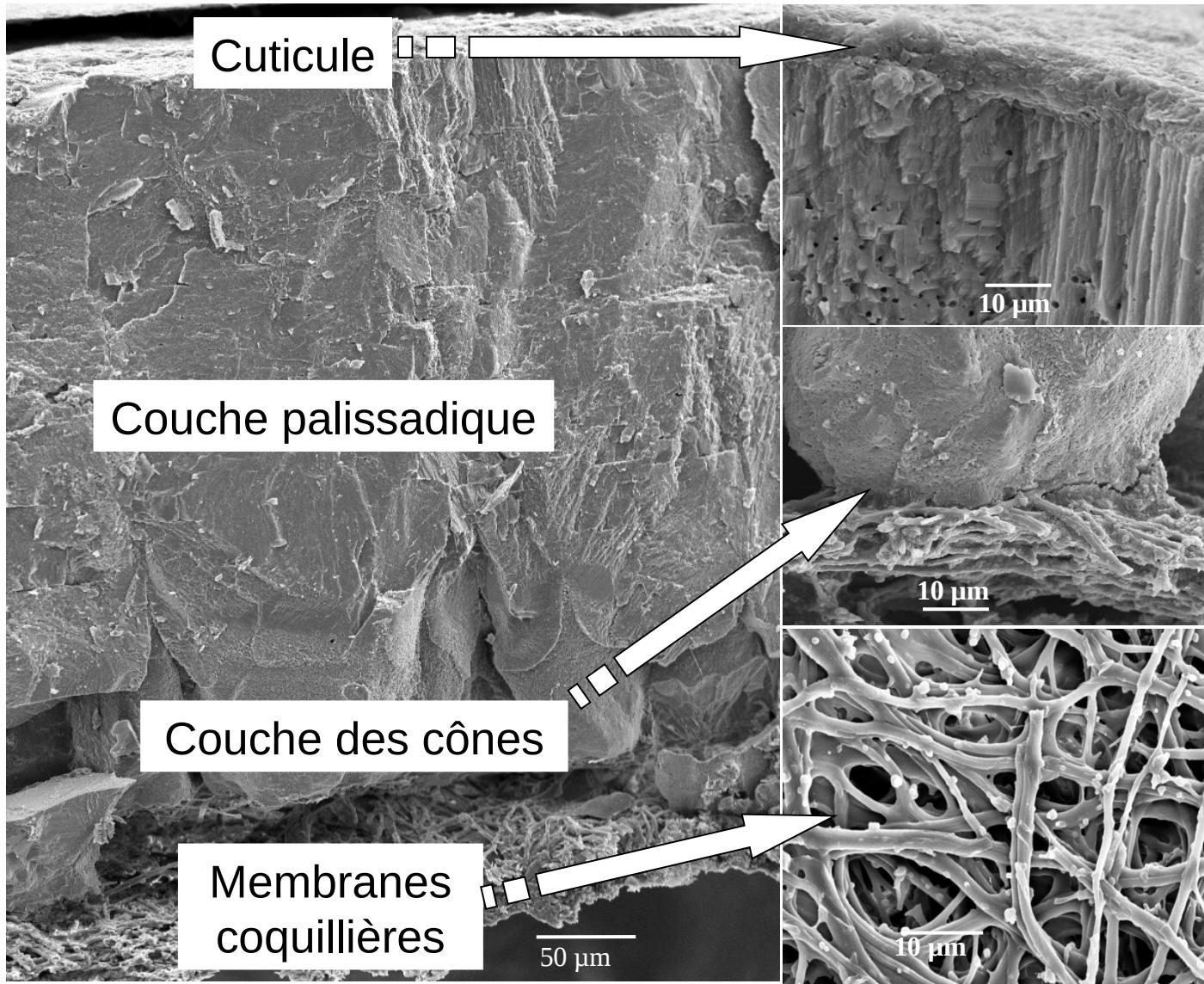
Gallus gallus x 72



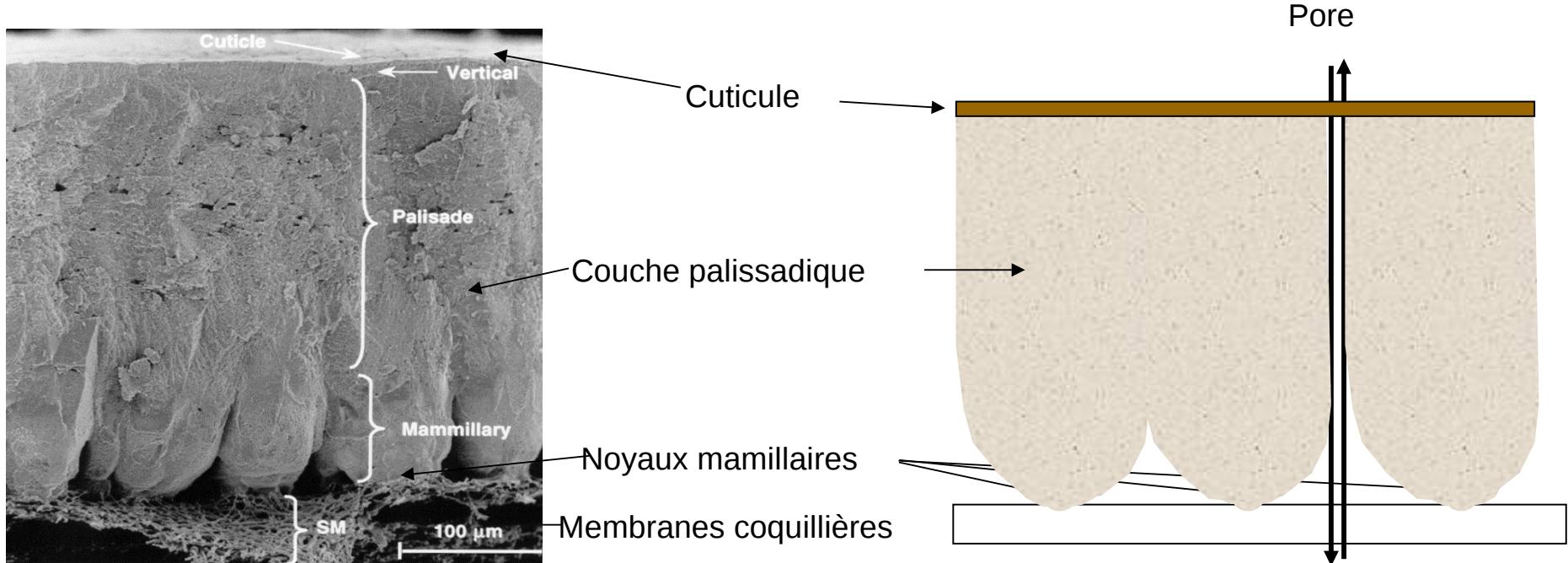
Cygnus x 53

Dessin de Wilhem von Nathusius, 1821-99

La coquille (défense physique)



La coquille (défense physique)



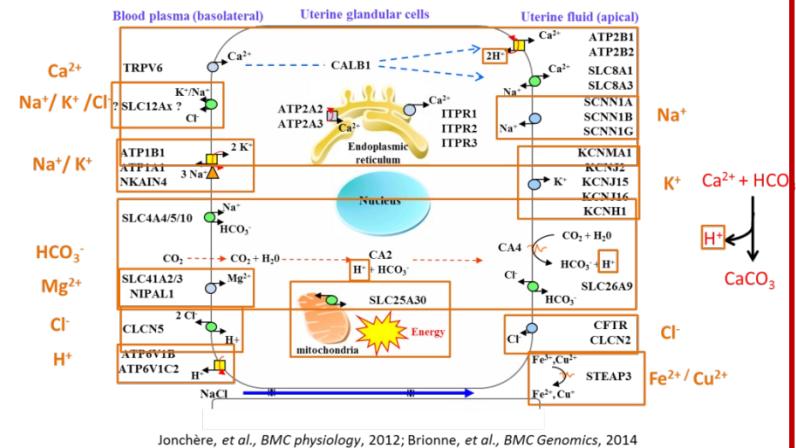
Eggshell Biominerisation in uterus

Supply of minerals for shell mineralization

**General model describing
uterine ion transporters
during eggshell
calcification**

Jonchere et al., 2012, Bmc physiology

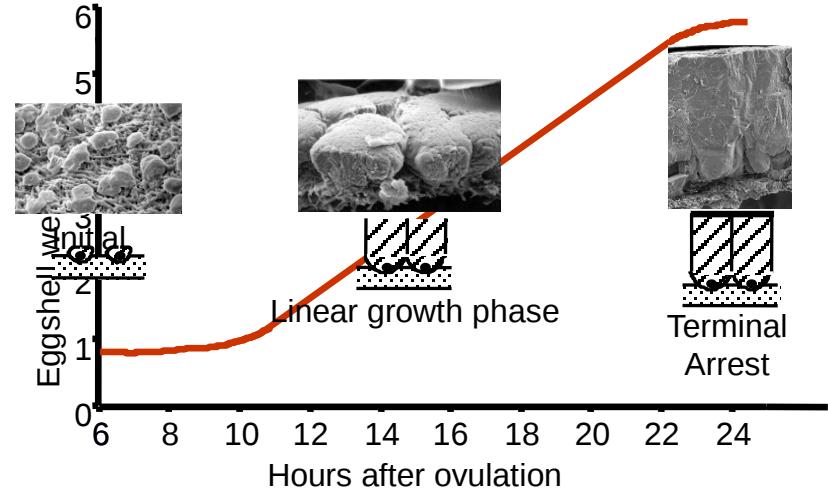
Brionne et al., 2014, Bmc Genomics



Jonchere, et al., BMC physiology, 2012; Brionne, et al., BMC Genomics, 2014

Biominerisation process

**3 main phases
in the uterine
fluid
(acellular milieu)**

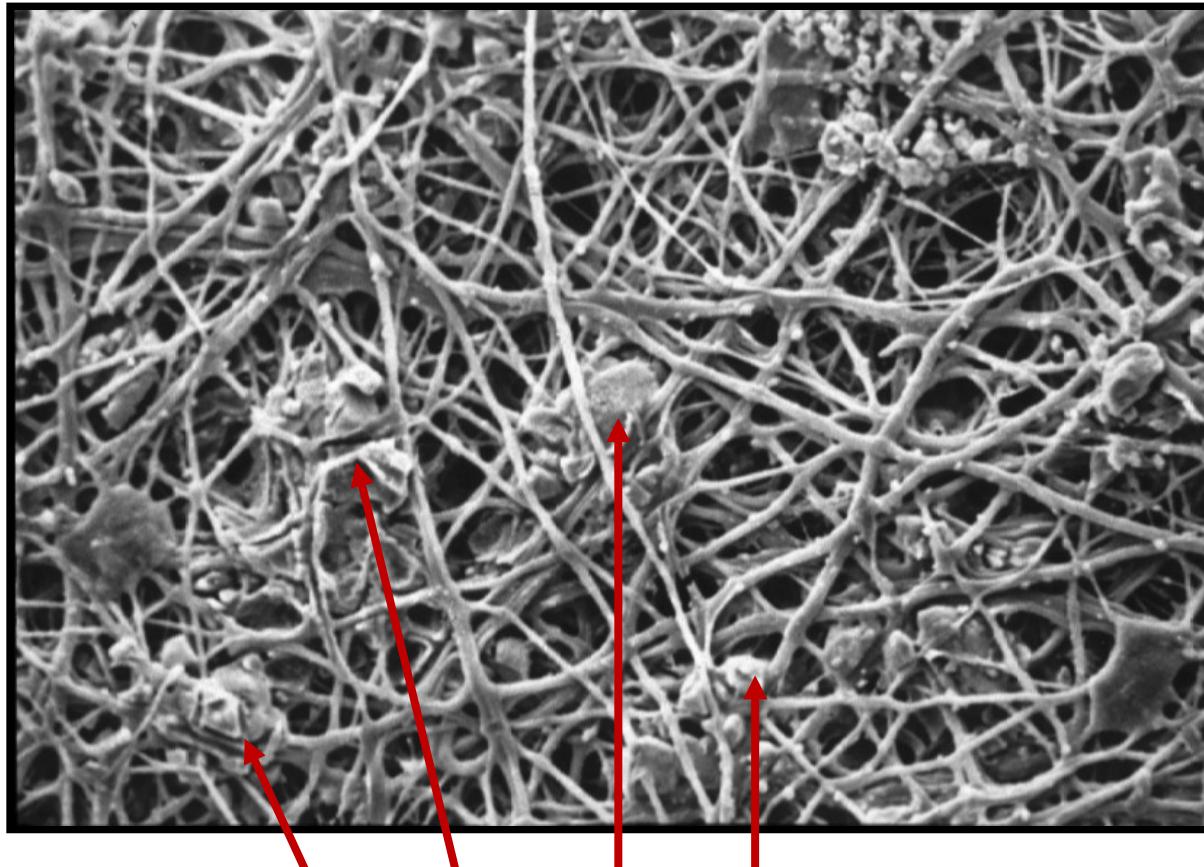
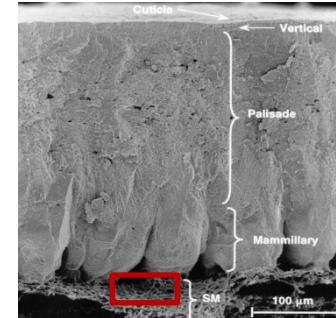


La formation de la coquille des oiseaux, un processus de biominéralisation

- Minéralisation de la coquille se produit dans l'utérus qui constitue un espace compartimenté**
- Les cellules de l'utérus sécrètent un fluide acellulaire (liquide utérin) dans lequel se produit la minéralisation**
- L'ensemble des constituants minéraux et organiques nécessaires à la formation de la coquille sont présents dans ce milieu**
- Le carbonate de calcium précipite à partir du calcium et des bicarbonates du fluide utérin**
- Le calcium et les carbonates se trouvent à des concentrations élevées**
- Le produit de solubilité est dépassé de 100 fois environ**

La formation de la coquille

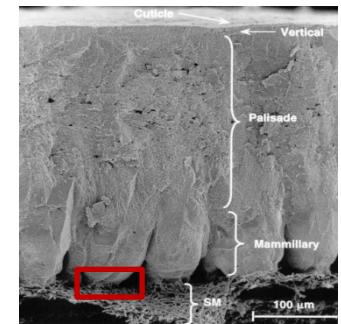
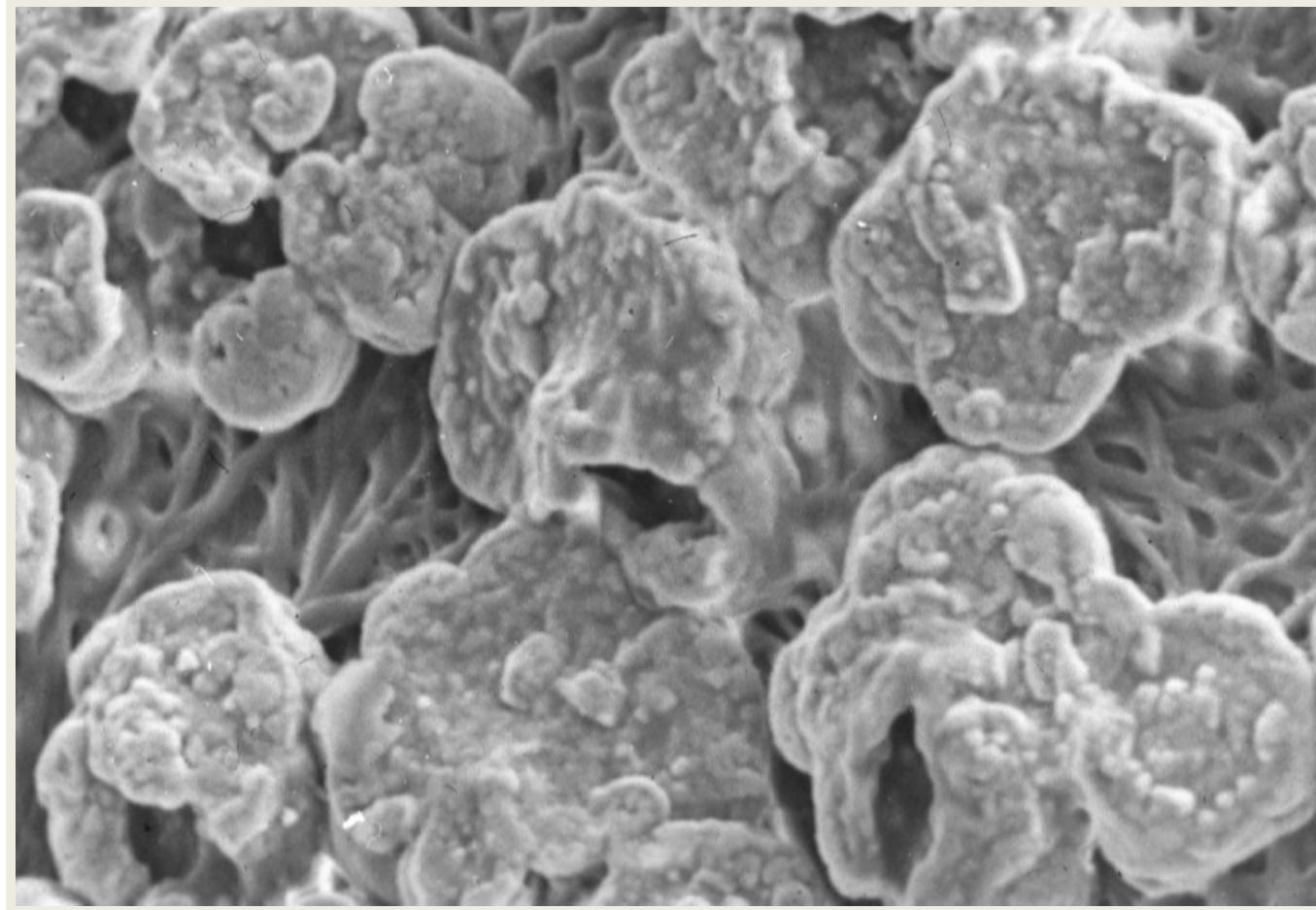
La phase initiale



Le carbonate de calcium se dépose en des sites organiques (noyaux mamillaires) en surface de la membrane de l'œuf

La formation de la coquille

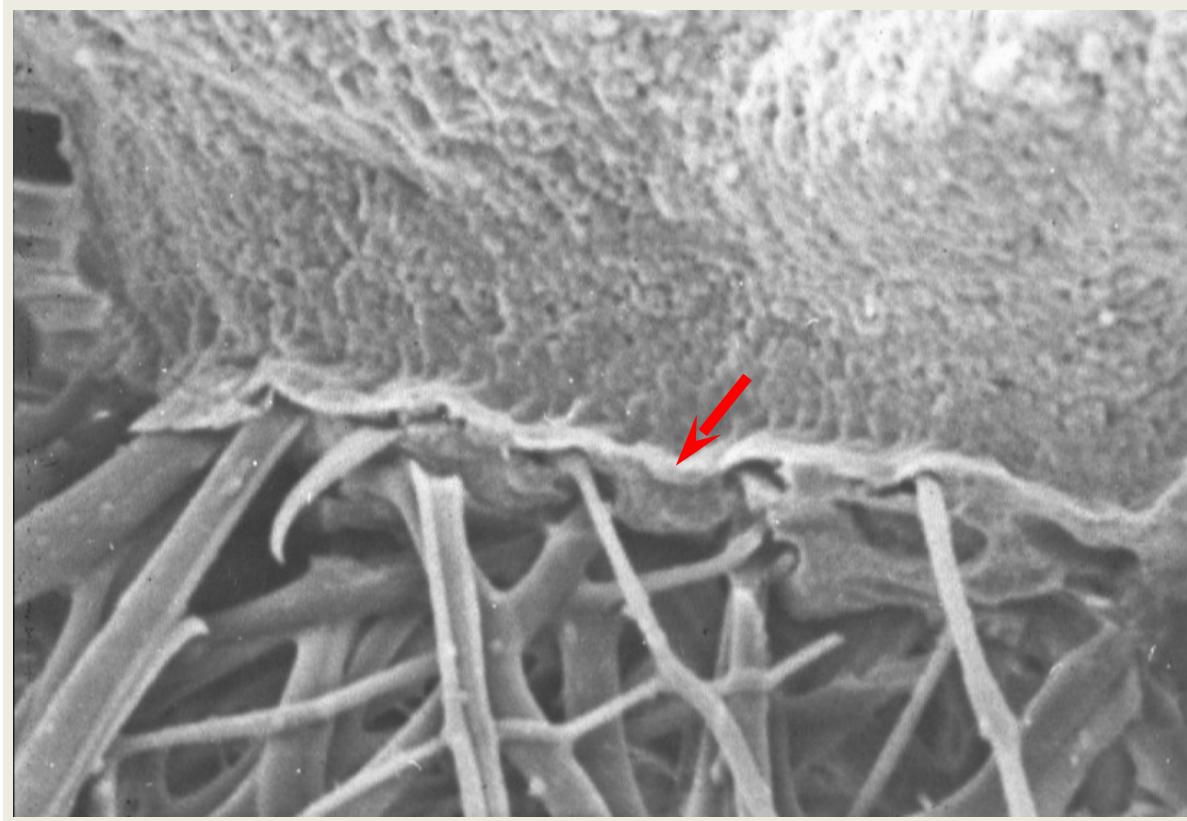
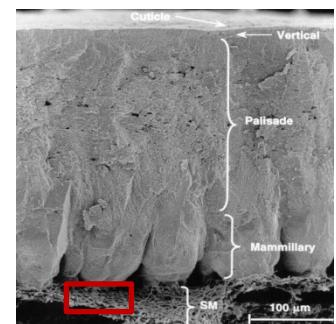
La phase initiale



Peu à peu les noyaux mamillaires sont recouverts de calcite

La formation de la coquille

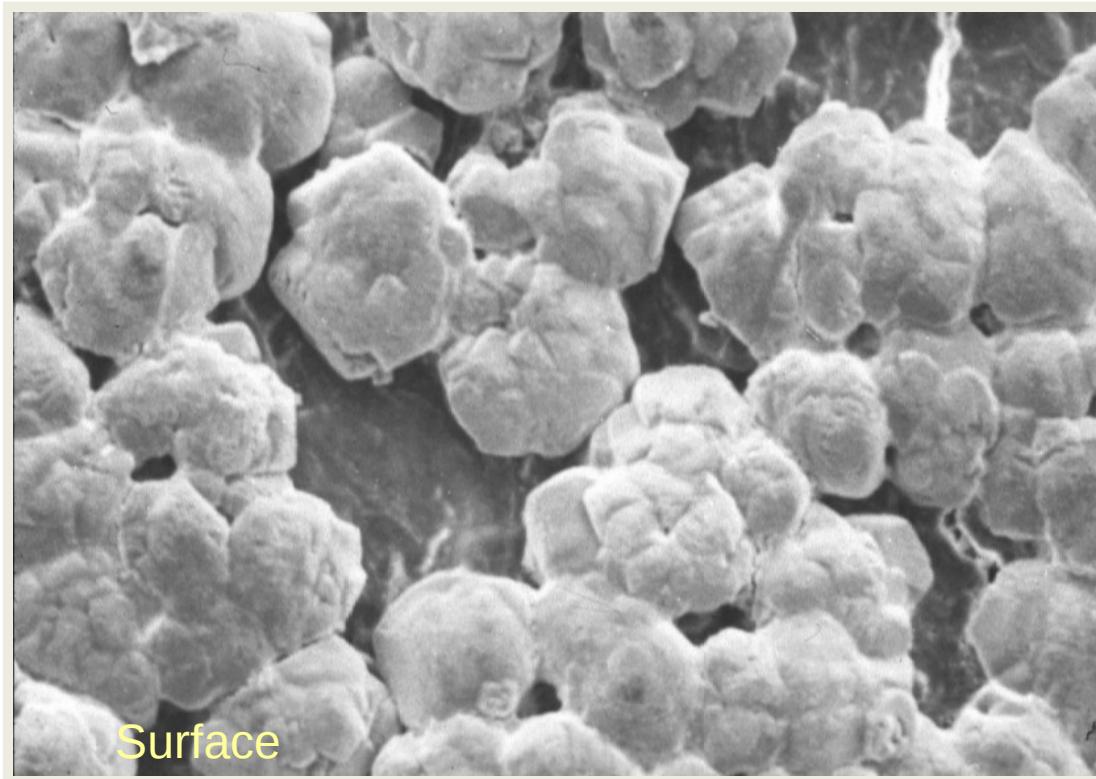
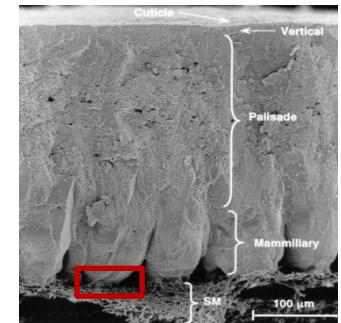
La phase initiale



La couche calcifiée est étroitement liée aux fibres de la membrane de la coquille

La formation de la coquille

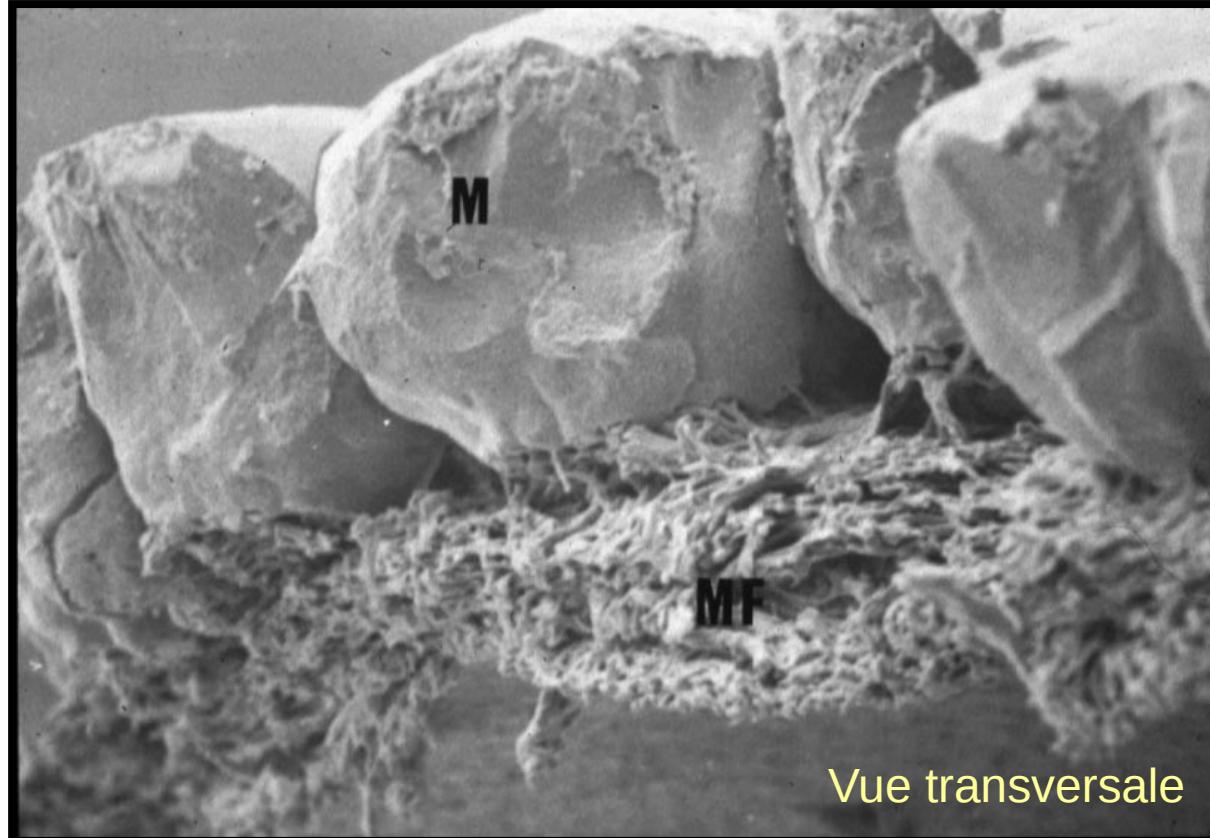
La phase initiale



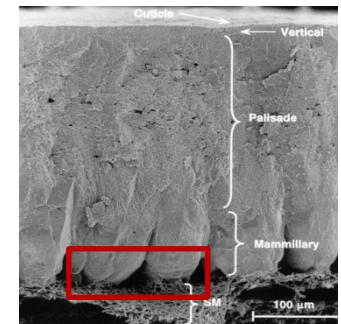
Les noyaux mamillaires recouverts de carbonate de calcium (calcite) forment des cônes qui fusionnent au fur et à mesure que la coquille grossit.

La formation de la coquille

La phase de croissance

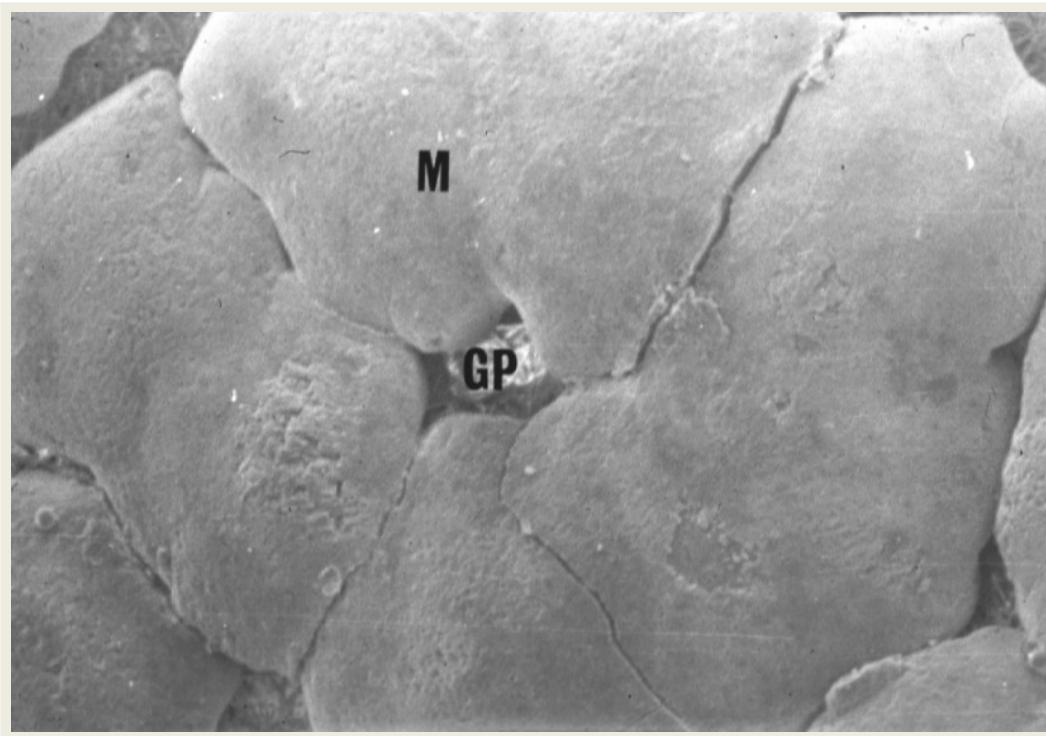
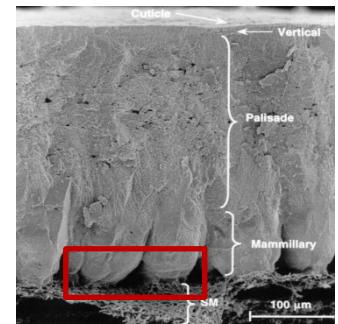


Les noyaux mamillaires recouverts de carbonate de calcium (calcite) forment des cônes qui fusionnent au fur et à mesure que la calcification se poursuit



La formation de la coquille

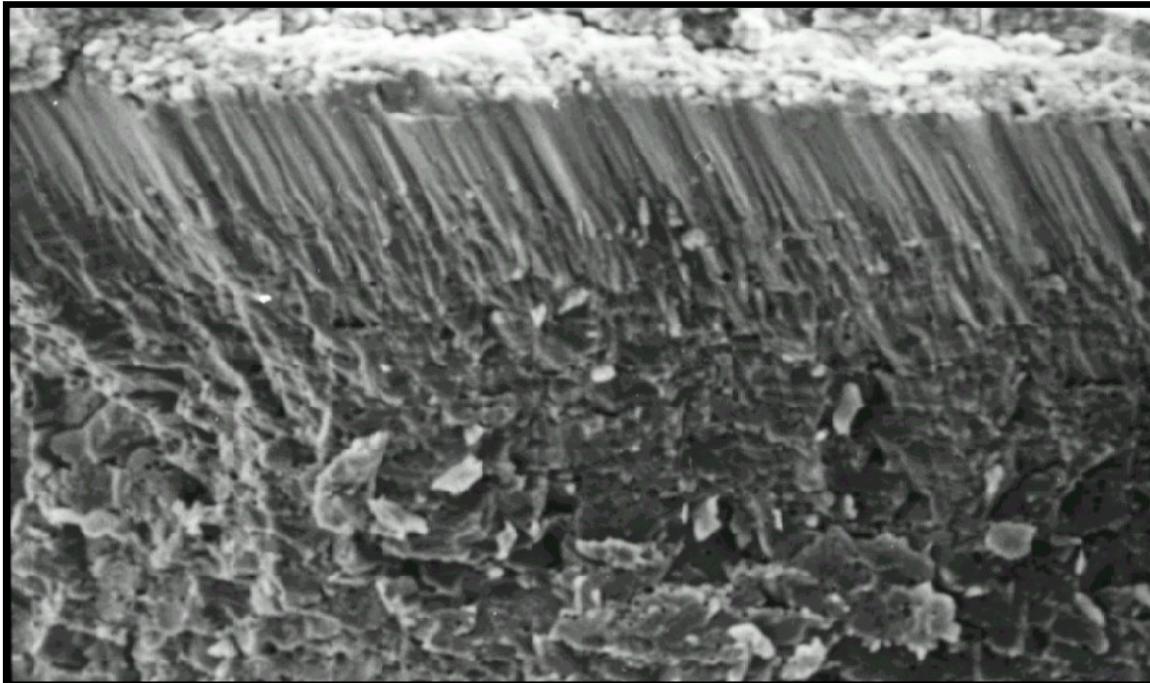
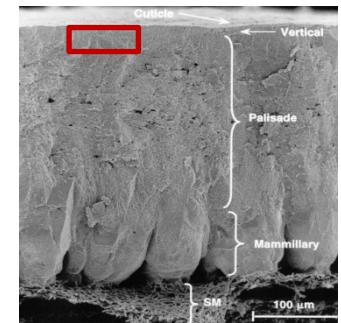
La phase de croissance



Surface de la couche calcifiée avec
apparition d'un pore obtenu en absence de
fusion des pores

La formation de la coquille

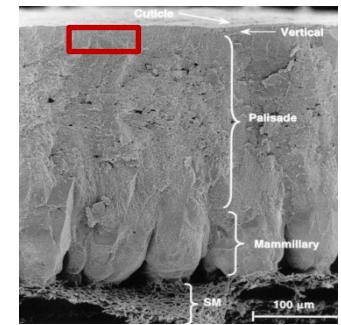
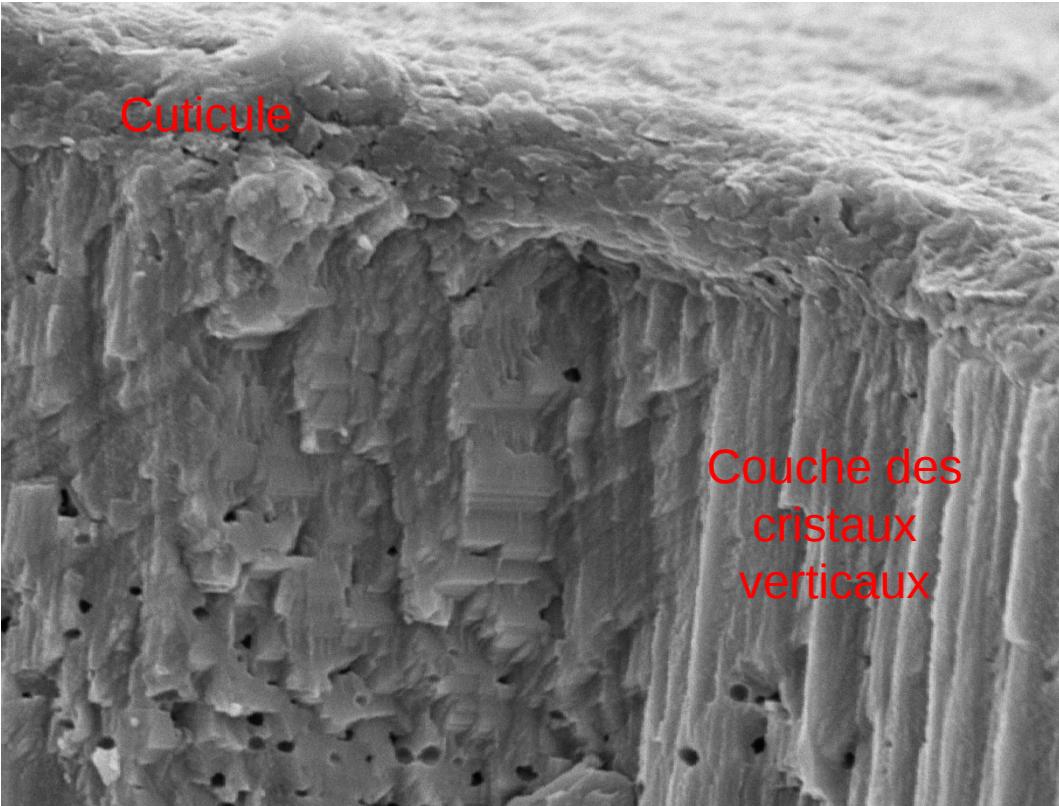
La phase terminale



En surface de la couche calcifiée apparaît une couche monocristalline de calcite
(Couche des cristaux verticaux)

La formation de la coquille

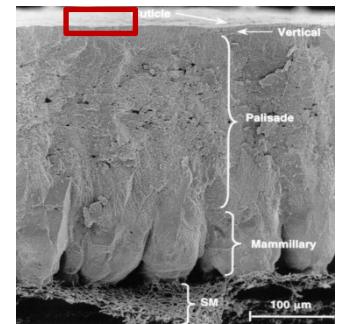
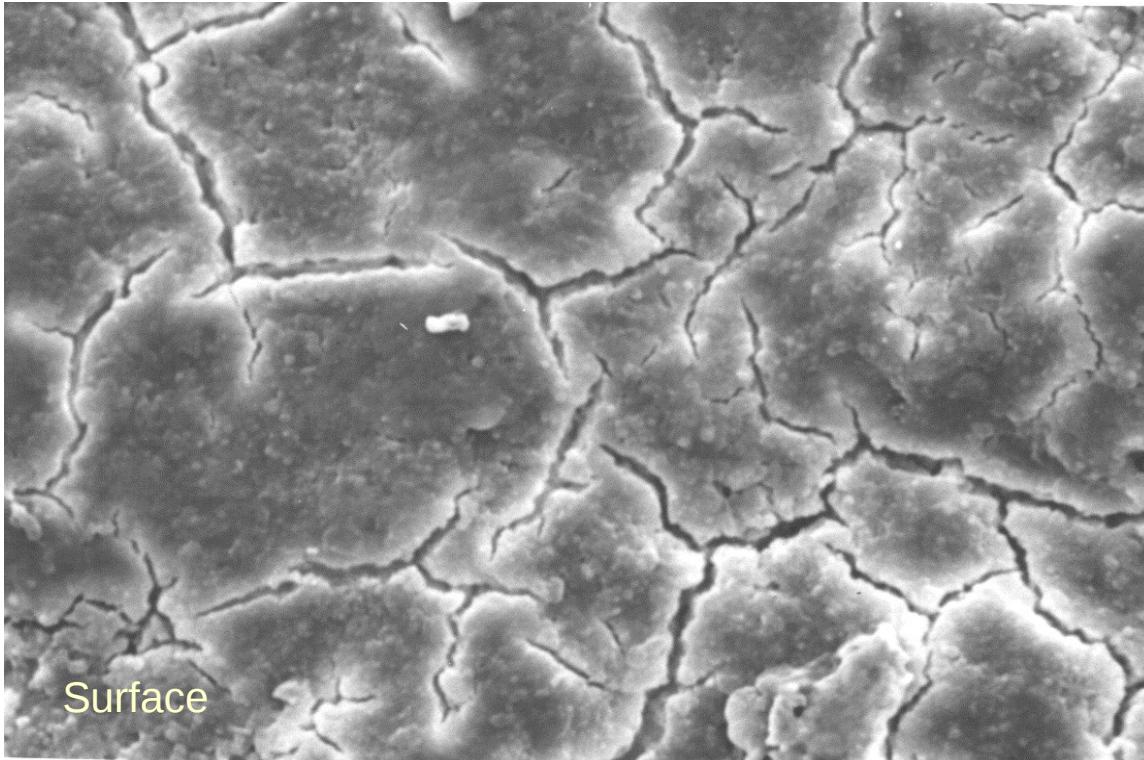
La phase terminale



La minéralisation s'arrête. Une fine couche de matière organique vient se déposer en surface (cuticule)

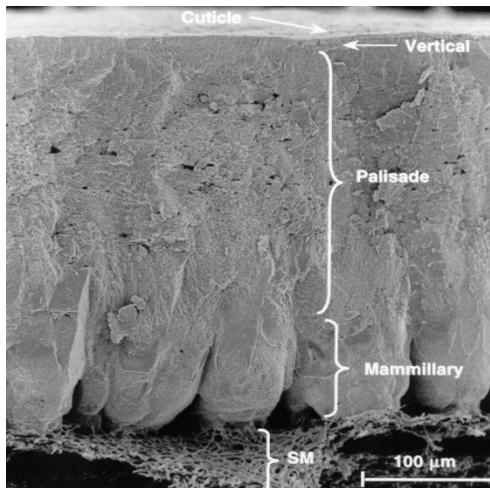
La formation de la coquille

La phase terminale



La cuticule recouvre la totalité de l'œuf. En séchant, elle se fissure pour permettre les échanges gazeux via les pores

Similitude des coquilles d'œufs



Gallus gallus



coturnix japonica



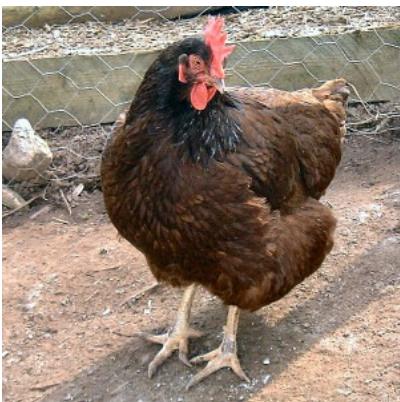
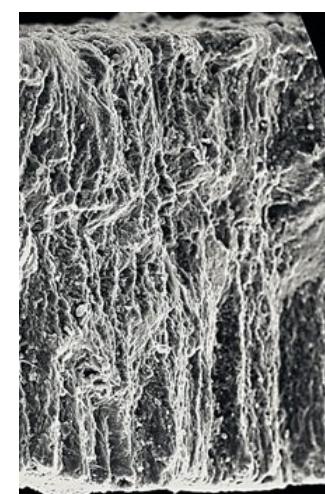
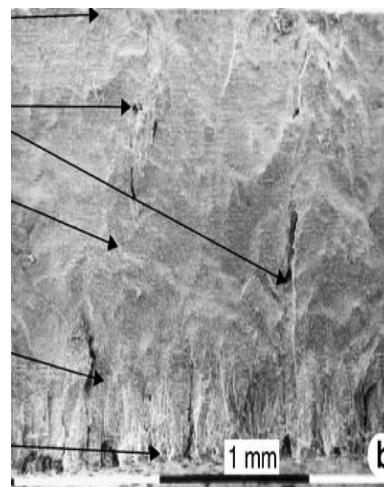
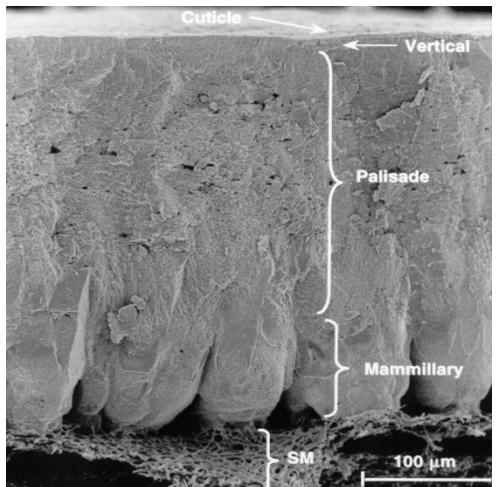
Meleagris gallopavo



Anas platyrhynchos

Similitude des coquilles d'œufs

□ PROCESSUS DE BIOMINERALISATION UNIVERSEL



Gallus gallus



Numida meleagris

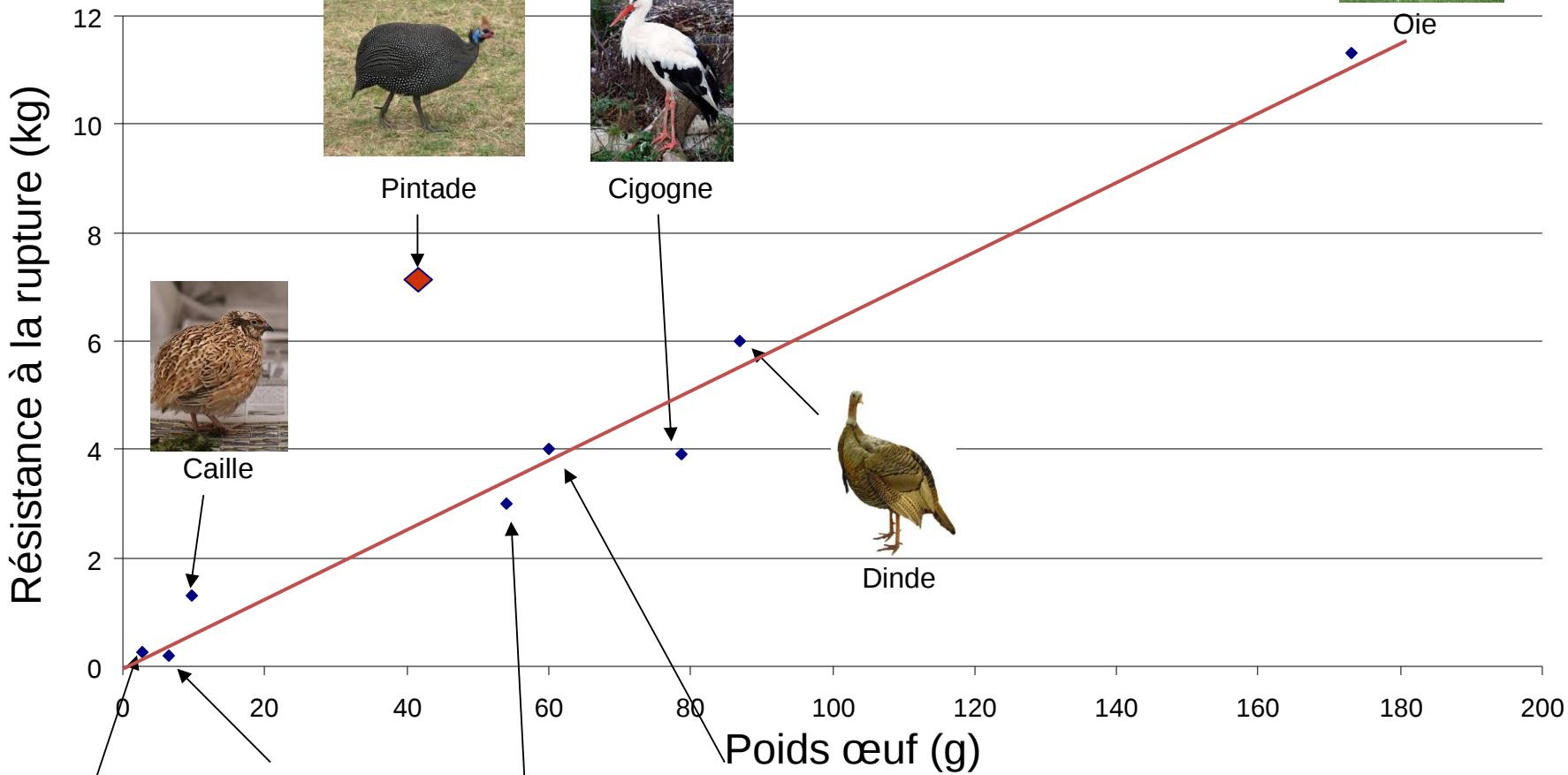


Struthio



Sankofa pyrenaica

Propriétés biomécaniques des coquilles d'œufs



Moineau



Merle noir



Canard

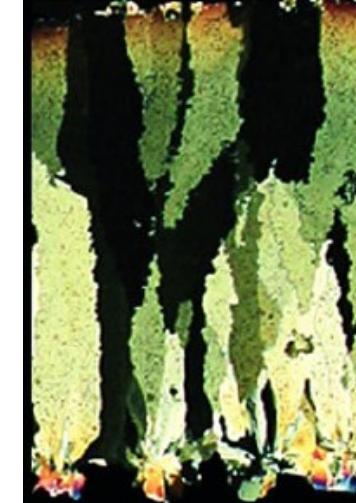


Poule



La formation de la coquille, un processus de biominéralisation

Illustration d'une orientation privilégiée des cristaux et de la microstructure



Gallus gallus



Meleagris gallopavo



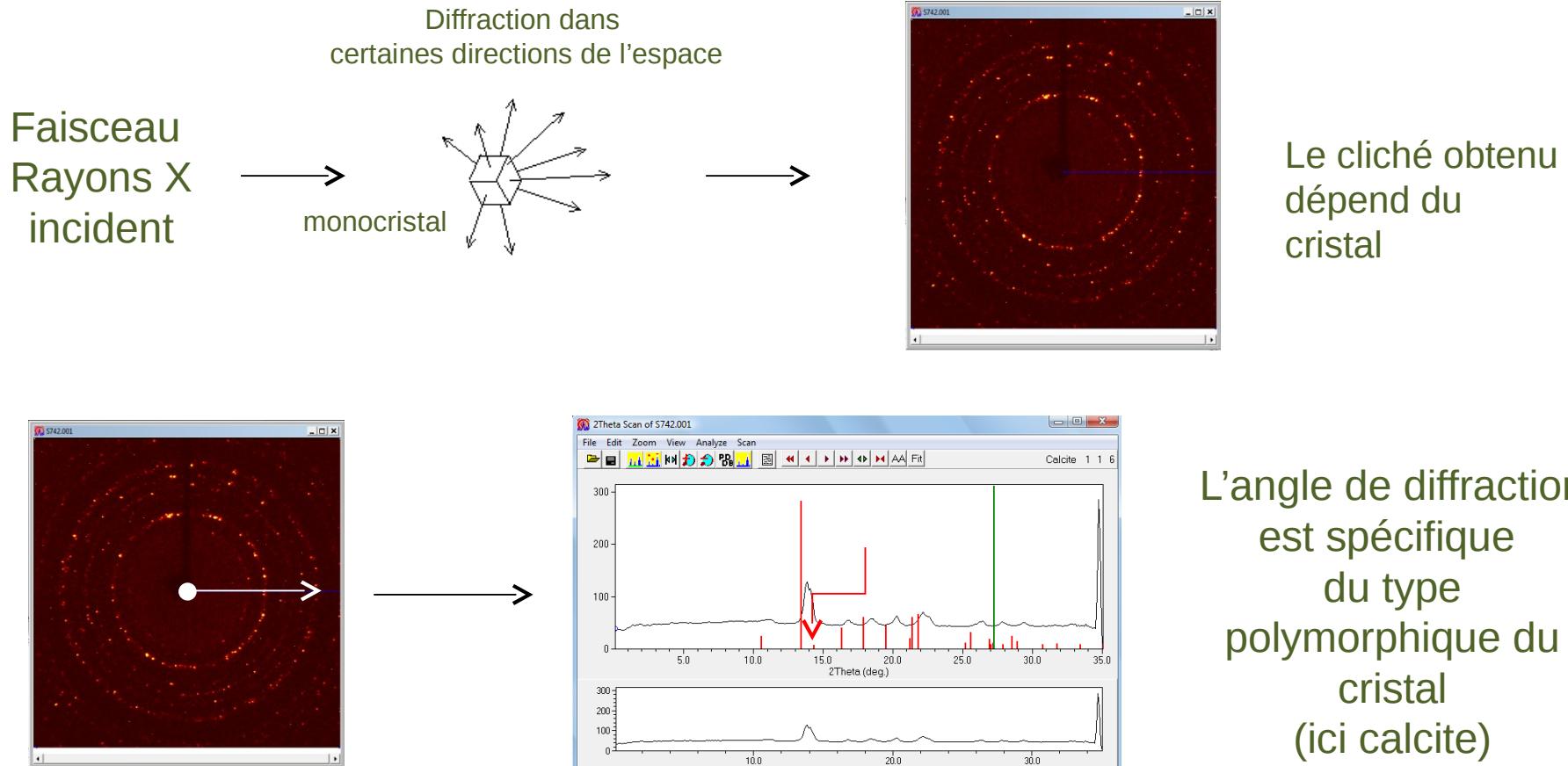
Numida meleagris



Sankofa pyrenaica

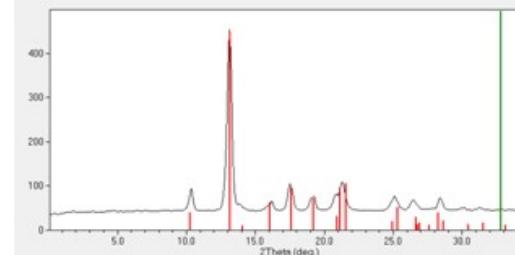
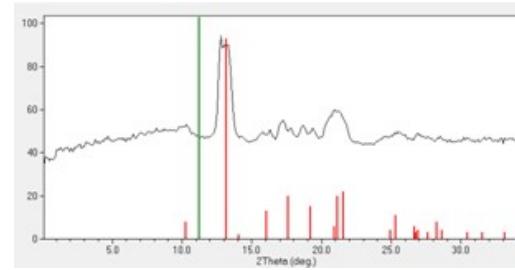
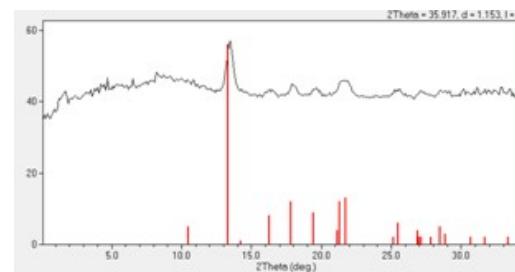
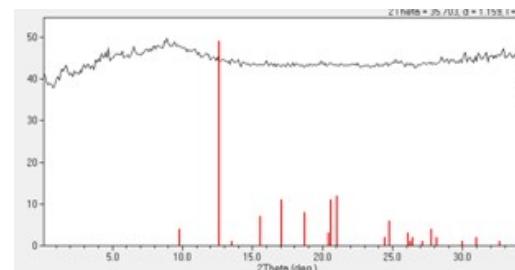
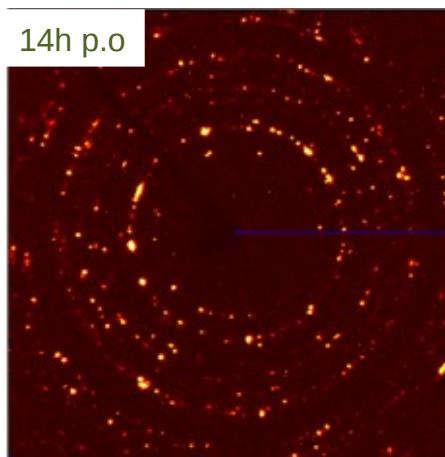
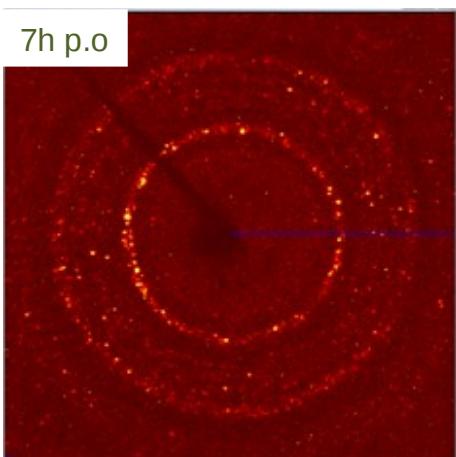
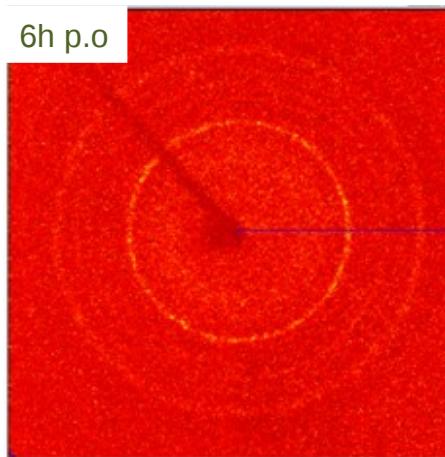
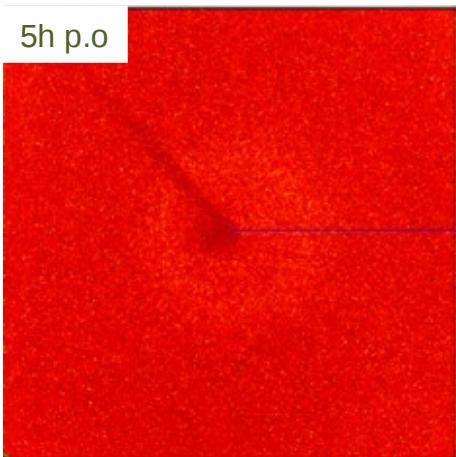
La formation de la coquille

- **XRD 2D (X-Ray Diffraction) (détermination quantitative du polymorphe cristallin présent)**



La formation de la coquille

- XRD 2D (X-Ray Diffraction) (détermination quantitative du polymorphe cristallin présent)



5h p.o :
pas de
cristal

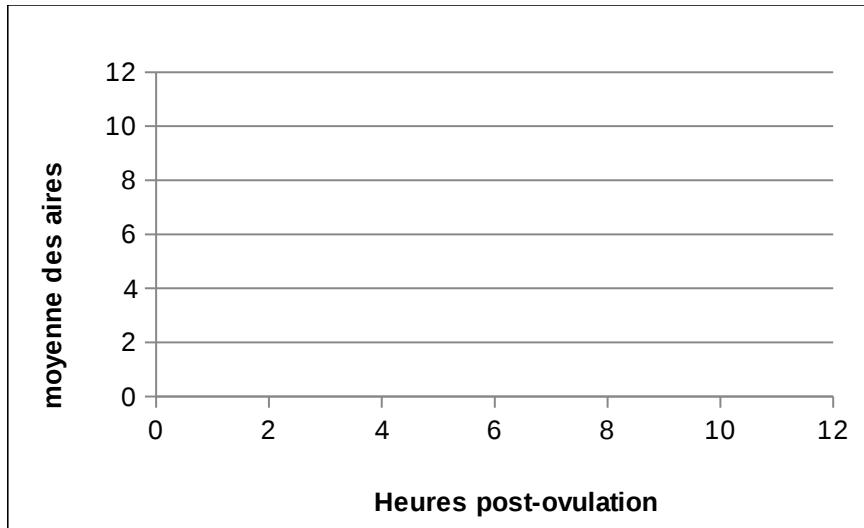
6h p.o :
cristallisatio
n
très faible

7h p.o :
cristal plus
organisé

14h p.o :
cristal
totalement
organisé

La formation de la coquille

- **XRD 2D (X-Ray Diffraction)** (détermination quantitative du polymorphe cristallin présent)



- ✓ Nanocristaux formés aux stades précoce (5-6 heures)
- ✓ Accroissement de la taille des cristaux à partir des nanocristaux
- ✓ Les plus gros cristaux forment un petit nombre d'unités cristallines orientées microstructure en colonne

La formation de la coquille

- **Contexte**

- 2 hypothèses possibles pour la formation de la calcite sous influence de la matrice organique

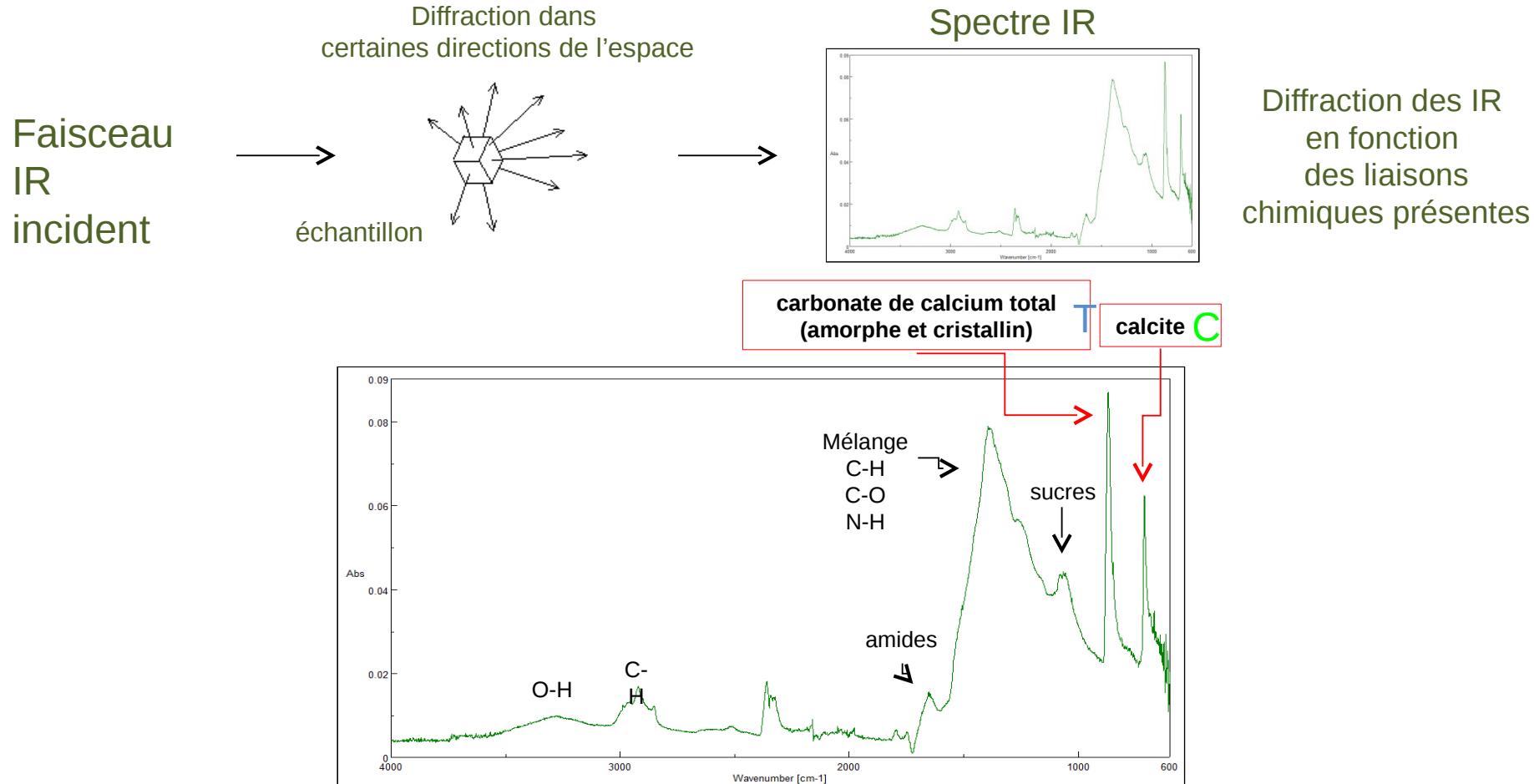
Hypothèse n°1 : calcite formée directement $\text{Ca} + \text{CO}_3 \rightarrow \text{calcite}$

Hypothèse n°2 : passage par du carbonate de calcium amorphe (ACC) dans une phase transitoire avant d'obtenir la calcite $\text{Ca} + \text{CO}_3 \rightarrow \text{ACC} \rightarrow \text{calcite}$

- Plus soluble, plus réactif, source temporaire de calcium

La formation de la coquille

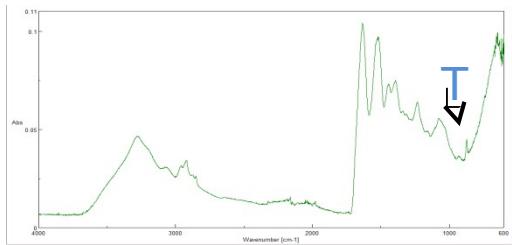
quantification du ratio CaCO₃ cristallin/CaCO₃ total (FTIR)



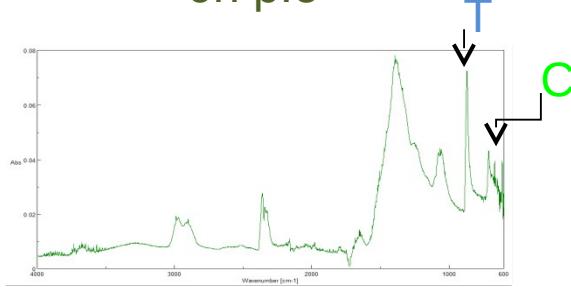
La formation de la coquille

quantification du ratio CaCO₃ cristallin/CaCO₃ total (FTIR)

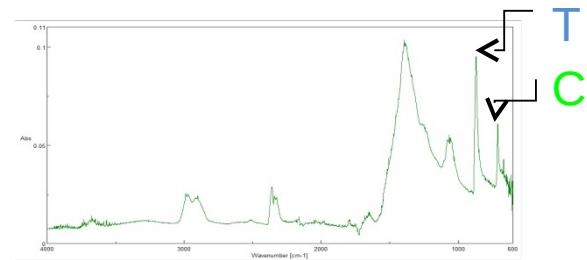
5h p.o



6h p.o

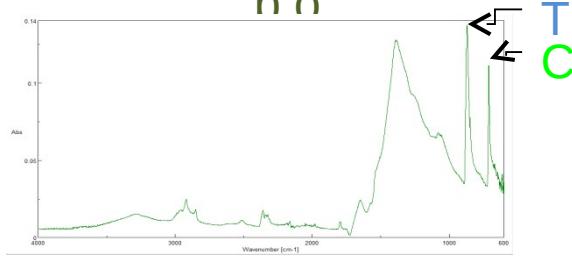


7h p.o



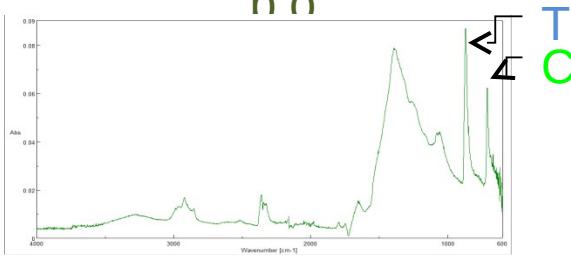
14h

n o

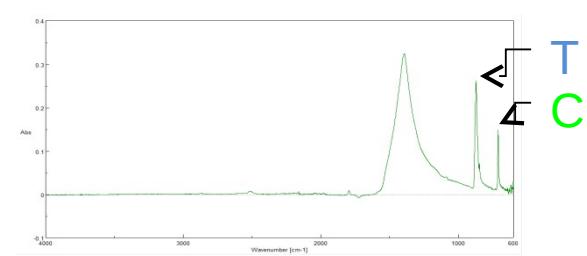


16h

n o

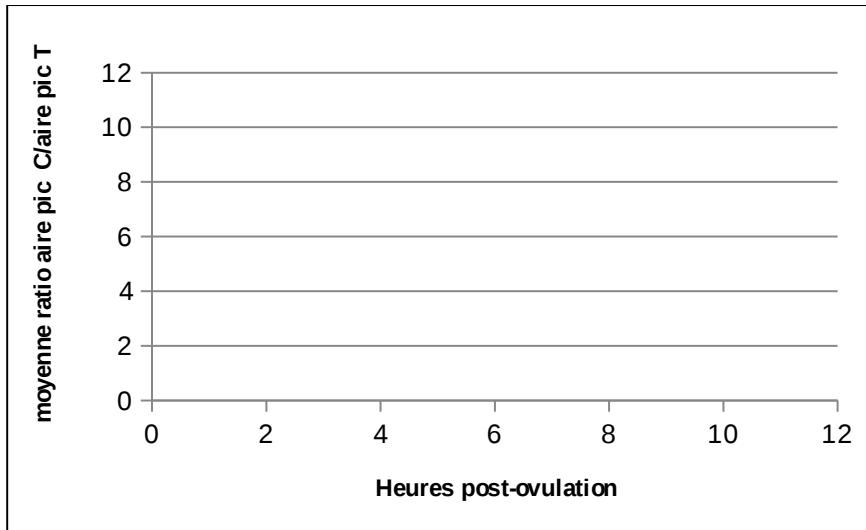


calcite pure



La formation de la coquille

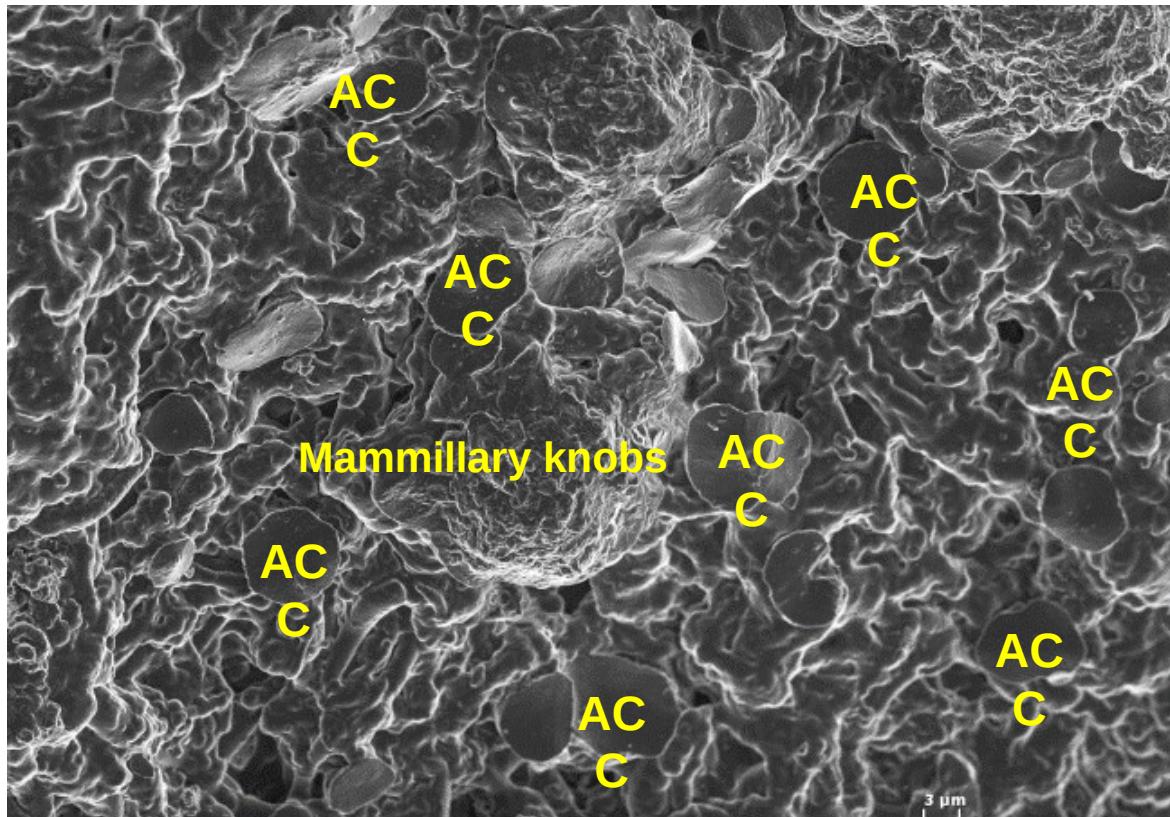
quantification du ratio CaCO₃ cristallin/CaCO₃ total (FTIR)



- ✓ CaCO₃ amorphe (ACC) aux stades précoce s, mais une certaine orientation (proto-calcite)
- ✓ Augmentation du ratio aire pic Claire pic T , qui traduit une transformation graduelle de l'ACC en calcite à tous les stades

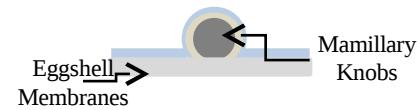
La formation de la coquille

Role of amorphous calcium carbonate (ACC)



ACC
 Calcite

First nucleation events



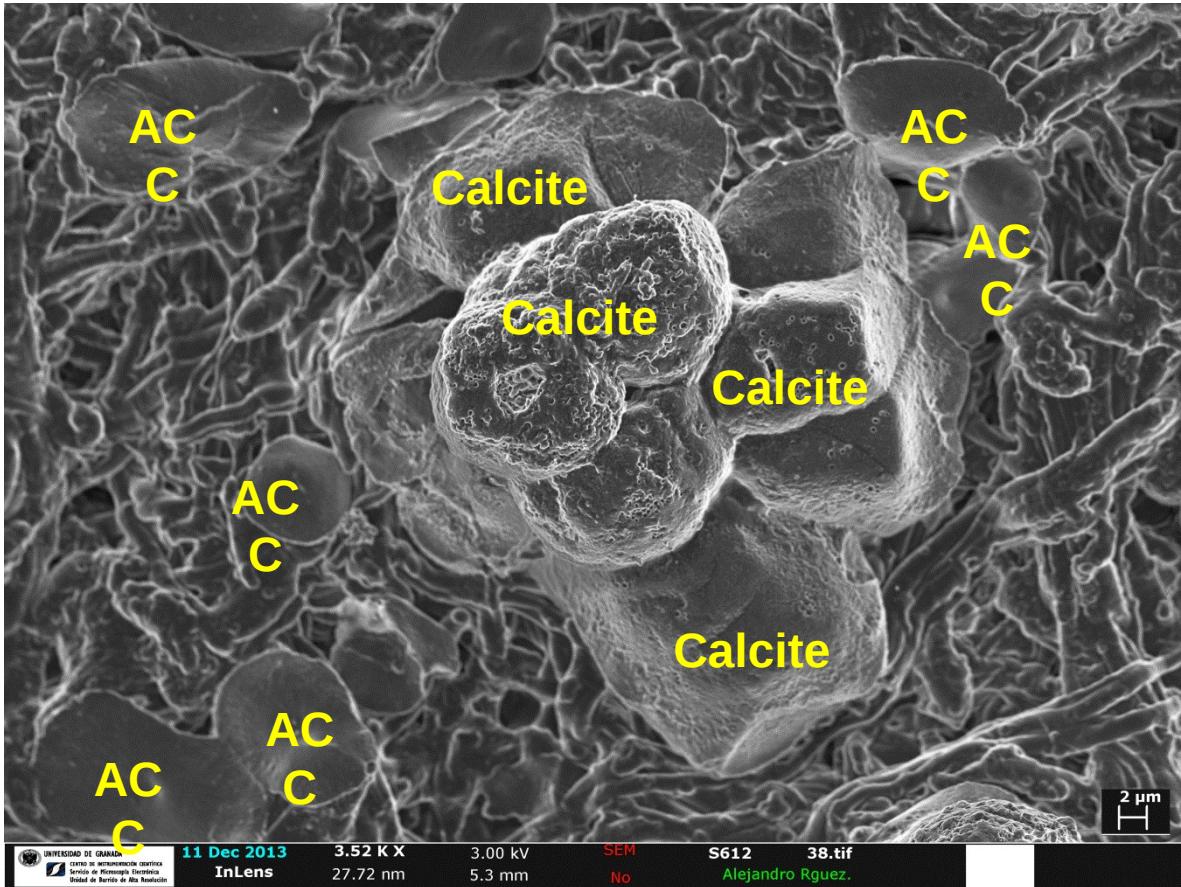
Time 1 (5-6 h Post ovulation):
 ACC particles nucleate on the whole eggshell membranes.
 Form massive deposits

Images: A. Rodriguez-Navarro, University of Granada

Rodriguez-Navarro et al., Journal of structural Biology, 2015

La formation de la coquille

Role of amorphous calcium carbonate (ACC)



■ ACC
 ■ Calcite

Calcite formation



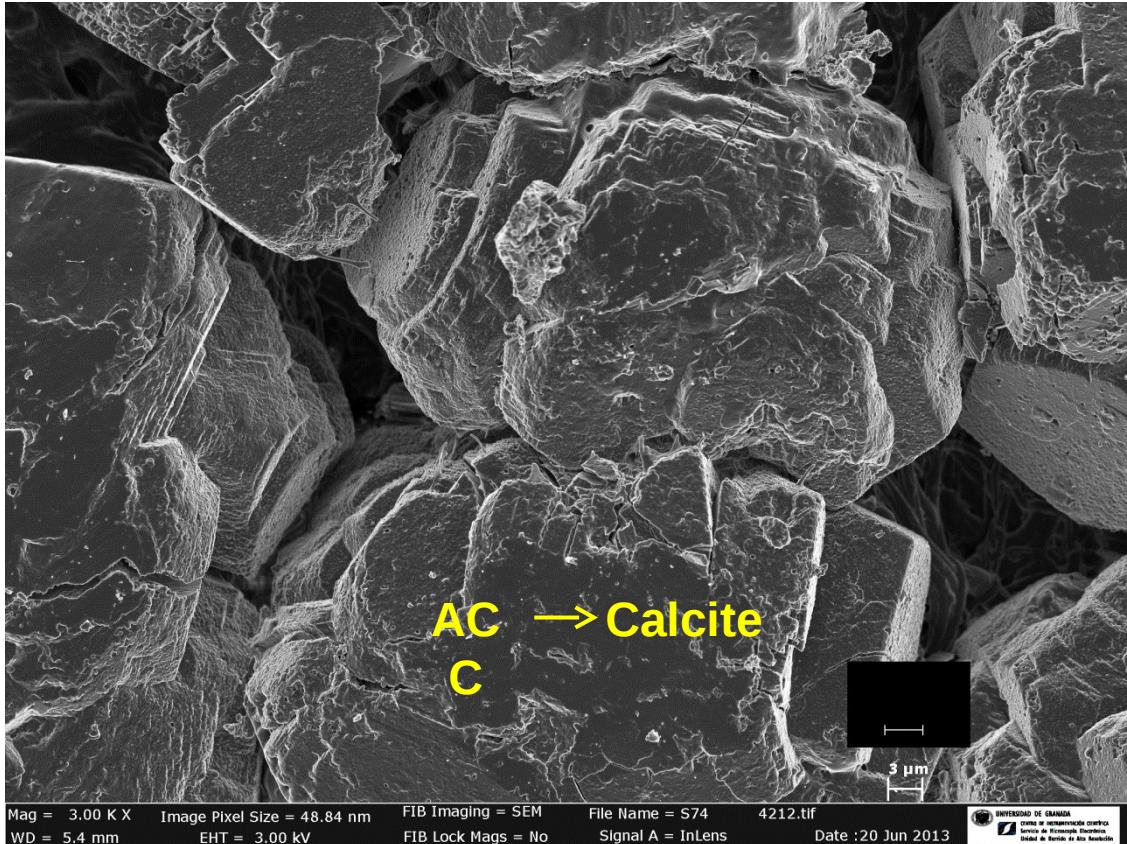
Time 2 (6-7 h post ovulation): Interface-coupled dissolution precipitation process
 Direct transformation of ACC into calcite aggregates on mammillary knobs

Images: A. Rodriguez-Navarro, University of Granada

Rodriguez-Navarro et al., Journal of structural Biology, 2015

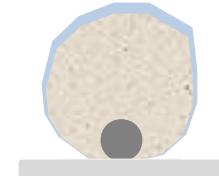
La formation de la coquille

Role of amorphous calcium carbonate (ACC)



ACC
 Calcite

Large calcite crystal units deposition

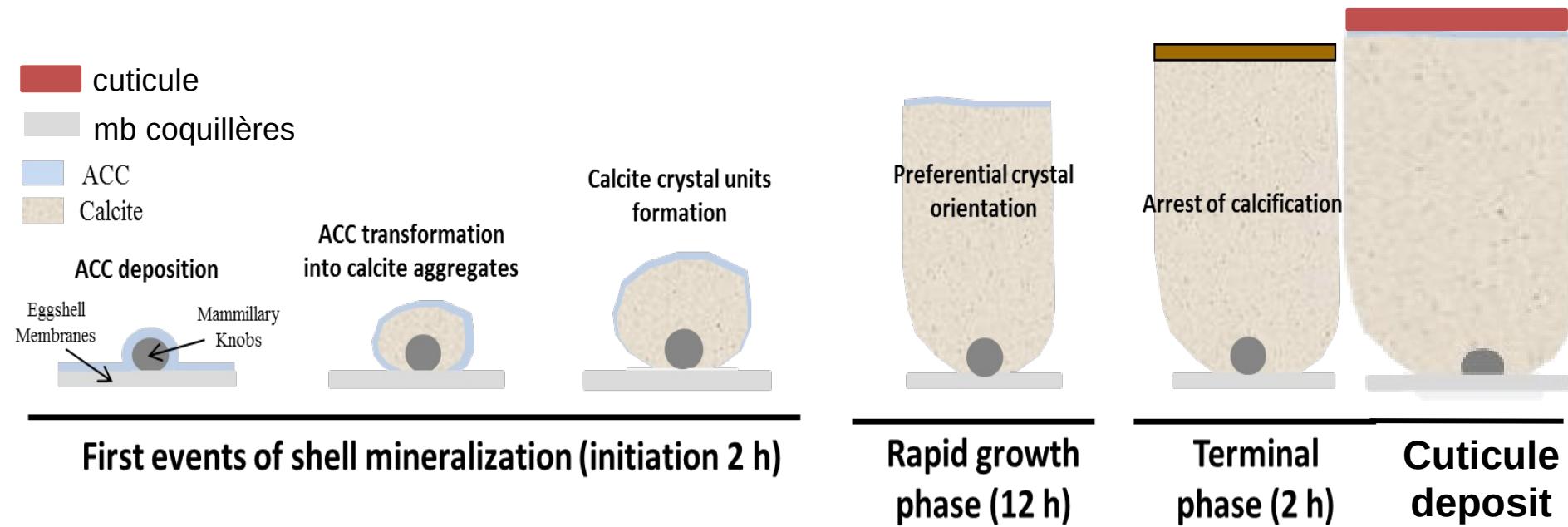


Time 3 (>7h post ovulation):
 Additional crystallisation events
 on calcite template

Images: A. Rodriguez-Navarro, University of Granada

Rodriguez-Navarro et al., Journal of structural Biology, 2015

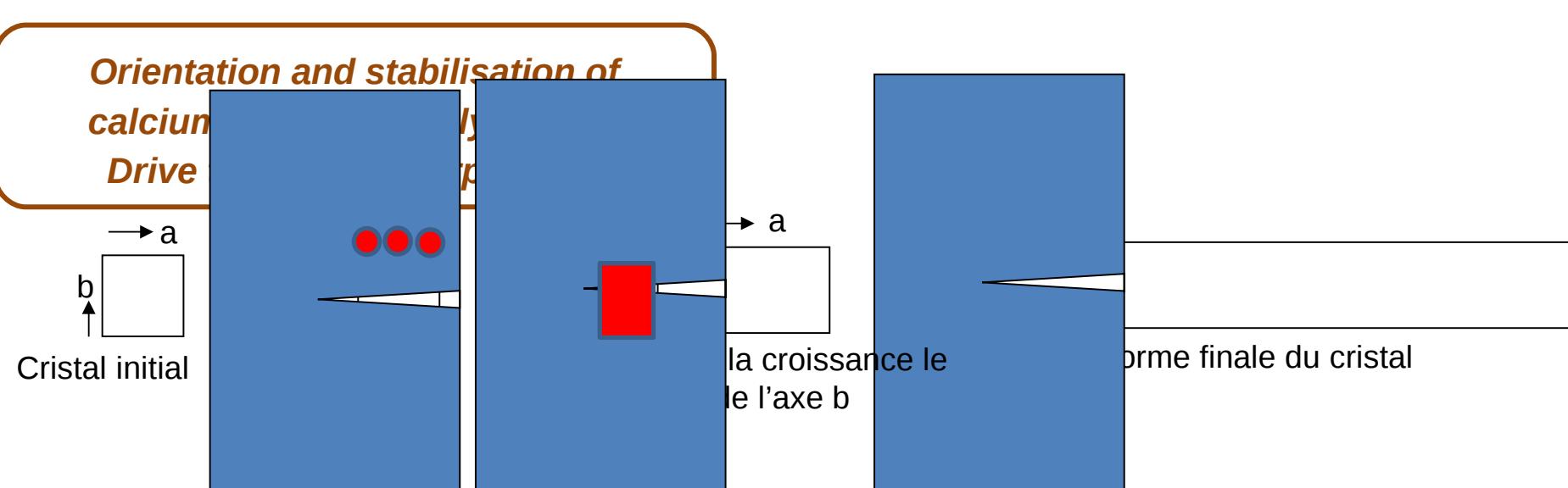
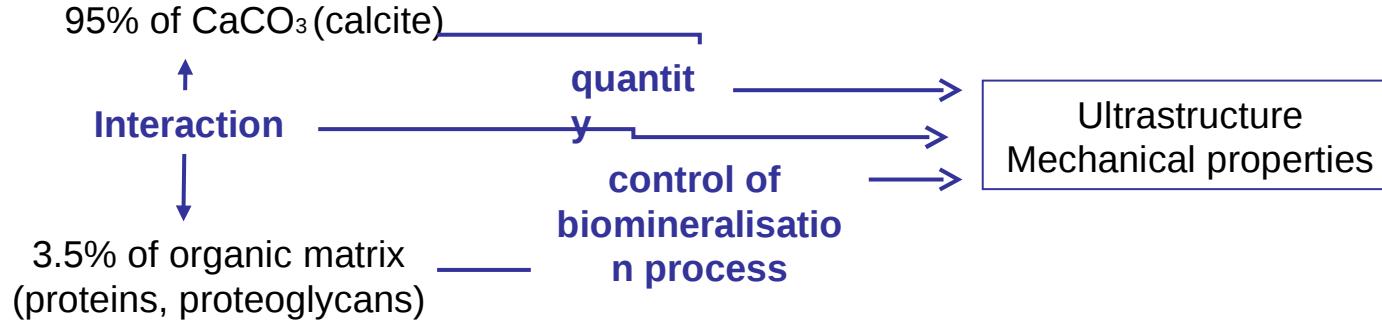
La formation de la coquille



La matrice organique

- ✓ Organic matrix plays a key role

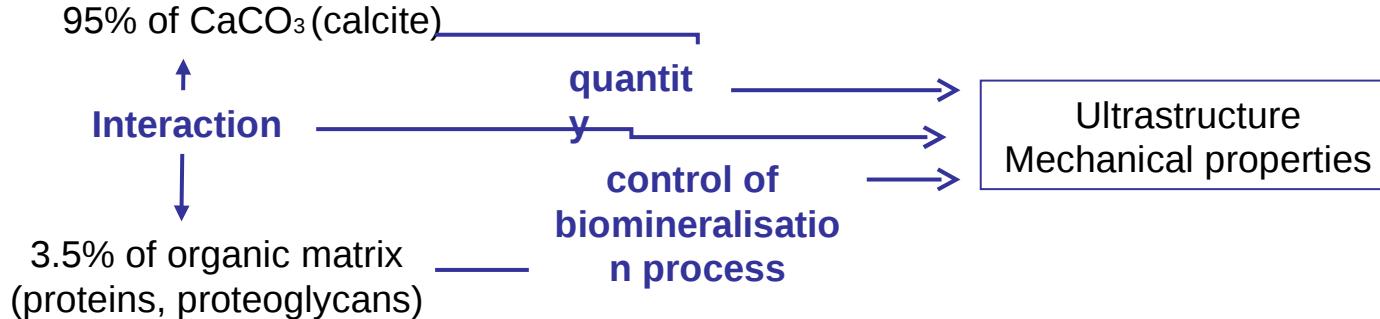
determine the texture of the shell and its resulting mechanical properties



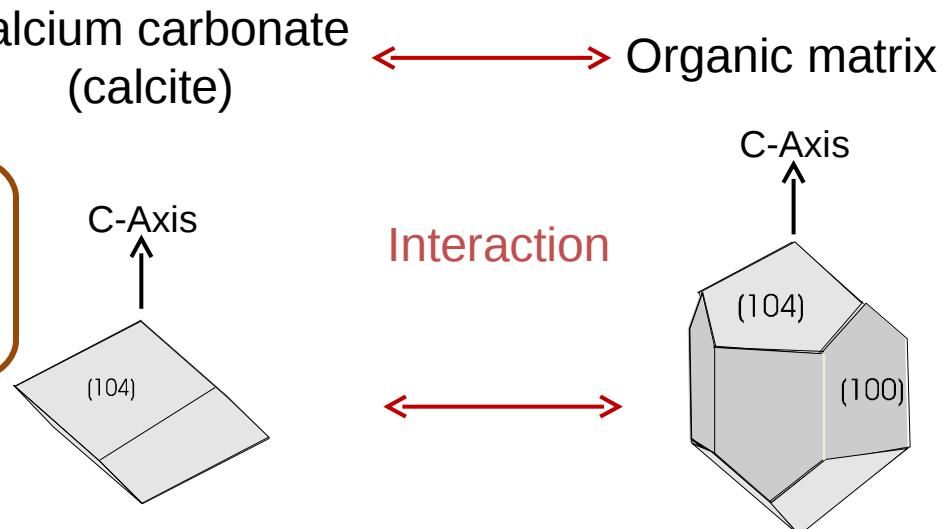
La matrice organique

- ✓ Organic matrix plays a key role

determine the texture of the shell and its resulting mechanical properties



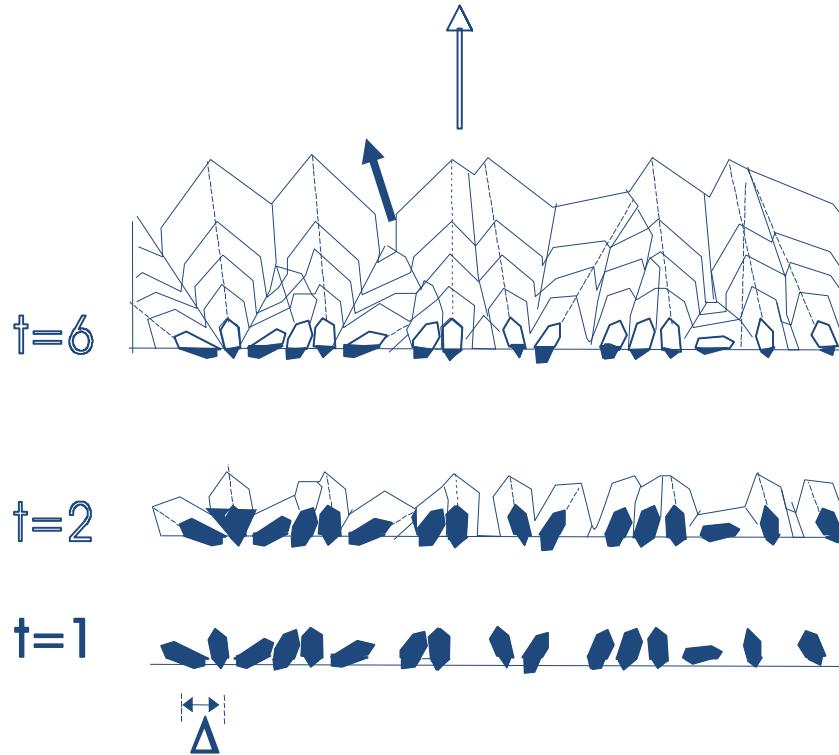
Orientation and stabilisation of calcium carbonate polymorphs Drive the calcite morphology



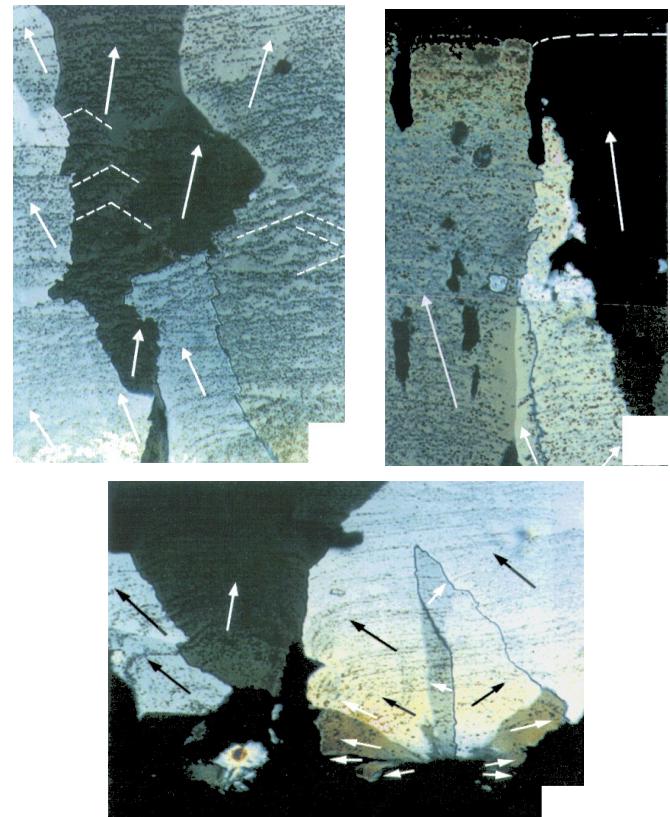
La matrice organique

Détermine la microstructure du biomatériaux

- ✓ The avian eggshell is a complex and highly structured calcitic bioceramic
- ✓ Competitive crystal growth
- ✓ Mineral-binding proteins guide crystal growth (organic matrix control)

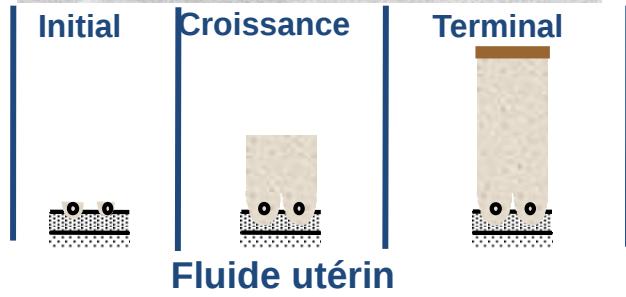
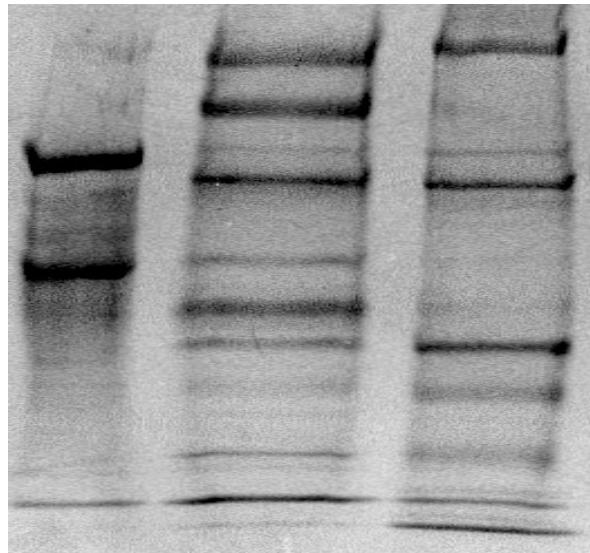


Rodríguez-Navarro et al., 2000; Nys et al., (2004)



Images: J.M. García-Ruiz, Granada

Protéines de la matrice et minéralisation de la coquille



Composition variable du fluide utérin au cours du processus de calcification



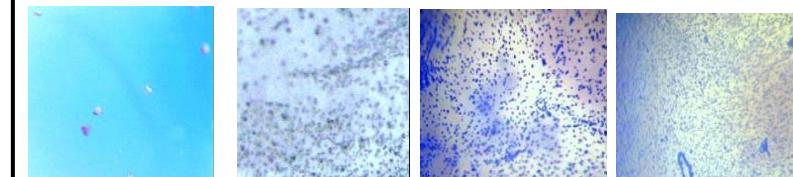
Adaptation du contenu organique selon le stade de minéralisation

Protéines de la matrice et minéralisation de la coquille

Augmente la cinétique de nucléation des cristaux
Temps nécessaire pour observer les premiers cristaux

Témoin	900 minutes
Fluide utérin	< 10 secondes

Augmente le nombre de cristaux



Témoin
40 cristaux

Initiale Croissance Terminale
Fluide utérin >10 000 cristaux

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

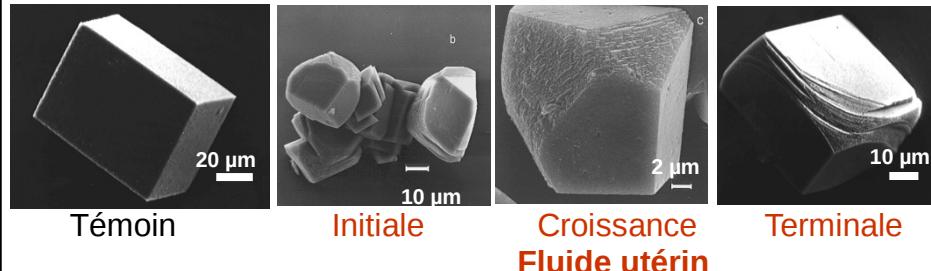
(*Poultry Sci.*, 2000, 79, 901-907 ; *J. Crystal Growth*, 2008, 310, 1754-1759 ; *Cryst. Growth. Des.*, 2008, 8, 4330-4339)

Favorise la calcite comme type polymorphique



Témoin (%)	55
Fluide utérin (%)	100

Modifie la morphologie des cristaux de calcite



Identification des protéines de l'œuf

Les techniques classiques

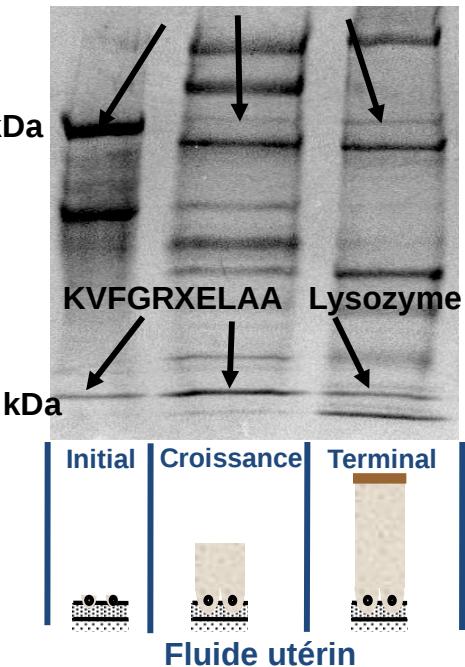
› Biochimie (Fractionnement des composés de l'œuf par chromatographie, électrophorèses...) et biologie moléculaire

□ 2006, environ 50 protéines de l'œuf (10 dans la coquille)

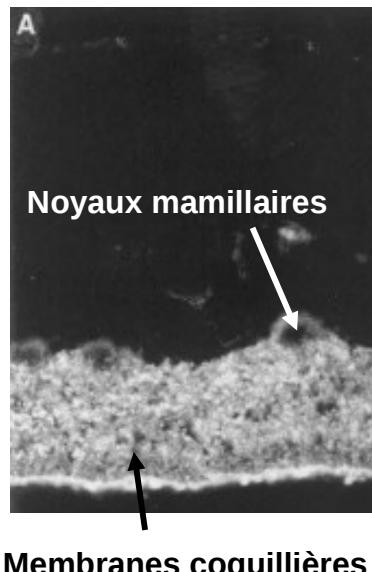
Les protéines préalablement identifiées par des techniques « classiques »

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

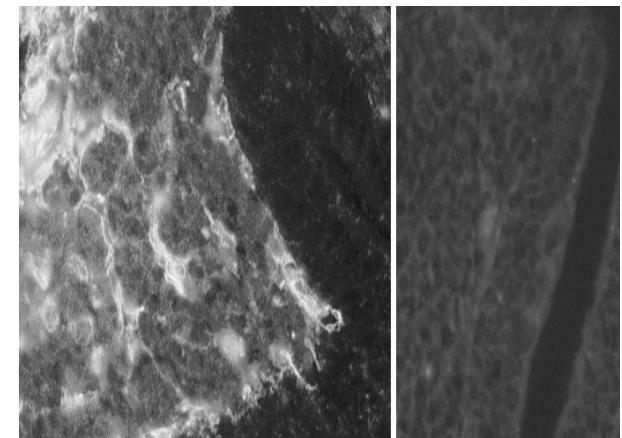
APPKS VIRXXTISS Ovotransferrine



Localisation du lysozyme dans la coquille



Origine utérine de l'ovotransferrine



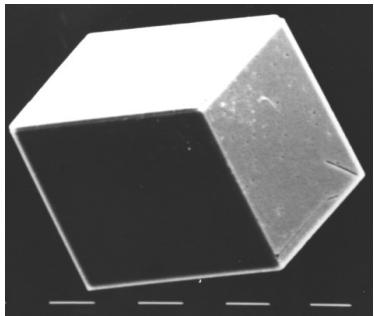
- Présentes dans la coquille
- sécrétées par les tissus où se forme la coquille

Les protéines préalablement identifiées par des techniques « classiques »

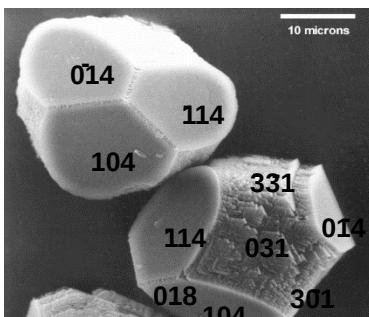
□ **lysozyme** (*Matrix Biol.*, 2000, 19, 443-453) et **ovotransferrine** (*Connect. Tissue. Res.*, 2001, 42, 225-267)

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

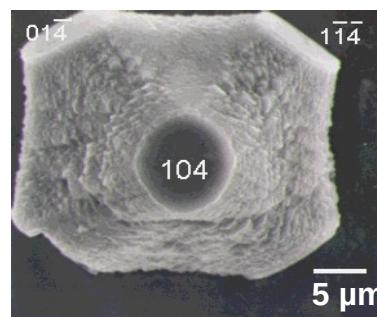
Interaction avec le carbonate de calcium



Témoi



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

Identification des protéines de l'œuf

Les techniques classiques

- › Biochimie (Fractionnement des composés de l'œuf par chromatographie, électrophorèses...) et biologie moléculaire
 - 2006, environ 50 protéines de l'œuf (10 dans la coquille)

Les développements récents

- ✓ 2004, Publication de la séquence génomique de la poule



- ✓ Genome-wide non redundant catalog of 33 838 different genes

NCBI > UniGene > *Gallus gallus*

PubMed Protein Genome Structure PopSet Taxonomy OMIM

Search UniGene ▾ *Gallus gallus[organism]* Go Clear

Gallus gallus: UniGene Build #46

Lineage: cellular organisms; Eukaryota; Fungi/Metazoa group; Metazoa; Eumetazoa; Bilateria; Coelomata; Deuterostomia; Chordata; Craniata; Vertebrata; Gnathostomata; Teleostomi; Euteleostomi; Sarcopterygii; Tetrapoda; Amniota; Sauropsida; Sauria; Archosauria; Aves; Neognathae; Galliformes; Phasianidae; Phasianinae; Gallus; *Gallus gallus*

Sequences Included in UniGene
Known genes are from GenBank 18 Aug 2012
ESTs are from dbEST through 18 Aug 2012

33,838	mRNAs
683	Models
0	HTC
11,088	EST_3reads
418,700	EST_5reads
79,390	EST_other/unknown
543,699	total sequences in clusters

UniGene Links
Clusters Library Browser DDD Query Tips FAQ Finding cDNAs

- ✓ cDNA and ESTs libraries
(Identification of 600 434 functional genes in chickens)



Banques cDNA et EST

Le but

- * Identifier les gènes fonctionnels

Méthode

- * Un catalogue compréhensible de l'ensemble des séquences d'un organisme ou d'un tissu spécifique ou d'une fonction biologique

Recueil des tissus:

NOMBREUSES fonctions biologiques :
(Tissus reproducteurs, système digestif,
Système nerveux central, foie, intestin, rate,
...)

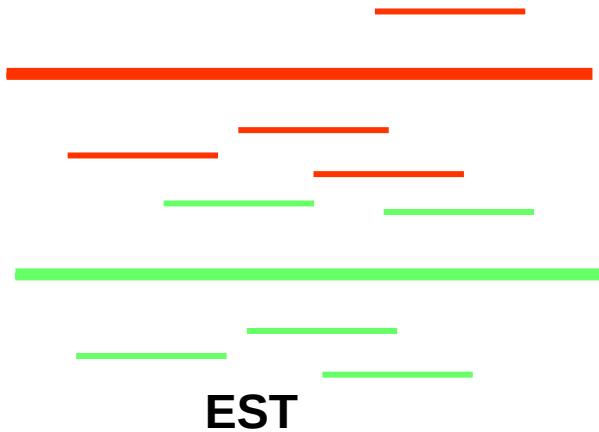
DIFFÉRENTES conditions :
(embryons, jeunes, adultes, males, femelles,
facteurs nutritionnels...)

Séquence partielle
du cDNA cloné
(EST)

ARNm → cDNAs

Clonage
dans des
bactéries

Banques cDNA et EST



Assembled into a genome-wide non-redundant catalog of expressed genes
(Unigenes)

Main projects for poultry:

University Delaware (<http://www.chickest.udel.edu/>)

University of Manchester (<http://www.chick.umist.ac.uk/index.html>)

Inra (<http://www.sigenae.org>)



dbEST: database of "Expressed Sequence Tags"

dbEST release 130101

600 434 séquences (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html) **pour 260 460 contigs et**
129 842 singlets (http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Gallus_gallus/index.html)

Banques cDNA et EST

➤ Nouvelles séquences protéiques non identifiées au préalable (protéines spécifiques de la coquille)

□ Ovocalyxin -32 (*J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 39243-39252)

Séquençage des Protéines et traduction en nucléotides

Protein sequencing of OCX-32

N terminal sequence

ERLPWPQVPGVVMHPLNPKHREAV

Internal peptide sequences

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	KOIQEED HR FYE(YLQ)
K7a	KQSTEHTGYLLAQVSS(V)K
K7b	QSTEHTGYLLAQVSS(V)K
K8	YLWVTLGHPIRVK
K9	FIVLLHEIPTQQQLNVX(H)
K10	KPITANYIPDS(N)GNIA(HDH)

Traduction en séquences
nucléotidiques
(code dégénéré)

Leucine : 6 codons

(UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG)

Acide aspartique : 2 codons (GAU, GAC)

Méthionine : codon unique (AUG)

Milliers de combinaisons possibles
Utilisation d'outils bioinformatiques

Banques cDNA et EST

› Nouvelles séquences protéiques non identifiées au préalable (protéines spécifiques de la coquille)

□ Ovocalyxin -32 (*J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 39243-39252)

Séquençage des Protéines et traduction en nucléotides

N terminal sequence	
ERLPWPQVPGVVMHPLNPKHREAV	
Internal peptide sequences	
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	KOIQEED HR FYE(YLQ)
K7a	KQSTEHTGYLLAQVSS(V)K
K7b	QSTEHTGYLLAQVSS(V)K
K8	YLWVTLGHPIRVK
K9	FIVLLHEIPTQQLNVX(H)
K10	KPITANYIPDS(N)GNIA(HDH)

Traduction en séquences
nucléotidiques
(code dégénéré)

Recherche dans les bases de données
Banques d'EST (tblastN)

Identification des séquences EST
correspondantes

Banques cDNA et EST

- Nouvelles séquences protéiques non identifiées au préalable (protéines spécifiques de la coquille)
■ Ovocalyxin -32 (*J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 39243-39252)

* Full length cDNA sequence



Amino acid translation

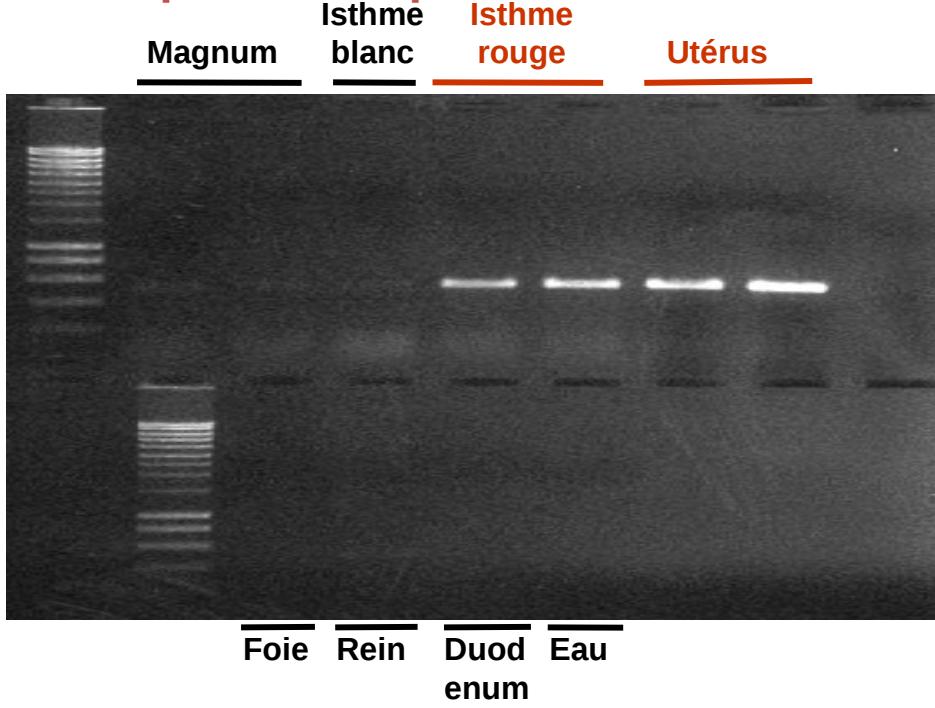
**EFGTSAEERLPWPQPGVMRPLNPSHREAVWAAWTALHYINSHEASPSRP
LALHKVVKAASKMIPRLGWKYYVHCTTEGYIHGENAGSCFATVLYLKKSP
PVVHGKCVHAQNKKQIQEEDHRFYEYLQHQKKPITANYIPDSNGNIAHDH
LQLWGLAIVGSSYIMWKQSTEHTGYLLAQVSSVKQQIRKDNAVAFKFIVL
LHEIPTQQLNVCHMYLVWTLGHPIRVKYSCAPDNHGLEDGSGQDSGSAAG
TSHETKGNF**

Banques cDNA et EST

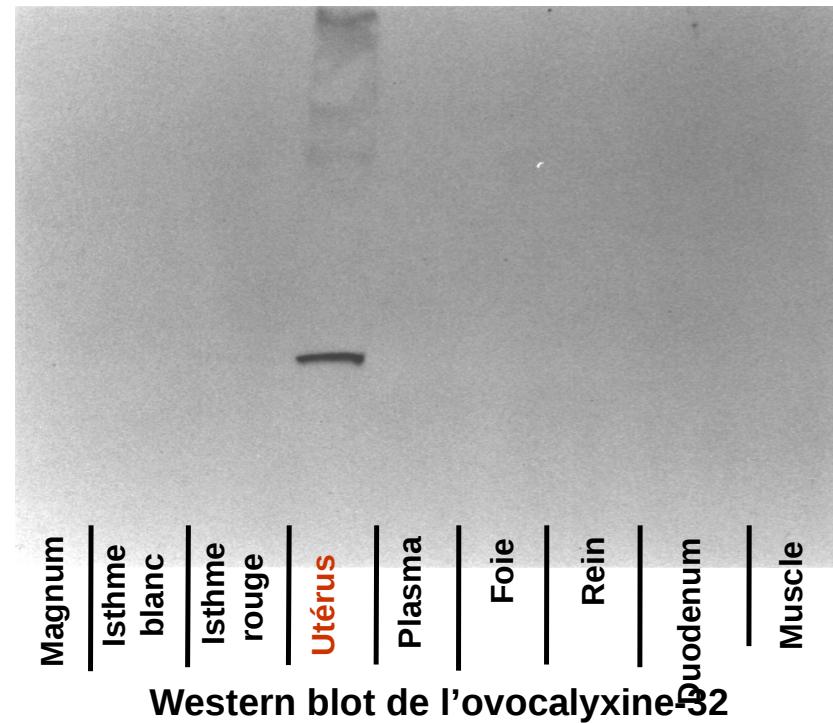
➤ Nouvelles séquences protéiques non identifiées au préalable (protéines spécifiques de la coquille)

□ Ovocalyxin -32 (*J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 39243-39252)

➤ Uniquement exprimée dans les tissus où se forme la coquille



RT-PCR de l'ovocalyxine-32



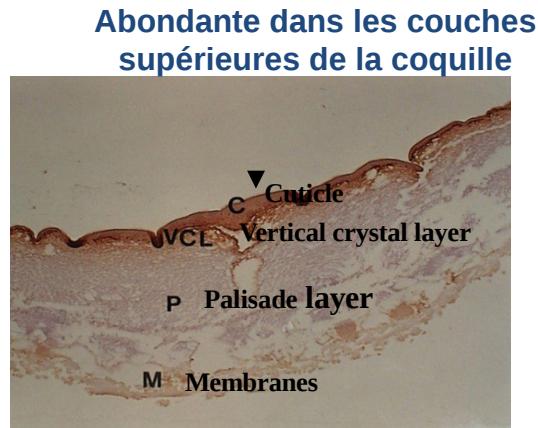
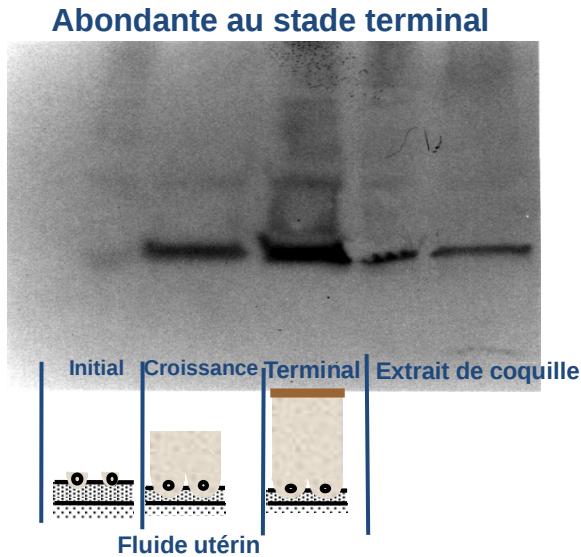
Western blot de l'ovocalyxine-32

Banques cDNA et EST

➤ Nouvelles séquences protéiques non identifiées au préalable (protéines spécifiques de la coquille)

□ Ovocalyxin -32 (*J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 39243-39252)

➤ Impliquée dans le processus d'arrêt de la calcification



➤ 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)

Utilisation combinée des banques cDNA, EST, génomique et outils de bioinformatique

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 282, NO. 8, pp. 5273–5286, February 23, 2007
© 2007 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

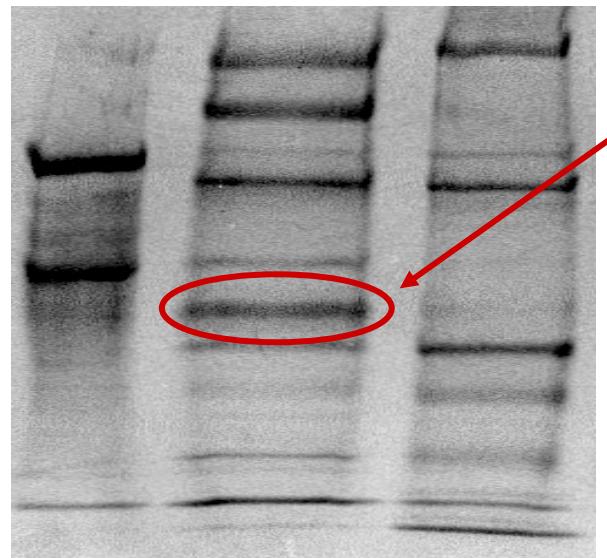
Cloning of Ovocalyxin-36, a Novel Chicken Eggshell Protein Related to Lipopolysaccharide-binding Proteins, Bactericidal Permeability-increasing Proteins, and Plunc Family Proteins*

Received for publication, November 3, 2006, and in revised form, December 14, 2006. Published, JBC Papers in Press, December 19, 2006, DOI 10.1074/jbc.M610294200

Joël Gautron^{†‡}, Emi Murayama[§], Alain Vignal[¶], Mireille Morisson[¶], Marc D. McKee^{||}, Sophie Réhault[‡], Valérie Labas^{**}, Maya Belghazi^{**}, Mary-Laure Vidal[†], Yves Nys[†], and Maxwell T. Hincke^{**}

Utilisation combinée des banques cDNA, EST, génomique et outils de bioinformatique

Ovocalyxin-36, une protéine spécifique de la matrice organique de la coquille



36 kDa Band

N-terminal Amino acid sequencing :
VLGSGLSCAISPRAMQQVLSDAIIQTGGL

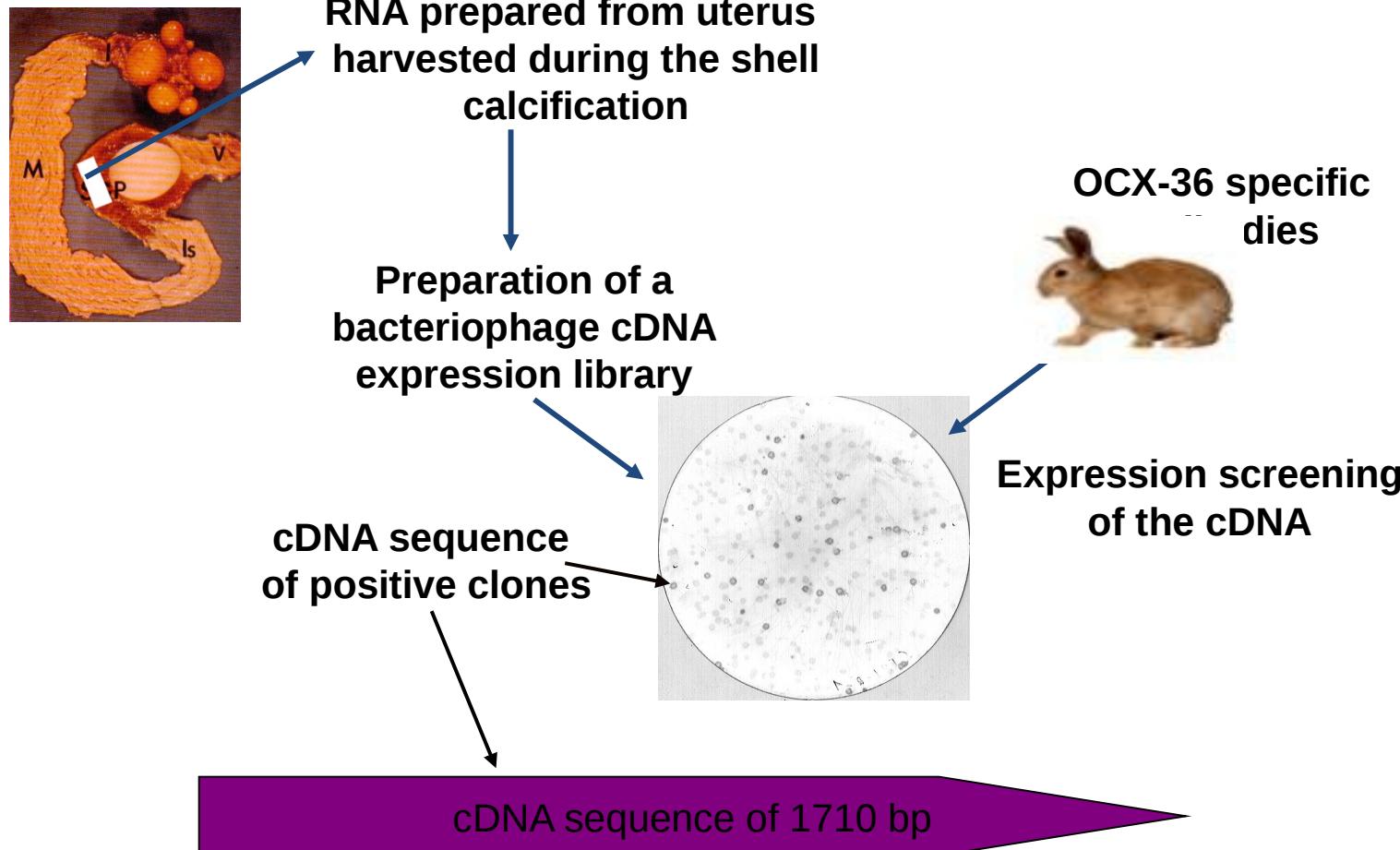
No correspondences in databases

Specific antibodies



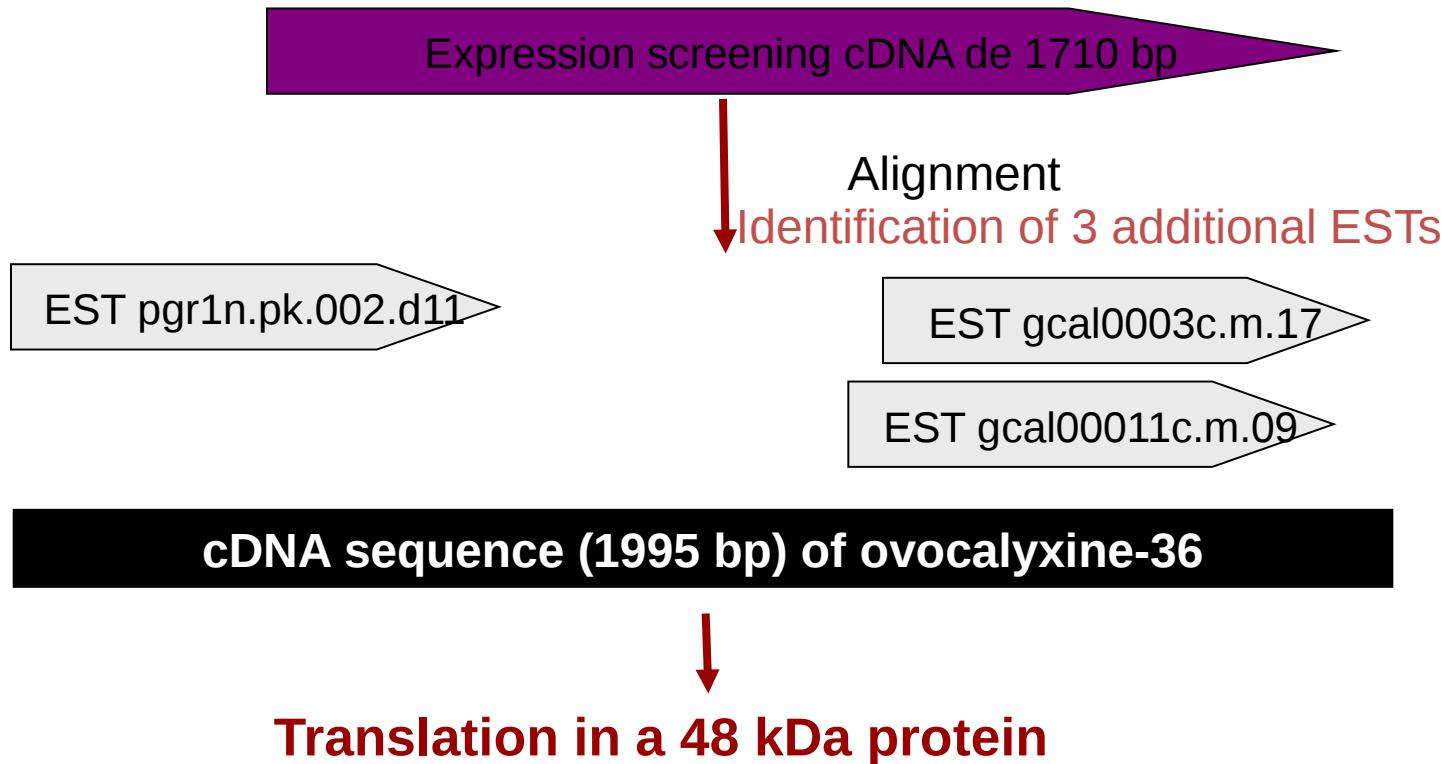
Utilisation combinée des banques cDNA, EST, génomique et outils de bioinformatique

Ovocalyxin-36, une protéine spécifique de la matrice organique de la coquille



Utilisation combinée des banques cDNA, EST, génomique et outils de bioinformatique

Ovocalyxin-36, une protéine spécifique de la matrice organique de la coquille



Utilisation combinée des banques cDNA, EST, génomique et outils de bioinformatique

Ovocalyxin-36, une protéine spécifique de la matrice organique de la coquille

Analyse bioinformatique des séquences génomique, cDNA et protéique

Séquence cDNA de OCX 36

Aucune homologie avec des séquences répertoriées

Séquence en acides aminés

Identité et similarité limités avec “lipopolysaccharide binding proteins (LBP)”, “bactericidal permeability increasing protein (BPI)” et “Plunc families proteins”

20-25 % résidus identiques

39-44 % substitutions conservatives

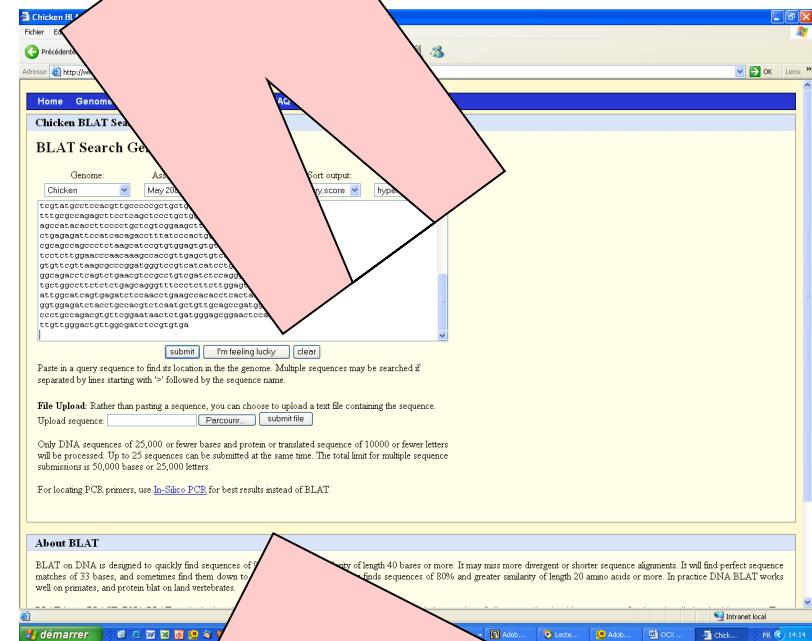
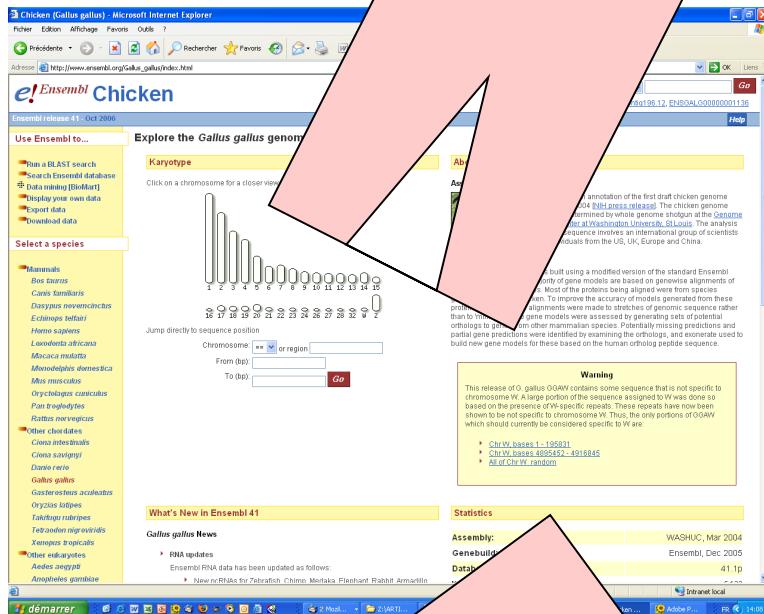
Expected value 10-4 to 10-28

Utilisation combinée des banques cDNA, EST, génomique et outils de bioinformatique

Ovocalyxin-36, une protéine spécifique de la matrice organique de la coquille

5'

Séquence d'ARN (1995 bp) de l'ARNm de la calyxin-36



Utilisation combinée des banques cDNA, EST, génomique et outils de bioinformatique

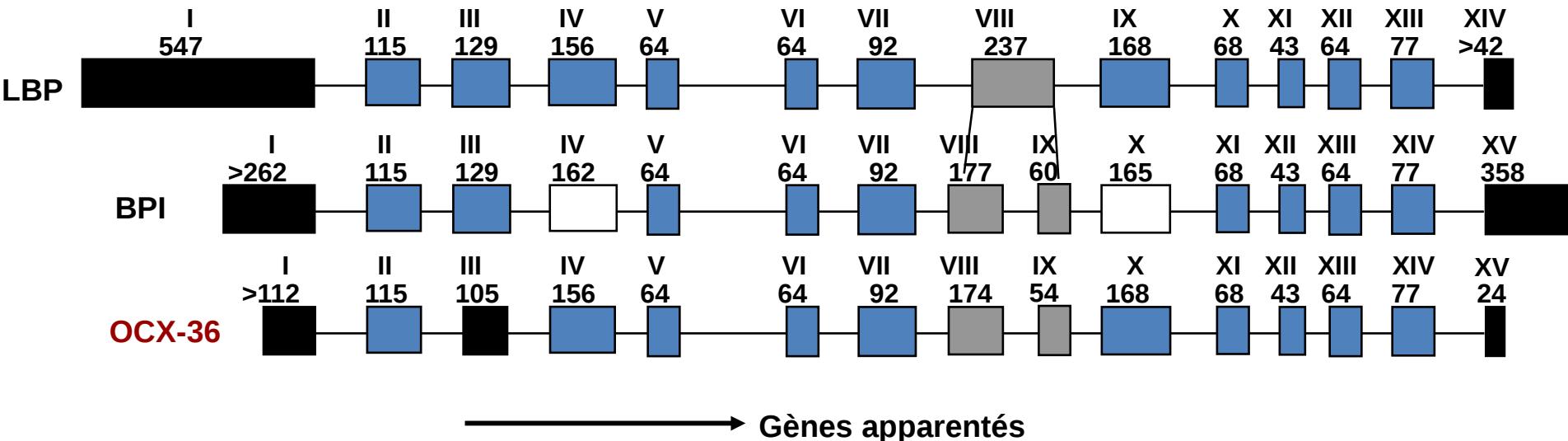
Ovocalyxin-36, une protéine spécifique de la matrice organique de la coquille

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

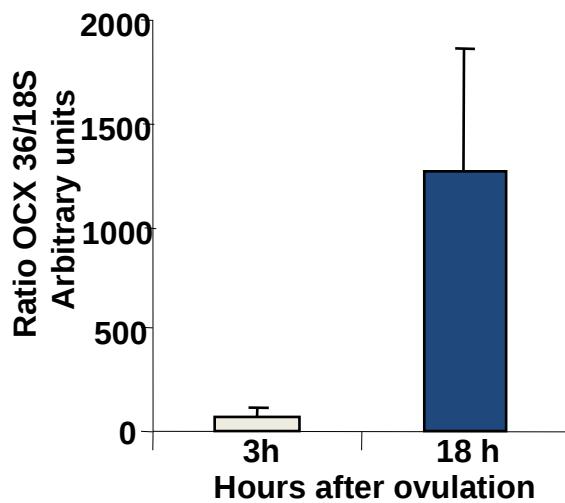
Architecture du gène



Utilisation combinée des banques cDNA, EST, génomique et outils de bioinformatique

Ovocalyxin-36, une protéine spécifique de la matrice organique de la coquille

Expression de l'OCX-36 à différentes conditions physiologiques



Utilisation combinée des banques cDNA, EST, génomique et outils de bioinformatique

Ovocalyxin-36, une protéine spécifique de la matrice organique de la coquille

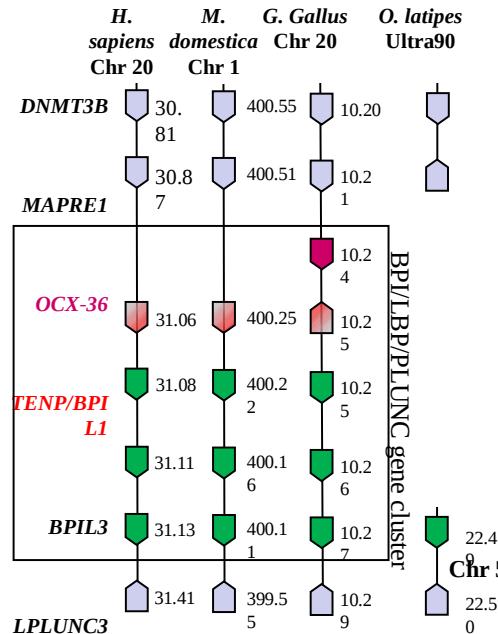
BIOLOGY OF REPRODUCTION 83, 893–900 (2010)
Published online before print 11 August 2010.
DOI 10.1095/biolreprod.110.085019

Minireview

What Makes an Egg Unique? Clues from Evolutionary Scenarios of Egg-Specific Genes¹

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



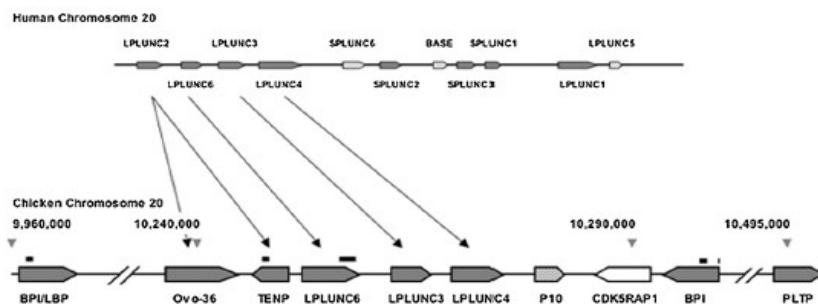
Identification and characterisation of the BPIL/BP/PLUNC-like gene repertoire in chickens reveals the absence of a LBP gene[☆]

Shih-Chieh Chiang^{a,1}, Edwin J.A. Veldhuijzen^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 2PF, UK

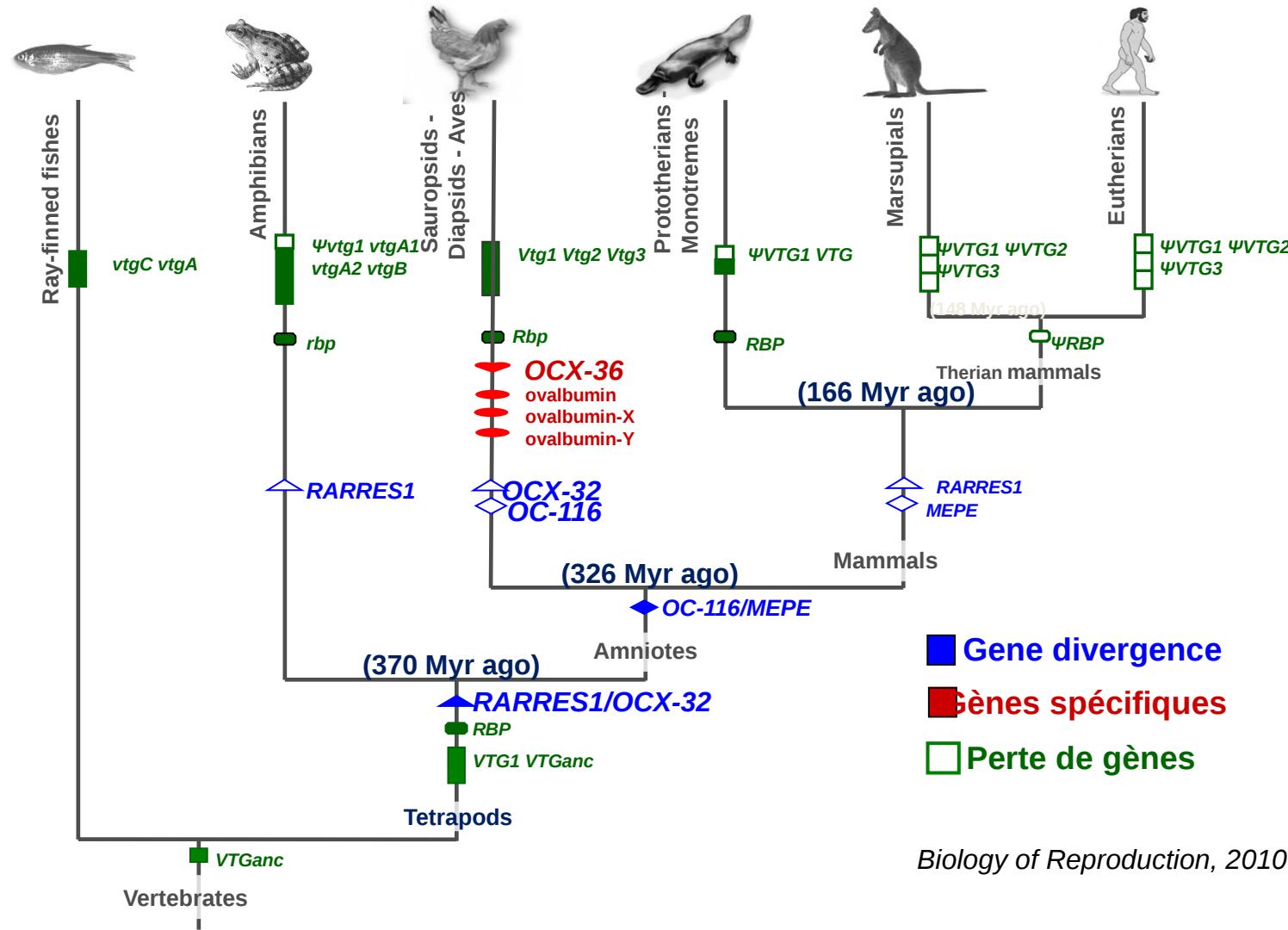
^b Department of Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, P.O. Box 80.165, 3508 TD Utrecht, The Netherlands

^c Krebs Institute for Biomolecular Research, Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, Sheffield S10 2TN, UK



Utilisation combinée des banques cDNA, EST, génomique et outils de bioinformatique

Ovocalyxin-36, une protéine spécifique de la matrice organique de la coquille



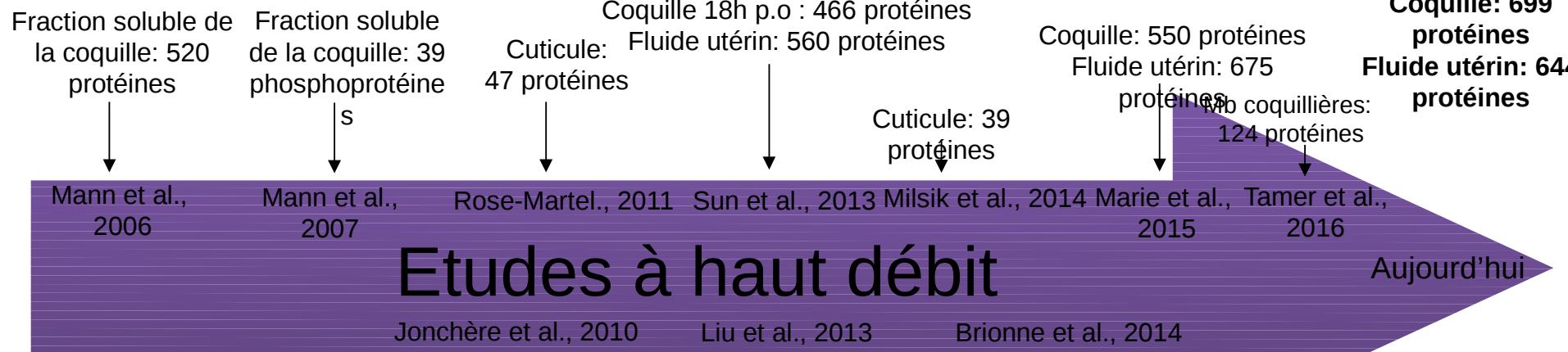
Identification des protéines de l'œuf

Les techniques classiques

- › Biochimie (Fractionnement des composés de l'œuf par chromatographie, électrophorèses...) et biologie moléculaire
 - 2006, environ 50 protéines de l'œuf (10 dans la coquille)

Les développements récents

Protéomique

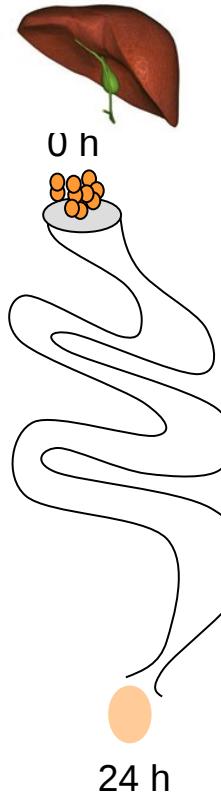


Transcriptomique

« omics » to identify novel egg proteins



- ✓ **Transcriptomics** (*microarrays, RNA seq...*)



Liver:

Egg yolk proteins (several weeks)

Ovary and infundibulum:

Vitelline membranes (less 1 h)

Magnum:

egg white proteins (1 to 4 h 30)

Isthmus:

eggshell membranes (4h30 to 6 h)

Uterus:

eggshell calcification (6 to 24 h)

Egg formation *Spatial and temporal regulation*

Different tissues or organs

Egg components are deposited at different times

Different physiological stages

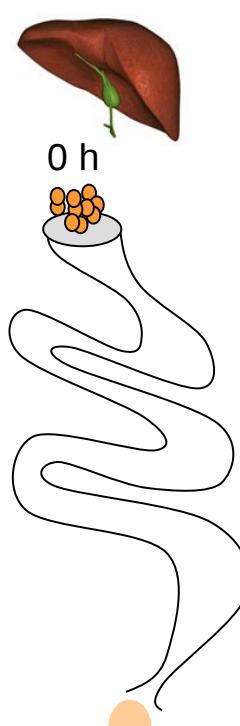
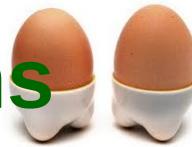


Comparison of gene expression in the various segment of the reproductive tract



Quantification of genes specifically related to the egg yolk, the vitelline membranes, the egg white, the eggshell membranes and the eggshell calcification process

« omics » to identify novel egg proteins



Liver: **582**
Egg yolk proteins (several weeks)

Ovary and infundibulum:
Vitelline membranes (less 1 h)

Magnum: **828**
egg white proteins (1 to 4 h 30)

Isthmus: **135**
eggshell membranes (4h30 to 6 h)

Uterus: **605**
eggshell calcification (6 to 24 h)

Bironne et al. BMC Genomics 2014, 15:220
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/220>



Open Access

RESEARCH ARTICLE Open Access
Hen uterine gene expression profiling during eggshell formation reveals putative proteins involved in the supply of minerals or in the shell mineralization process

Aurélien Bironne, Yves Nys, Christelle Hennequet-Antier and Joël Gautron*

Bourin et al. BMC Genomics 2012, 13:457
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/457>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Transcriptomic profiling of proteases and antiproteases in the liver of sexually mature hens in relation to vitellogenesis

Marie Bourin, Joël Gautron, Magali Berges, Christelle Hennequet-Antier, Cédric Cabau, Yves Nys and Sophie Réhault-Godbert*

New insights in egg white proteins using cDNA microarrays and extensive proteomic data mining

Joël Gautron¹, Aurélien Brionne¹, Christelle Hennequet-Antier¹, Cédric Cabau¹, Nicolas Guyot¹, Larry Cogburn², Sophie Réhault-Godbert¹, Yves Nys¹

Identifying specific proteins involved in eggshell membrane formation using gene expression analysis and bioinformatics

Jngwen Du^a, Maxwell Hincke^{a, d}, Aurelien Brionne^b, Christelle hennequet -Antier^b, Larry A. Cogburn^c, Yves Nys^b, Joël Gautron^b

Jonchère et al. BMC Genomics 2010, 11:57
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/57>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Gene expression profiling to identify eggshell proteins involved in physical defense of the chicken egg

Vincent Jonchère¹, Sophie Réhault-Godbert¹, Christelle Hennequet-Antier¹, Cédric Cabau¹, Vonick Sibut^{1,3}, Larry A Cogburn², Yves Nys¹, Joël Gautron^{1*}

I. Analyse exhaustive des protéines

utiliser les outils à haut débit pour identifier les gènes et protéines impliqués dans la formation de l'œuf

II. Caractérisation des défenses

III. Variabilité des défenses

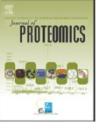
✓ Proteomics

JOURNAL OF PROTEOMICS 75 (2012) 2697–2706

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot



Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle

Megan Rose-Martel, Jingwen Du, Maxwell T. Hincke*

Proteomics 2013, 13, 3523–3536 DOI 10.1002/pmic.201300286 3523

RESEARCH ARTICLE

Differential label-free quantitative proteomic analysis of avian eggshell matrix and uterine fluid proteins associated with eggshell mechanical property

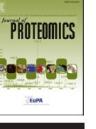
Congjiao Sun, Guiyun Xu and Ning Yang

JOURNAL OF PROTEOMICS 113 (2015) 178–193

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot



CrossMark

Quantitative proteomics and bioinformatic analysis provide new insight into protein function during avian eggshell biomineralization

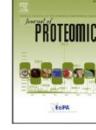
Pauline Marie^a, Valérie Labas^b, Aurélien Brionne^a, Grégoire Harichaux^b, Christelle Hennequet-Antier^a, Yves Nys^a, Joël Gautron^{a,*}

JOURNAL OF PROTEOMICS 116 (2015) 81–96

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

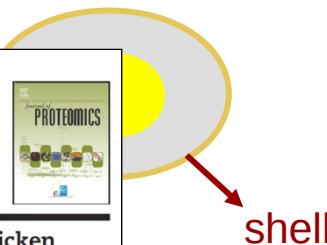
www.elsevier.com/locate/jprot



CrossMark

Novel identification of matrix proteins involved in calcitic biomineralization

Megan Rose-Martel, Sandy Smiley, Maxwell T. Hincke*



Proteomics 2006, 6, 3801–3810 DOI 10.1002/pmic.200600120

RESEARCH ARTICLE

Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer

Karlheinz Mann, Boris Maček and Jesper V. Olsen

106 DOI 10.1002/pmic.200600635

Proteomics 2007, 7, 106–115

RESEARCH ARTICLE

Phosphoproteins of the chicken eggshell calcified layer

Karlheinz Mann, Jesper V. Olsen, Boris Maček, Florian Gnad and Matthias Mann

Max-Planck-Institute for Biochemistry, Department of Proteomics and Signal Transduction, Martinsried, Germany

Connective Tissue Research, 48:1–8, 2007
Copyright © Informa Healthcare
ISSN: 0300-8207 print / 1521-0456 online
DOI: 10.1080/03008200601003116

ORIGINAL RESEARCH

Proteins of Insoluble Matrix of Avian (*Gallus Gallus*) Eggshell

Ivan Mikšík and Adam Eckhardt

Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, and Cardiovascular Research Centre, Prague, Czech Republic

Pavla Sedláková and Katerina Mikuliková

Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Anal Bioanal Chem (2010) 397:205–214

DOI 10.1007/s00216-009-3326-3

ORIGINAL PAPER

Determination of insoluble avian eggshell matrix proteins

Ivan Mikšík · Pavla Sedláková · Katerina Lacinová · Statis Pataridis · Adam Eckhardt

« omics » to identify novel egg proteins



- ✓ **Proteomics** (*Mass spectrometry-based methods for protein identification*)

>3600 protein identifiers in the different egg proteomes from 3 different databases
IPI (closed), GeneBank and UniProt



Lot of redundancies
Majority of them were not annotated



Data mining and bioinformatics tools



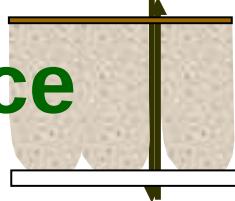
Loading of the sequences, multi alignment to eliminate redundancies

725 non redundant eggshell proteins



Update of functional annotations

Eggshell proteins and physical defence



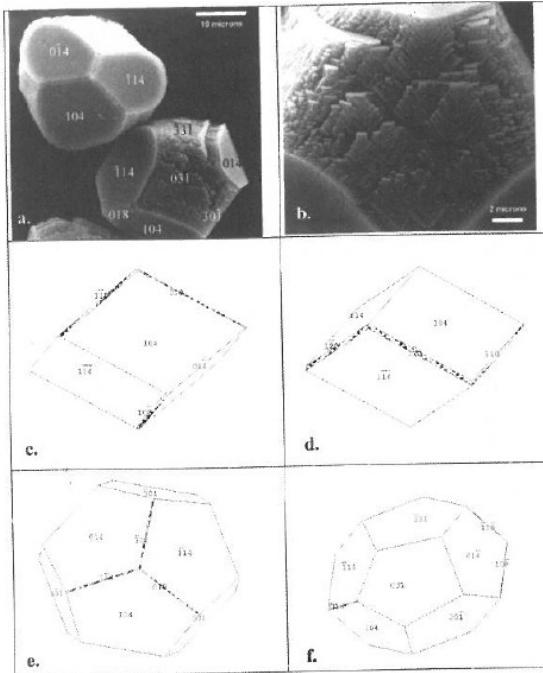
➤ calcification process

✓ Proteins involved in the **biomineralization** of shell

- *OC-17*
- *OC-116*
- *Ovotransferrin*
- *OCX-32*
- *Osteopontin*
- *Lysozyme*

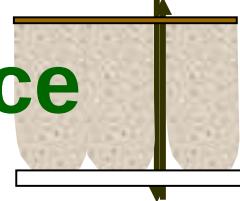
Ovotransferrin is a Matrix Protein of the Hen Eggshell Membranes and Basal Calcified Layer

J. GAUTRON^a, M.T. HINCKE^b, M. PANHELEUX^a, J.M. GARCIA-RUIZ^c, T. BOLDICKE^d and Y. NYS^{a,*}



Proteins interact with minerals to influence the morphology of crystals

Eggshell proteins and physical defence



➤ calcification process

✓ Proteins involved in the **biomineralization** of shell

- OC-17
- OC-116
- Ovotransferrin
- OCX-32
- Osteopontin
- Lysozyme

Biomineralization

Angewandte
Chemie
International Edition

DOI: 10.1002/anie.201000679

Structural Control of Crystal Nuclei by an Eggshell Protein**

Colin L. Freeman, John H. Harding, David Quigley, and P. Mark Rodger*

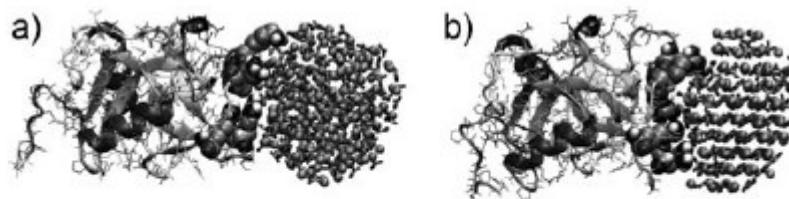
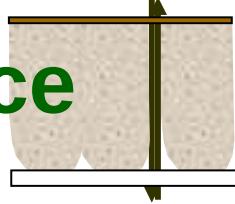


Figure 1. Ovoctein-17 bound to an amorphous (a) and a crystallized (b) calcium carbonate nanoparticle containing 192 formula units. The

Eggshell proteins and physical defence



➤ calcification process

✓ Proteins involved in the **biomineralization** of shell

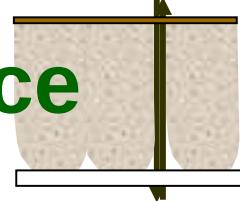
- *OC-17*
- *OC-116*
- *Ovotransferrin*
- *OCX-32*
- *Osteopontin*
- *Lysozyme*

✓ **Calcium binding proteins (CaBPs)** to interact with calcium to favour crystal nucleation or drive the morphology of crystals

Identification of numerous novel CaBPs

- *A total of 23 proteins with EF-hand and EGF-like calcium binding domains are present in the shell*

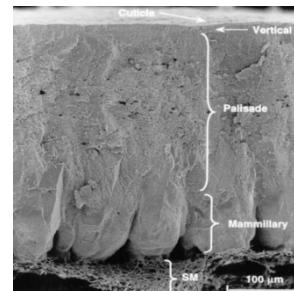
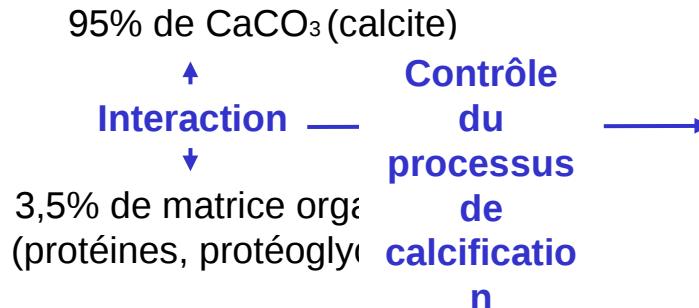
Eggshell proteins and physical defence



➤ calcification process

- Proteins involved in the **proper folding of the eggshell matrix**
- ✓ An appropriate conformation of proteins is required to ensure calcium and mineral interactions and to ensure template to the mineralized structure
 - Molecular chaperone
 - Protein assisting folding
 - Proteins with interactive properties related to proteoglycans
- **Regulation of the activity of proteins** related to the shell deposit
- ✓ Shell mineralisation occurs in a non cellular milieu
- ✓ In situ by direct action of proteins to inhibit or activate the molecular actors present in the milieu.
 - Molecular chaperone which can interact with proteins might be involved in this regulation process.
 - Proteases and proteases inhibitors (specific and controlled role during calcification process, either by degrading proteins or regulating processing of proteins into their mature forms)

Etude spatio-temporelle des protéines impliquées dans la biominéralisation de la coquille des oiseaux

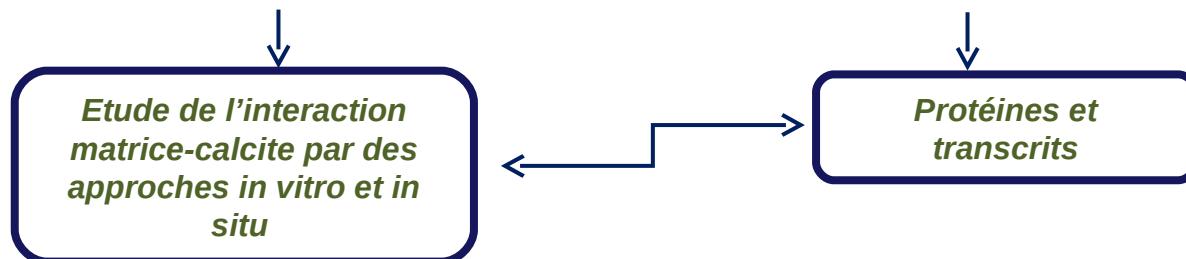


Approches globales et non hiérarchisées

- ✓ Plus de 700 protéines
- ✓ Plus de 600 transcrits spécifiques

...archiser les acteurs moléculaires prépondérants lors du processus de minéralisation

Etudes à différents stades de la minéralisation (poule et pintade)



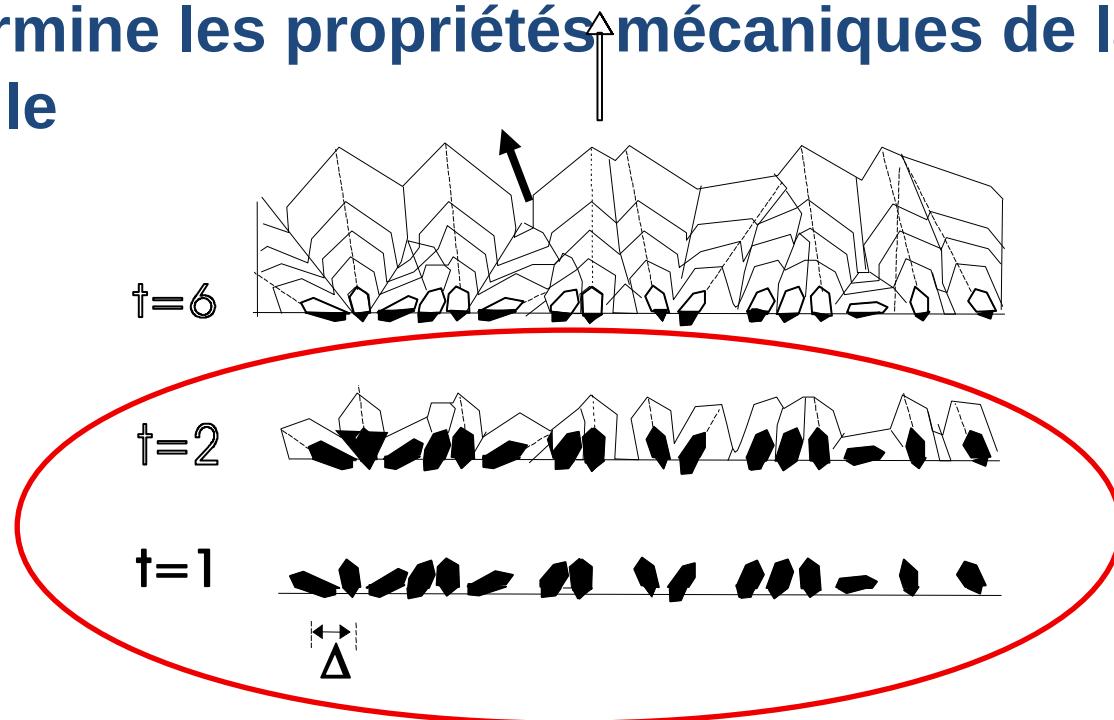
AGENCE NATIONALE DE LA RECHERCHE

ANR
IMPACT (2013-2017)

Etude spatio-temporelle des protéines impliquées dans la biominéralisation de la coquille des oiseaux

□ Importance de l'initiation de la minéralisation

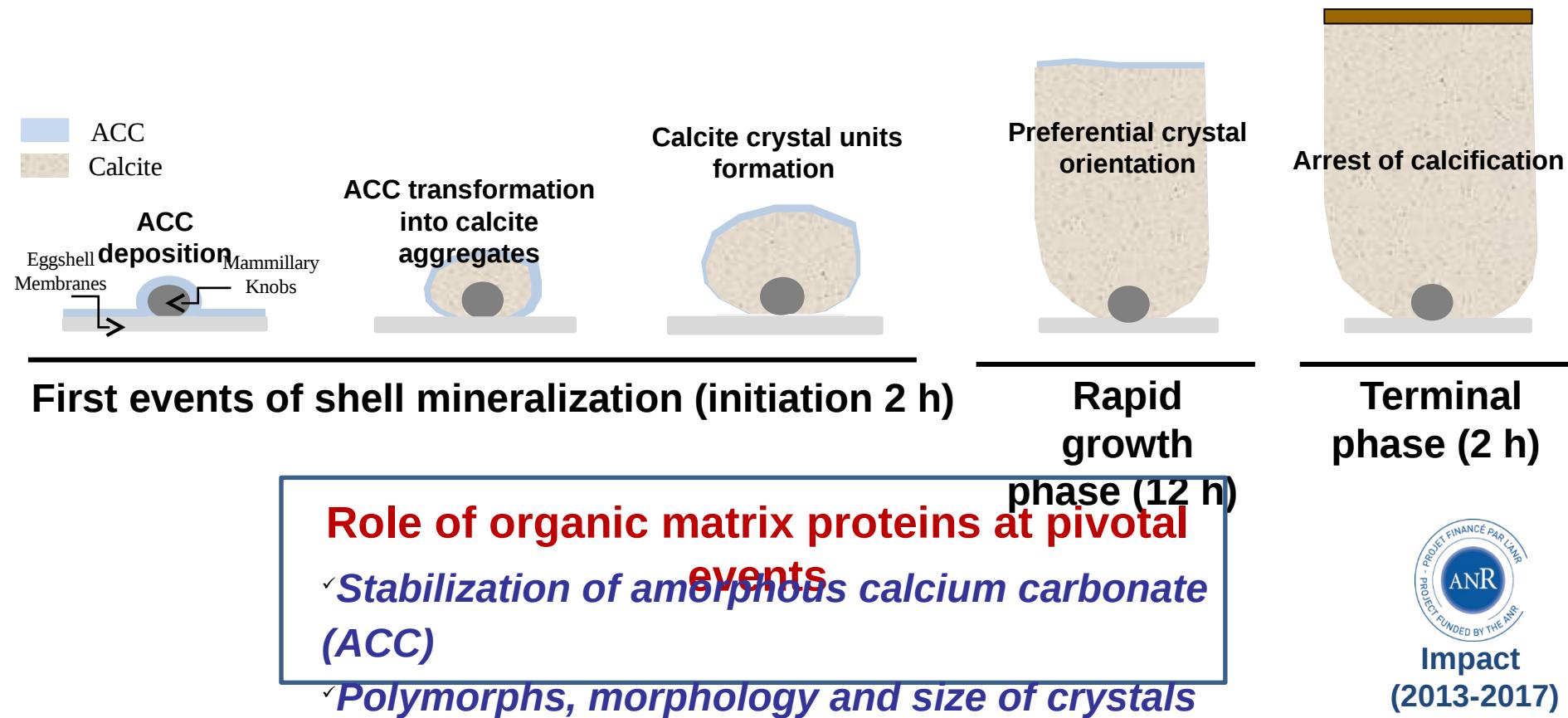
- Etape cruciale pour la suite de la biominéralisation
- Détermine les propriétés mécaniques de la coquille



Rodriguez-Navarro
and Garcia-Ruiz,
2000

Etude spatio-temporelle des protéines impliquées dans la biominéralisation de la coquille des oiseaux

Role of amorphous calcium carbonate (ACC) at pivotal stages of shell formation

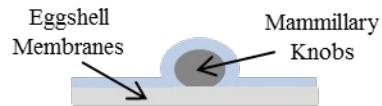


Impact
(2013-2017)

Etude spatio-temporelle des protéines impliquées dans la biominéralisation de la coquille des oiseaux

ACC
Calcite

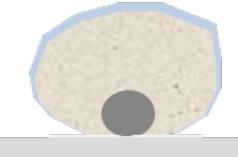
ACC deposition



ACC transformation into calcite aggregates



Calcite crystal units formation



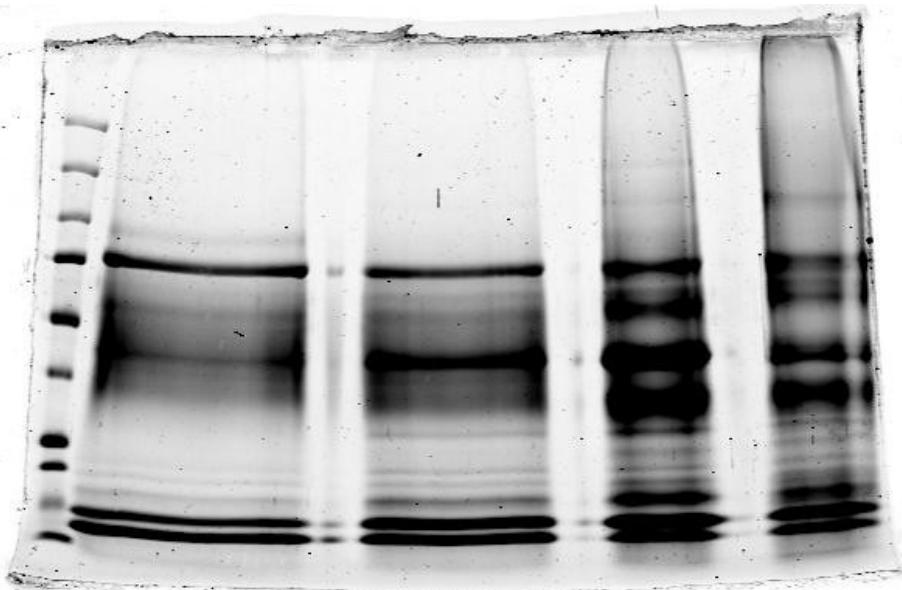
Preferential crystal orientation



Arrest of calcification



First events of shell mineralization (initiation 2 h)



Rapid growth phase (12 h)

Terminal phase (2 h)

Analyse protéomique sur LTQ-VelosOrbitrap des bandes

Identification des protéines

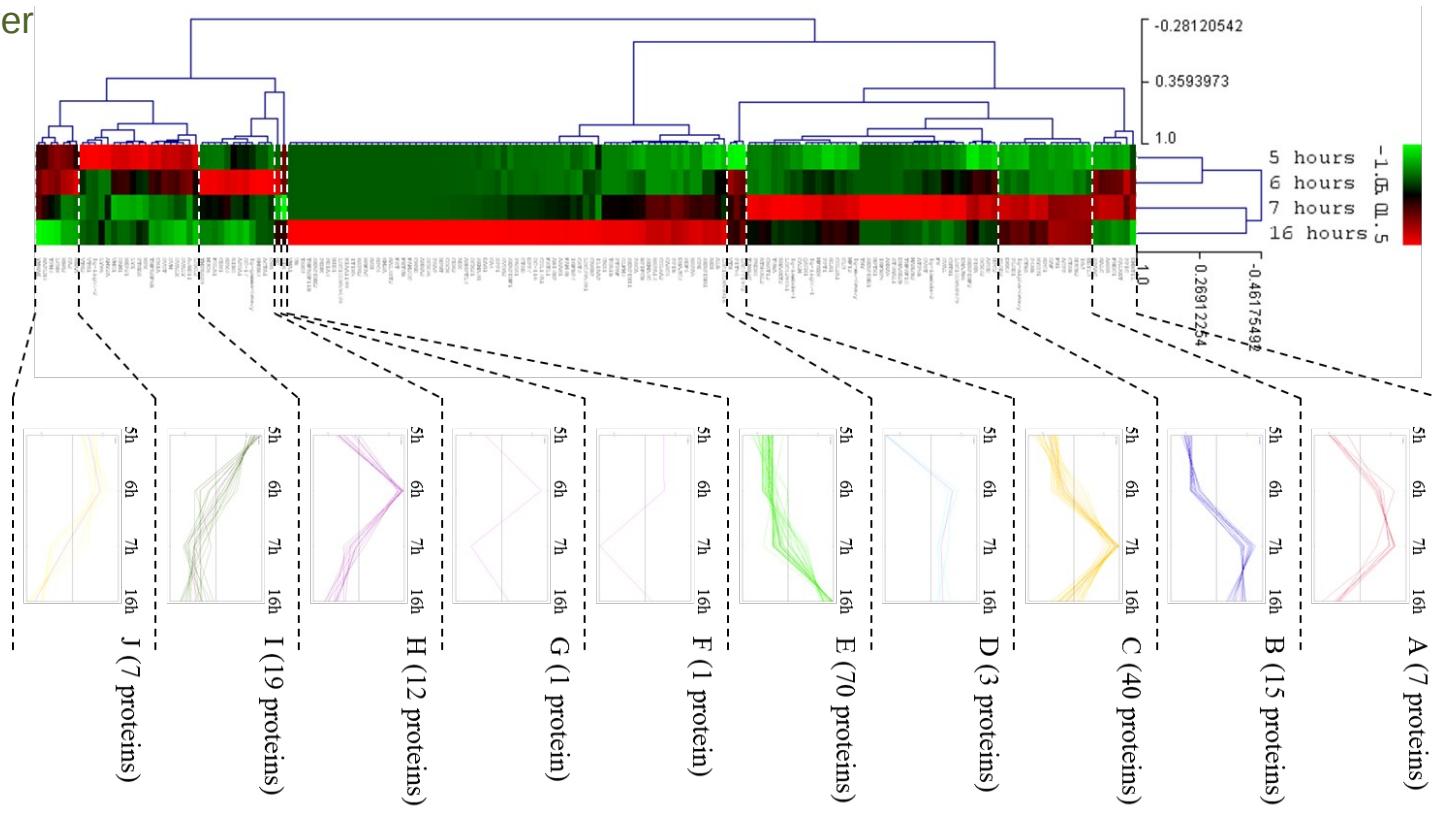
Etablissement d'une liste non redondante de 316 protéines

Etude spatio-temporelle des protéines impliquées dans la biominéralisation de la coquille des oiseaux

- **316 protéines quantifiées**
- **Détermination de l'abondance relative dans chacun des 5 stades**
- **Analyses statistiques**
 - ANOVA
Protéines ont des variations d'abondance significatives selon les stades
 - Cluster hiérarchique profils d'abondance protéique

Etude spatio-temporelle des protéines impliquées dans la biominéralisation de la coquille des oiseaux

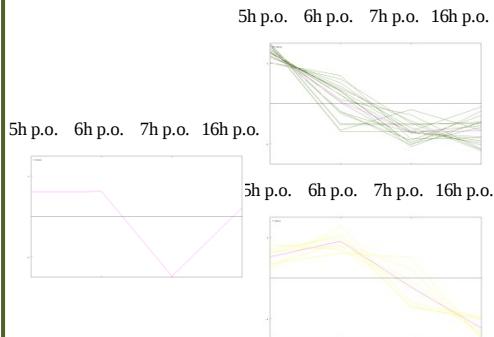
- Classement des protéines selon leur profil d'abondance
 - Réalisation d'un cluster hiérarchique pour les protéines quantifiées
- Valeur moyenne centrée réduite pour limiter l'effet de la variance
- Calculs de distance entre individus : corrélation de Pearson
- Calculs de distance entre classe : moyenne des distances entre chaque individu de chaque classe (average)



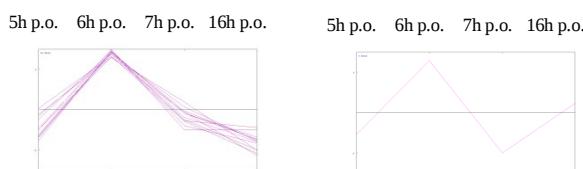
Etude spatio-temporelle des protéines impliquées dans la biominéralisation de la coquille des oiseaux

Classement des protéines selon leur profil d'abondance

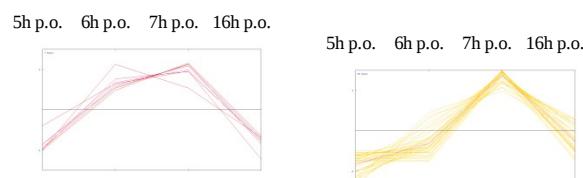
27 proteins overabundant during primary events of shell mineralization



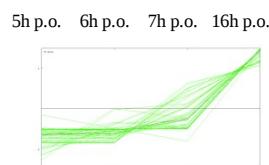
13 proteins overabundant during ACC transformation into calcite aggregates



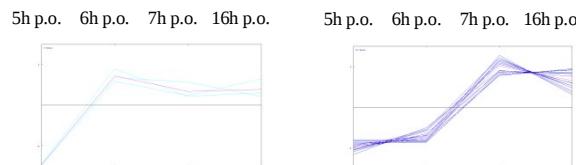
47 proteins overabundant when large calcite crystal units are formed



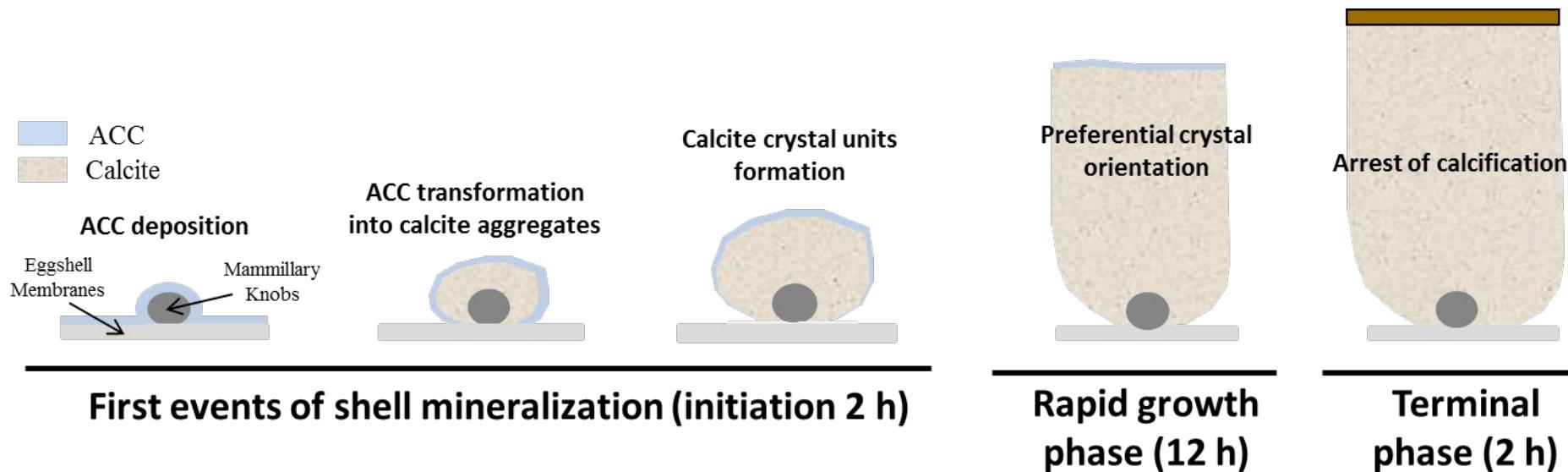
70 proteins overabundant during rapid growth phase



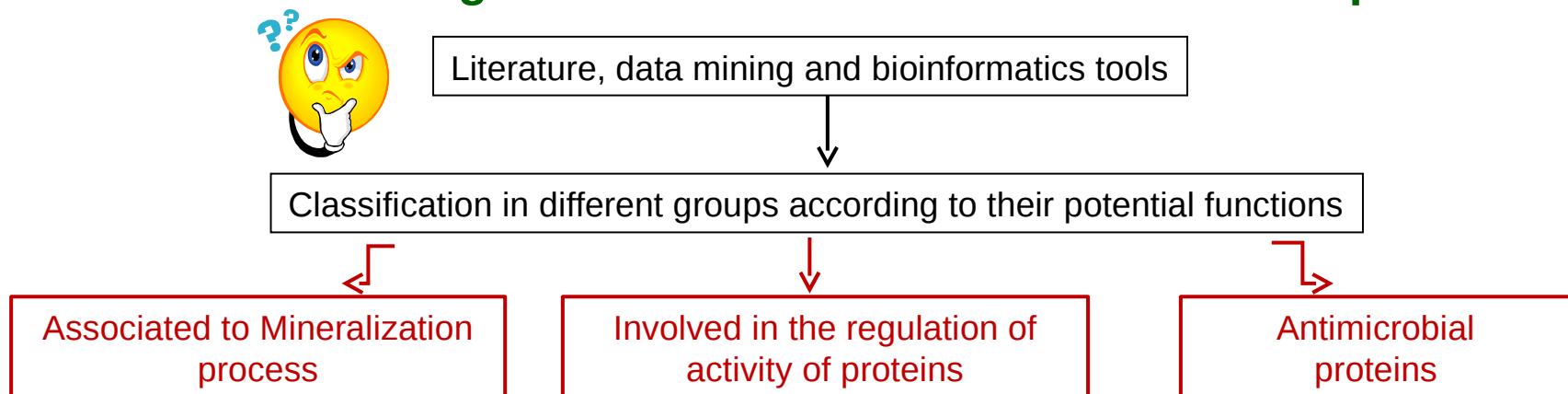
18 proteins overabundant at stages associated with the presence of calcite



Etude spatio-temporelle des protéines impliquées dans la biominéralisation de la coquille des oiseaux



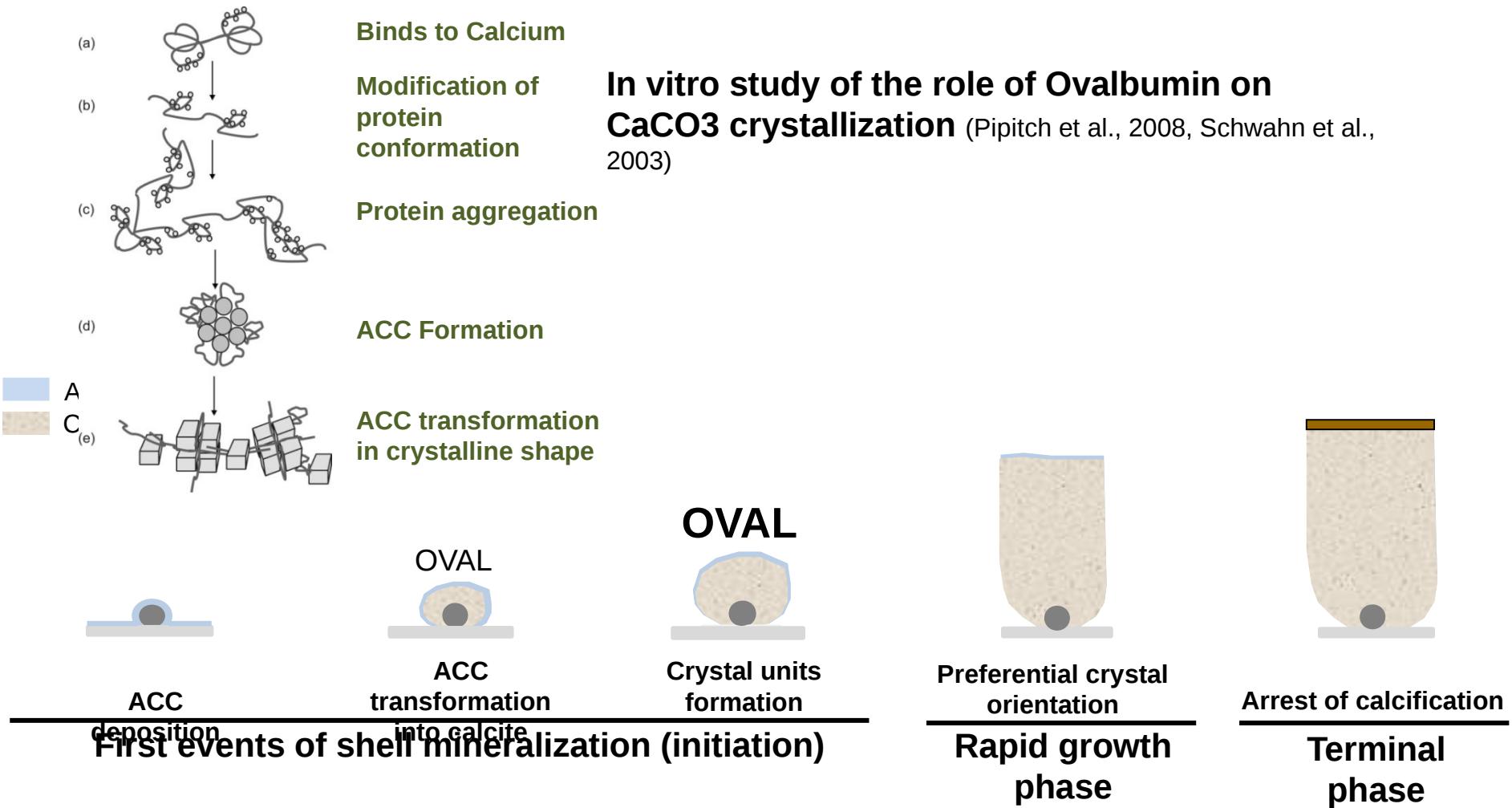
Functions and biological activities of the identified matrix proteins ?



Proteins at pivotal events

Proteins having a direct involvement in eggshell mineralization

- Proteins with established role in the biominerallisation



Proteins at pivotal events

Proteins having a direct involvement in eggshell mineralization

- Proteins with established role in the biominerallisation

Freeman et al,
2010

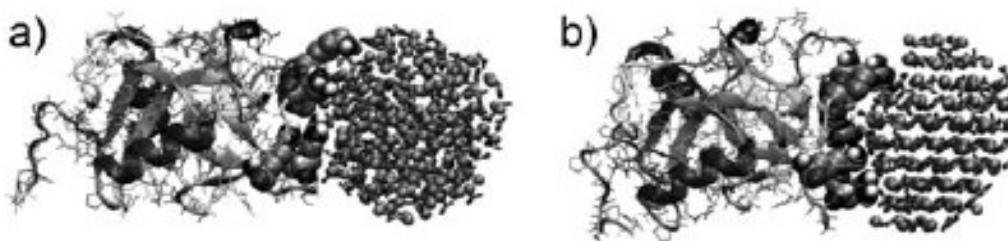
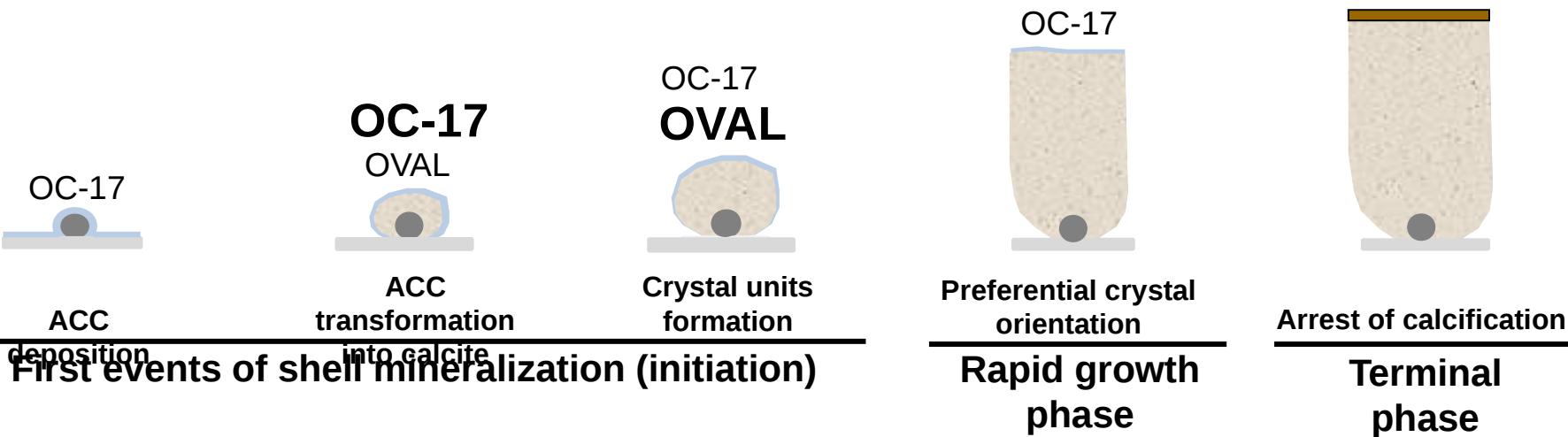


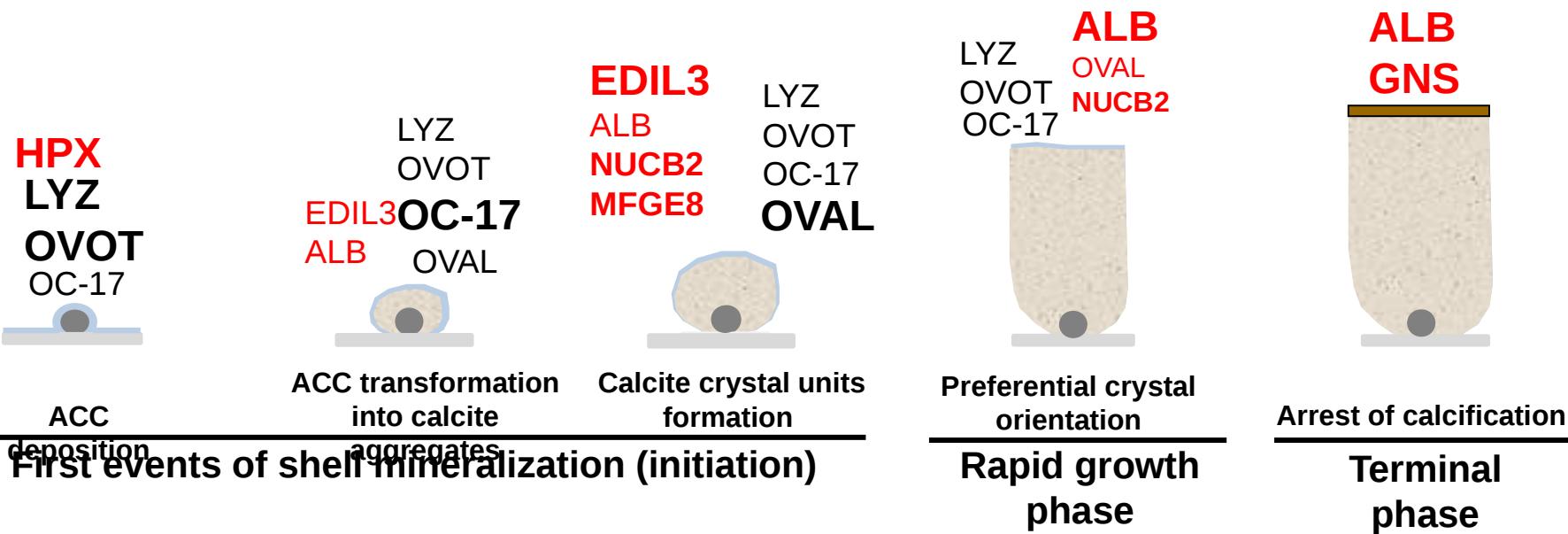
Figure 1. Ovocleidin-17 bound to an amorphous (a) and a crystallized (b) calcium carbonate nanoparticle containing 192 formula units.



Proteins at pivotal events

Proteins having a direct involvement in eggshell mineralization

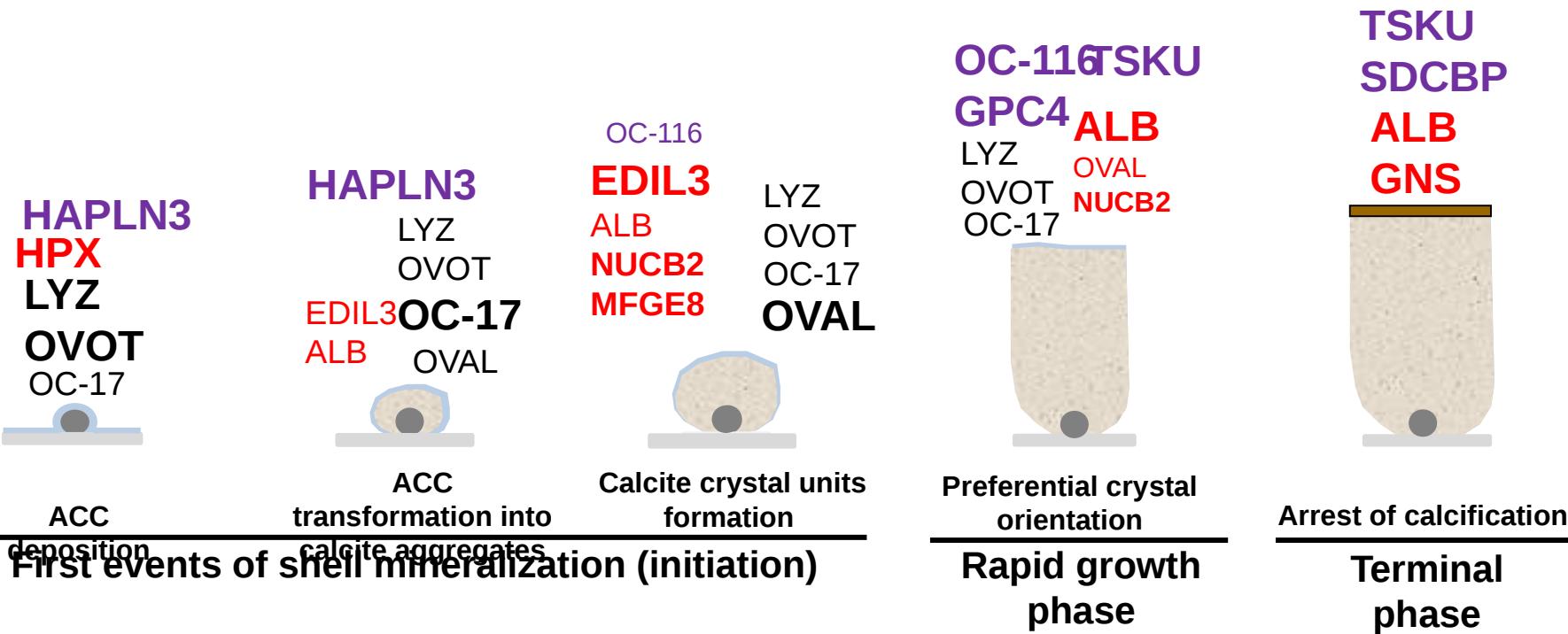
- ✓ Proteins with established role in the biominerallisation
- ✓ **Calcium binding proteins (CaBPs)** interacting with calcium, favoring crystal nucleation and driving the morphology of crystals
 - *Proteins with EF-hand and EGF-like calcium binding domains*



Proteins at pivotal events

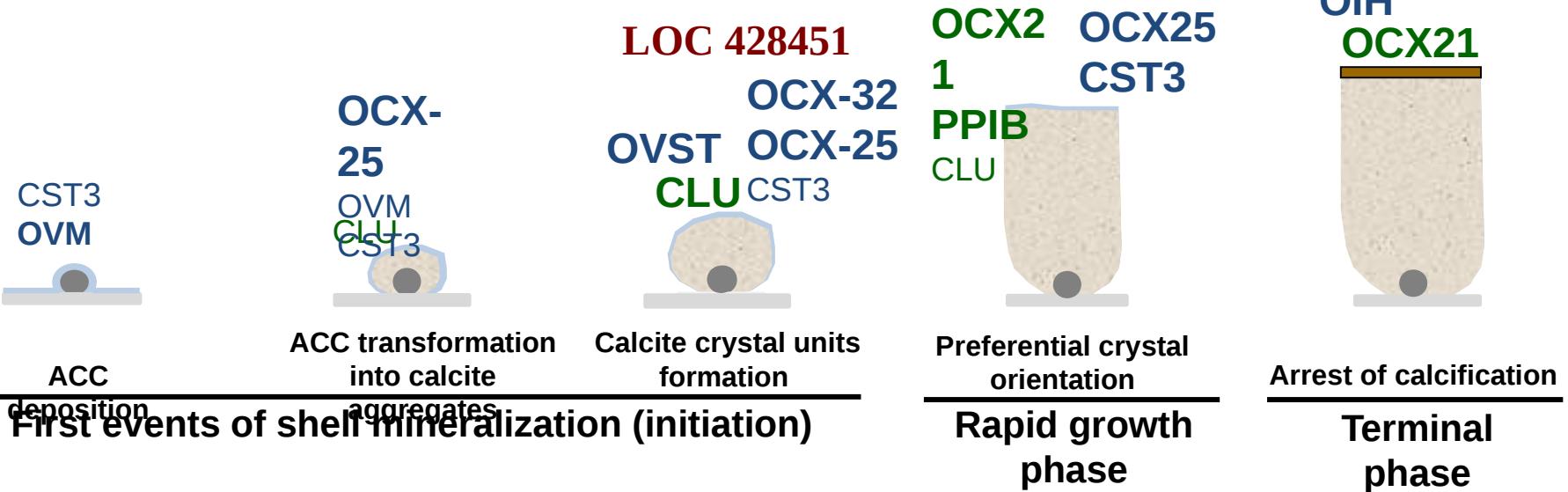
Proteins having a direct involvement in eggshell mineralization

- ✓ Proteins with established role in the **biomineralisation**
- ✓ **Calcium binding proteins (CaBPs)** interacting with calcium, favoring crystal nucleation and driving the morphology of crystals
 - *Proteins with EF-hand and EGF-like calcium binding domains*
- ✓ **Proteoglycans** and proteoglycan binding proteins
 - proteoglycans have a negative charge to attract Ca²⁺ ions



Proteins at pivotal events

- **Proteins involved in the regulation of proteins driving mineralization**
- ✓ Proteins involved in the proper folding of the eggshell matrix to ensure calcium and mineral interactions and to ensure template to the mineralized structure
- ✓ Proteins inhibiting or activating proteins present in the mineralization milieu (non cellular).
 - *Molecular chaperones interacting with proteins driving mineralization*
 - *Proteases and protease inhibitors (specific and controlled role during calcification process, either by degrading proteins or regulating processing of proteins into their mature forms)*
- ✓ Mineralization depends of the degree of protein phosphorylation
 - *Kinases and Phosphatases*



Biominéralisation de la coquille d'œuf d'oiseaux

Microstructure, ultrastructure parfaitement définie

Rôle du carbonate de calcium amorphe (ACC) est démontré et important

Interaction matrice organique minéraux est prépondérante

Stabilisation de l'ACC, morphologie des cristaux

Caractérisation de la matrice organique récente (10 protéines en 2006, > 700 aujourd'hui)

Hiérarchisation des acteurs moléculaires prépondérants lors du processus de minéralisation

Etablissement d'une liste restreinte de candidats pivots

Validation expérimentale

(purification, interaction minéral, invalidation des gènes codant les protéines clefs, recherche de polymorphismes associés à la solidité du biomatériau, marqueurs biologiques de la solidité, relation structure-fonction....)