



**HAL**  
open science

## 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, 2015, pp.87.  
hal-02795700

**HAL Id: hal-02795700**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02795700>**

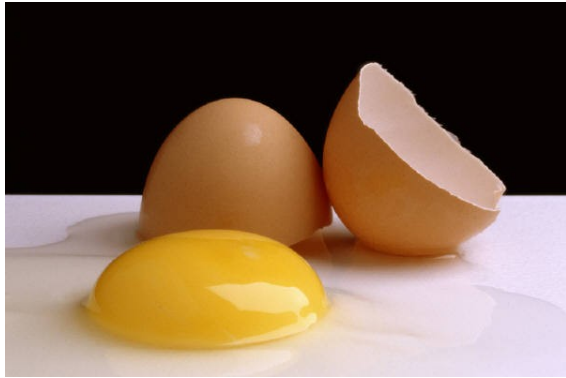
Submitted on 5 Jun 2020

**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



# Bioinéralisation de la coquille d'œufs d'oiseaux

Joël Gautron  
INRA, UR83 Recherches  
Avicoles  
37380 Nouzilly

# Bioinéralisation de la coquille d'œufs d'oiseaux

- Introduction
- Structure de la coquille
- Formation de la coquille
- Rôle de la matrice organique
- Identification des protéines de la matrice organique
- Hiérarchiser les Protéines de la matrice organique intervenant dans le processus de minéralisation
- Conclusion

# INTRODUCTION

# L'œuf de poule

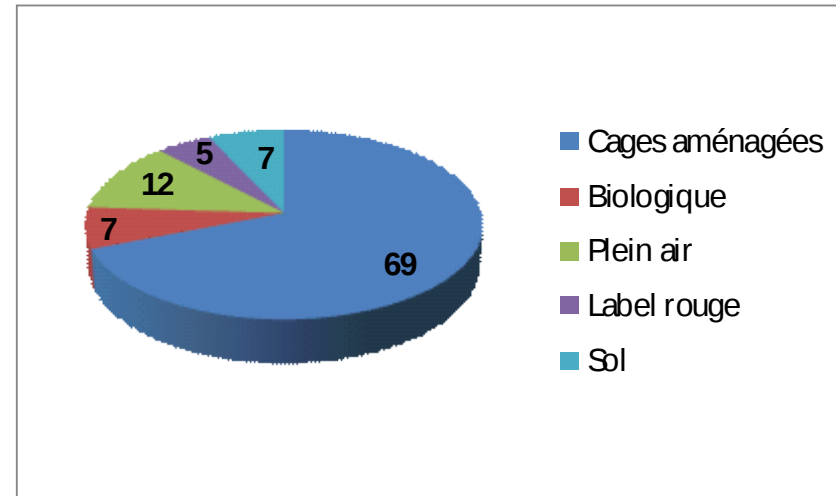
## L'Œuf, un produit de base pour l'alimentation humaine

### 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 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

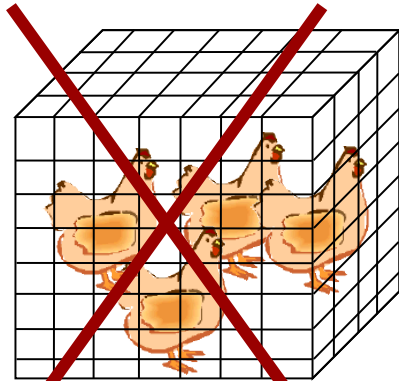
- \* fientes
- \* environnement élevage
- \* centre de conditionnement
- \* circuit de commercialisation
- \* consommateur...

→ Les œufs et produits d'œufs sont consommés crus (mayonnaise...)

→ Impliqués dans 45% des salmonelloses (62 % pour salmonella enteritidis)

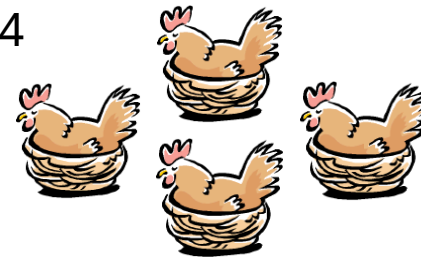
**Le risque de contamination par les microorganismes et notamment *Salmonella* est donc une préoccupation pour la filière œufs et ovoproduits**

# Le contexte européen



**2012**  
Interdiction des cages  
conventionnelles

Directive EU 1986/609  
Animal welfare



Cages aménagées, volières  
ou autres systèmes au sol

**Impact sur la qualité hygiénique de l'oeuf ?**

## L'Œuf, un p Chambre is

Doit contenir la totalité des composants nécessaires au développement embryonnaire



Agressions  
physiques

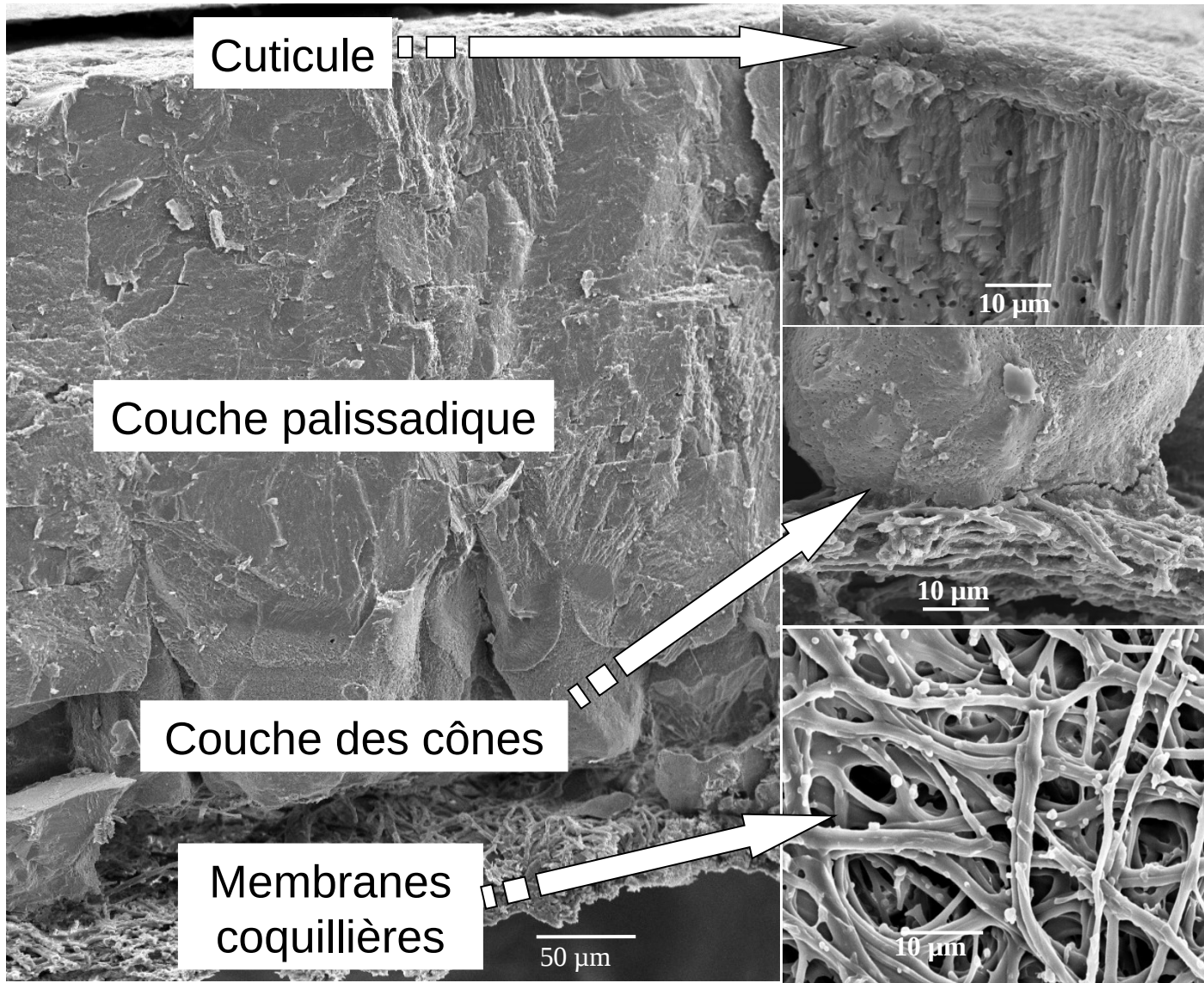
Microbes

- 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)

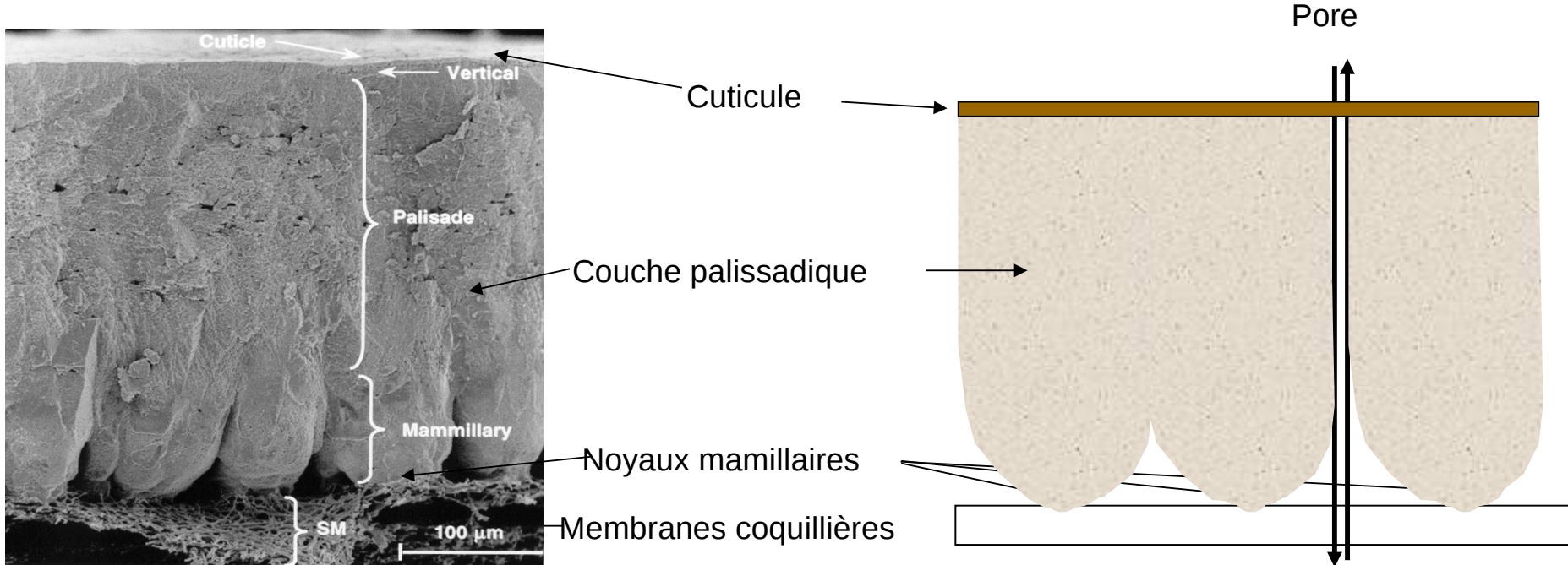


# Structure de la coquille

# La coquille (défense physique)



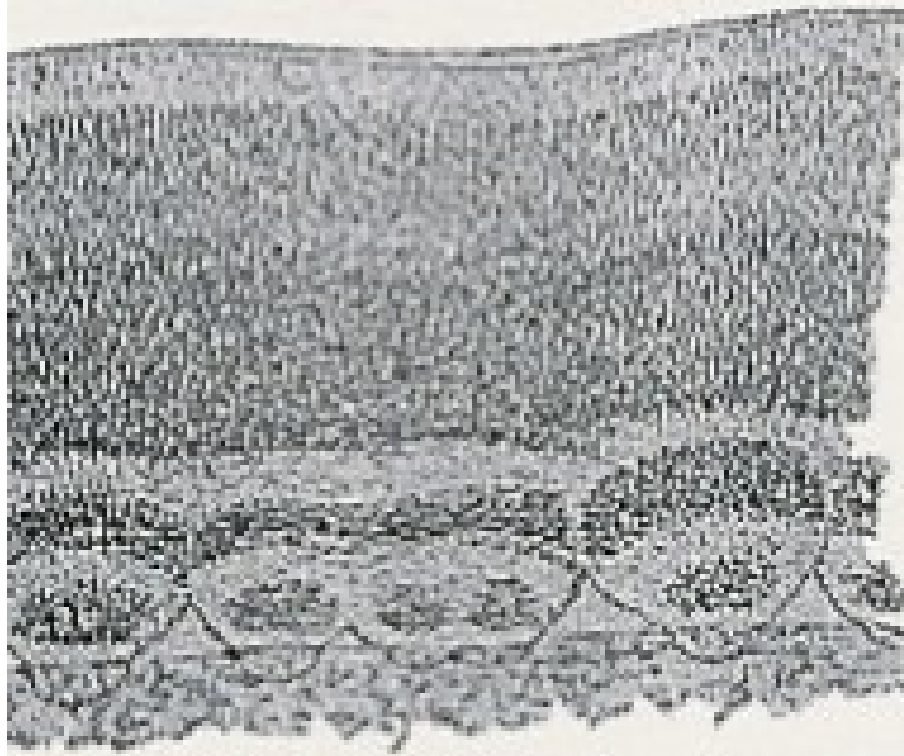
# La coquille (défense physique)



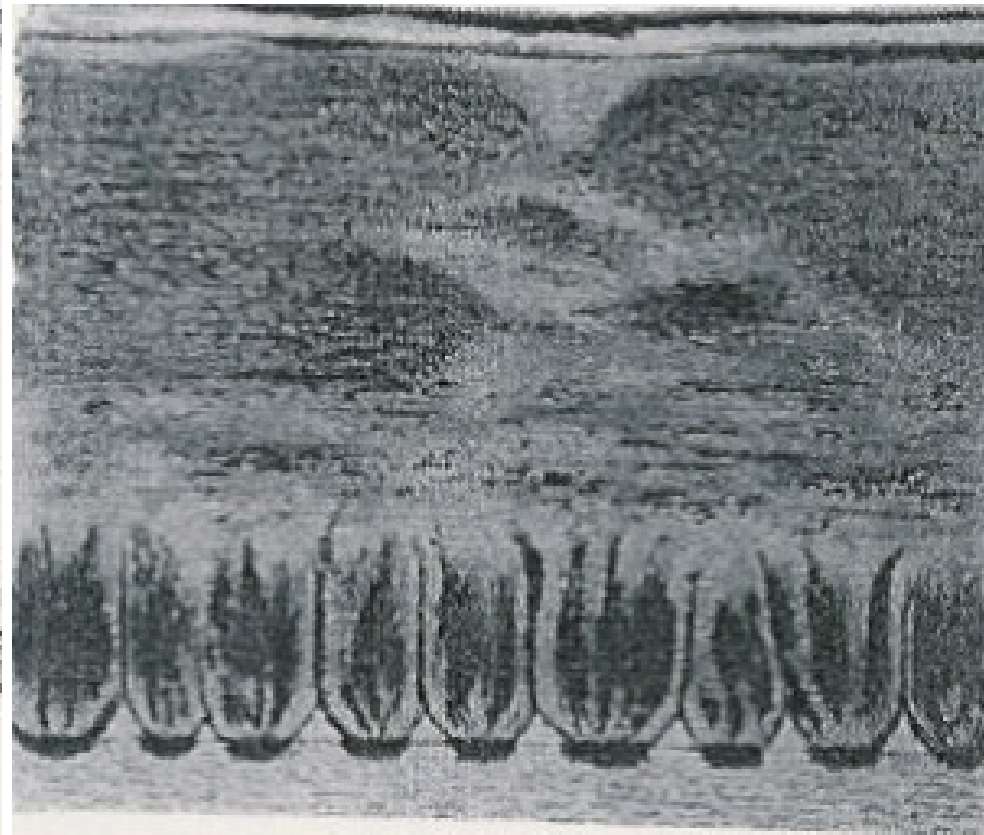
Composition :

- ✓ Carbonate de calcium (calcite)
- ✓ 3,5 % matrice organique (2% partie minéralisée)

# La coquille (défense physique)



**Gallus gallus x 72**

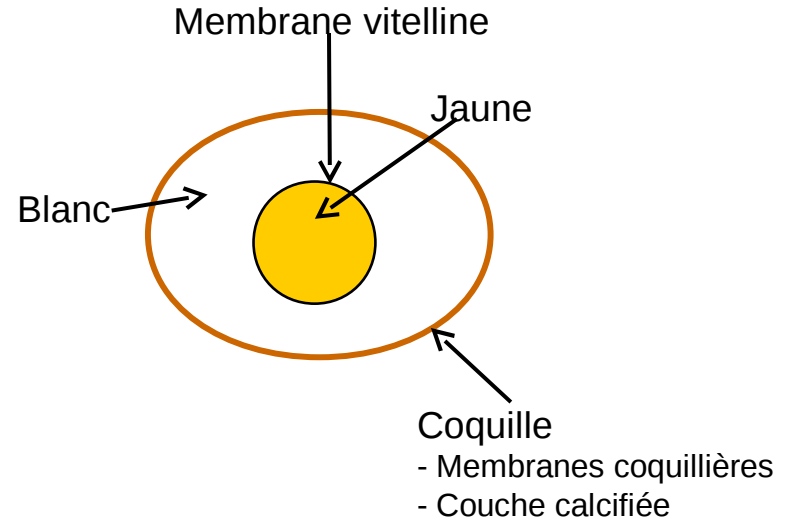
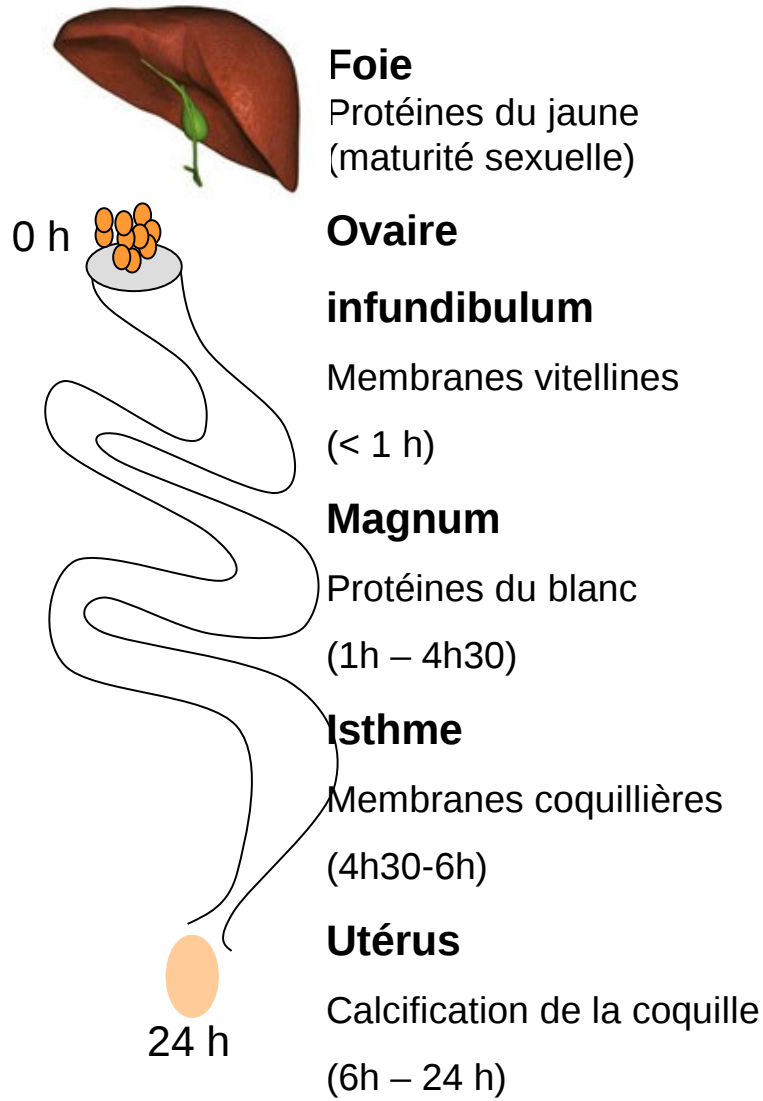


**Cygnus x 53**

Dessin de Wilhem von Nathusius, 1821-99

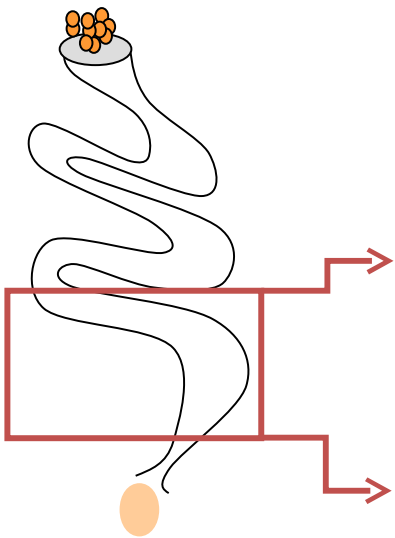
# Formation de la coquille

# La formation de l'œuf





# Eggshell Biomineralisation in uterus

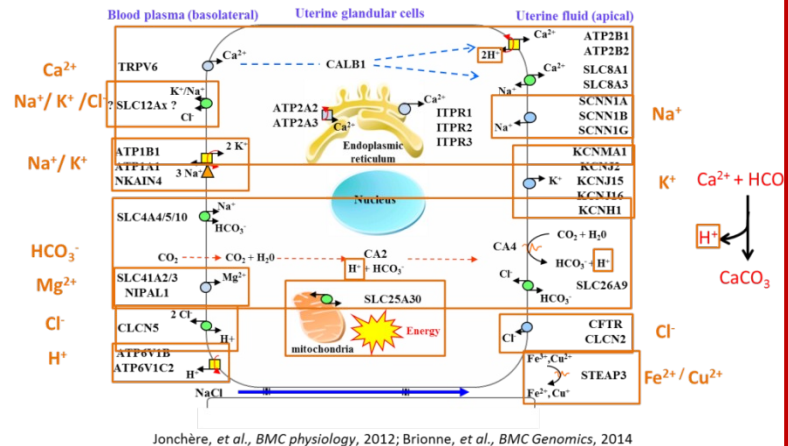


## Supply of minerals for shell mineralization

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

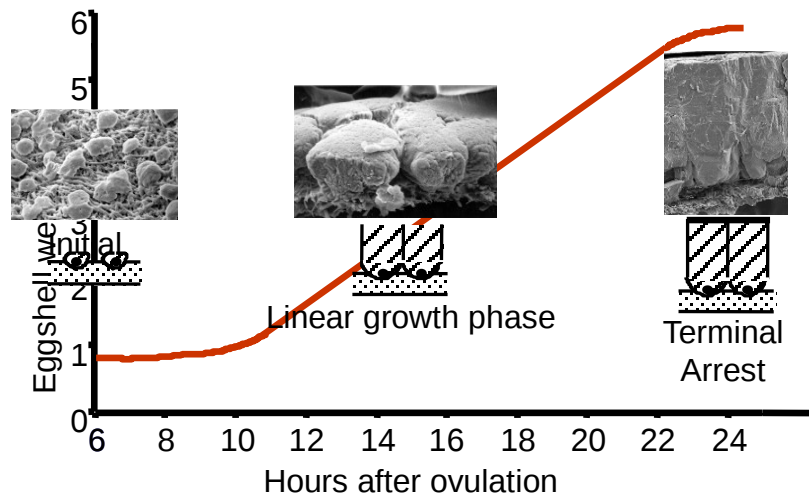
Jonchere et al., 2012, *Bmc physiology*

Brionne et al., 2014, *Bmc Genomics*



## Biomineralisation process

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



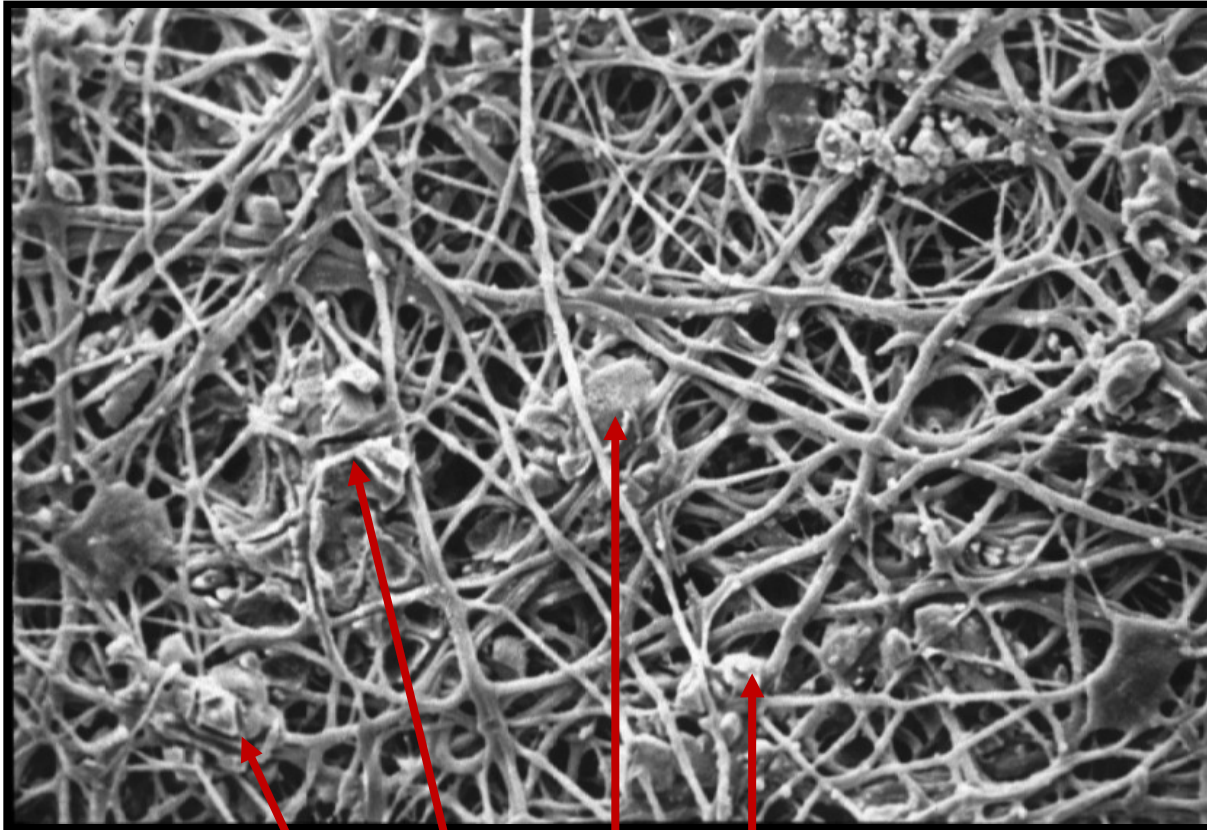
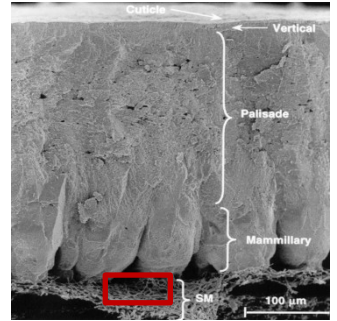
# La formation de la coquille des oiseaux, un processus de biominéralisation

- 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

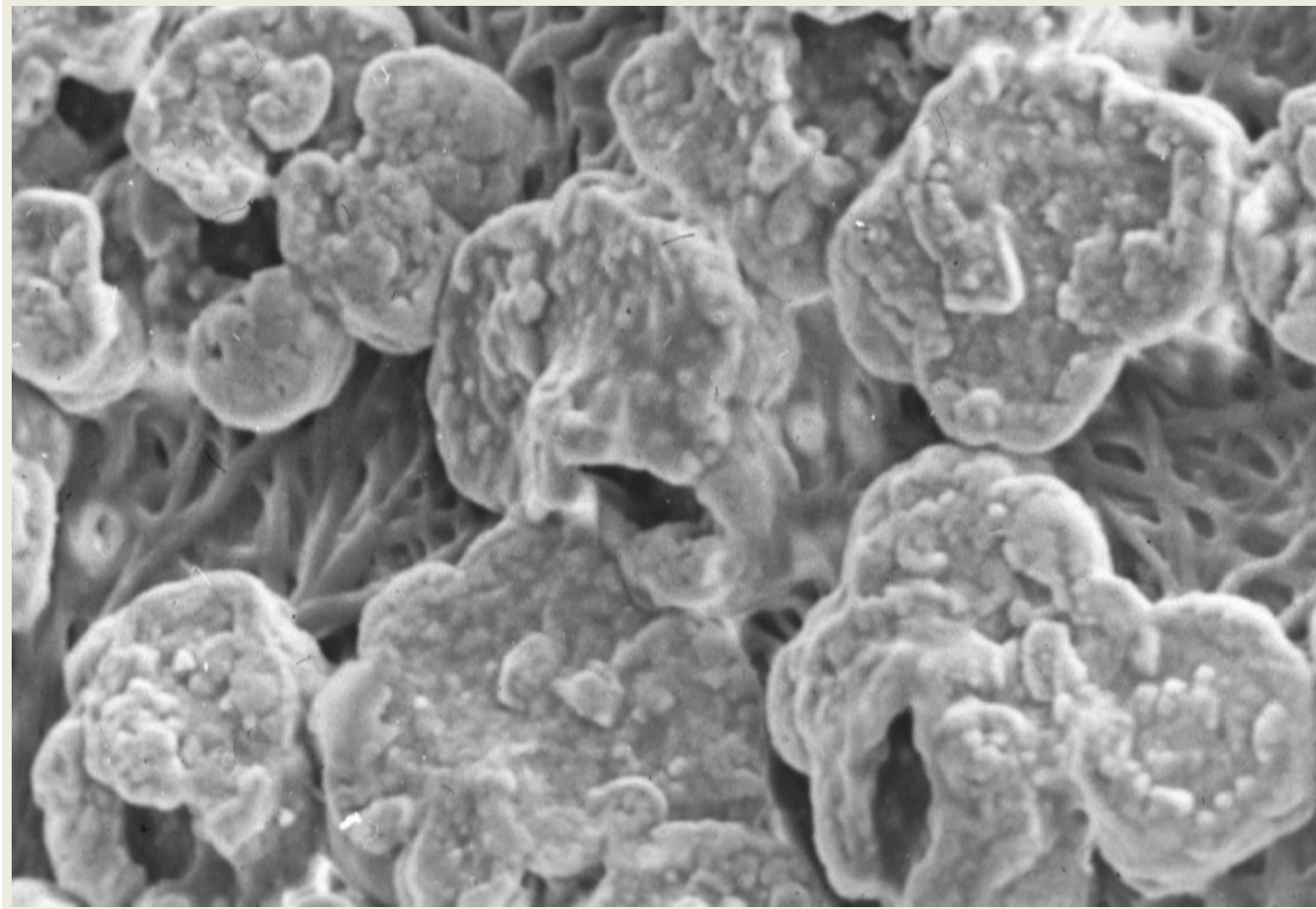
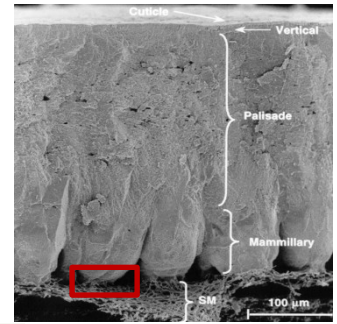
## La phase initiale



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

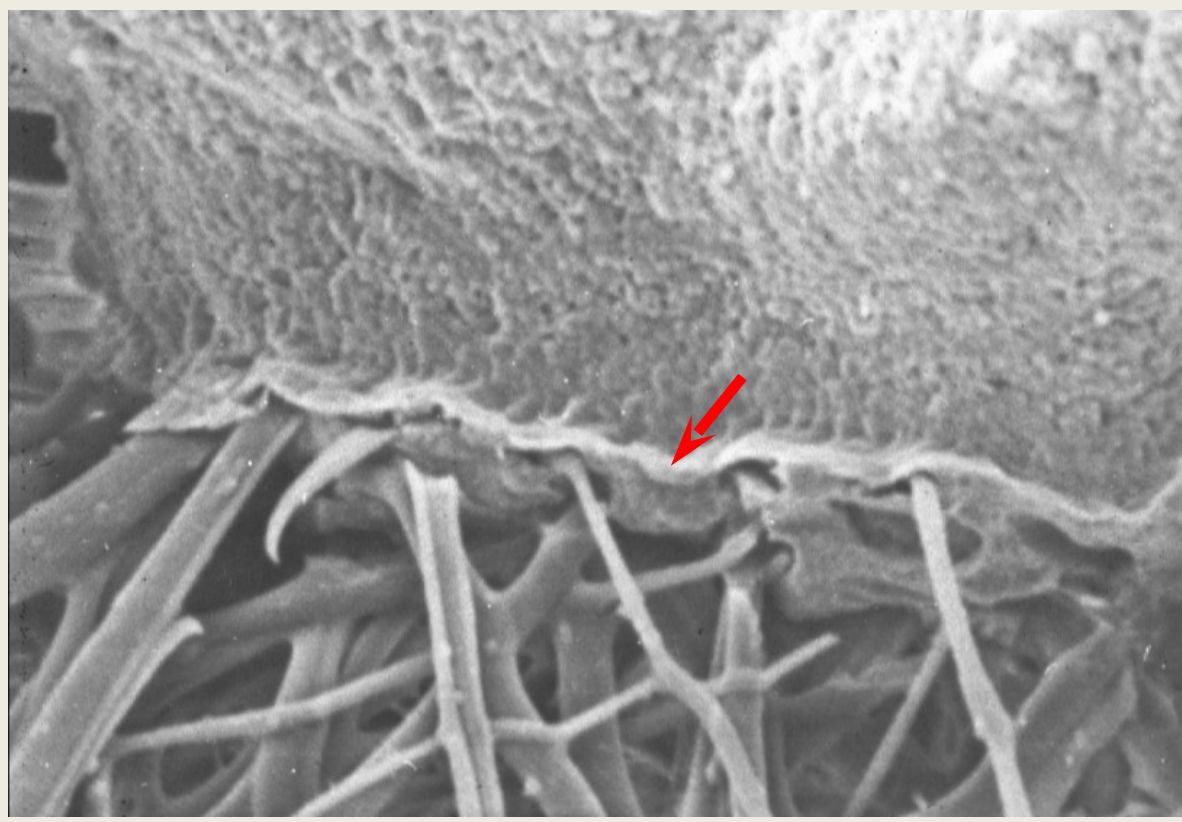
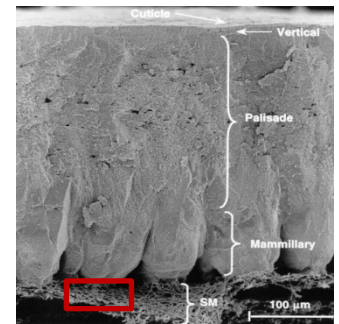
La phase initiale



Peu à peu les noyaux mamillaires sont recouverts de calcite

# La formation de la coquille

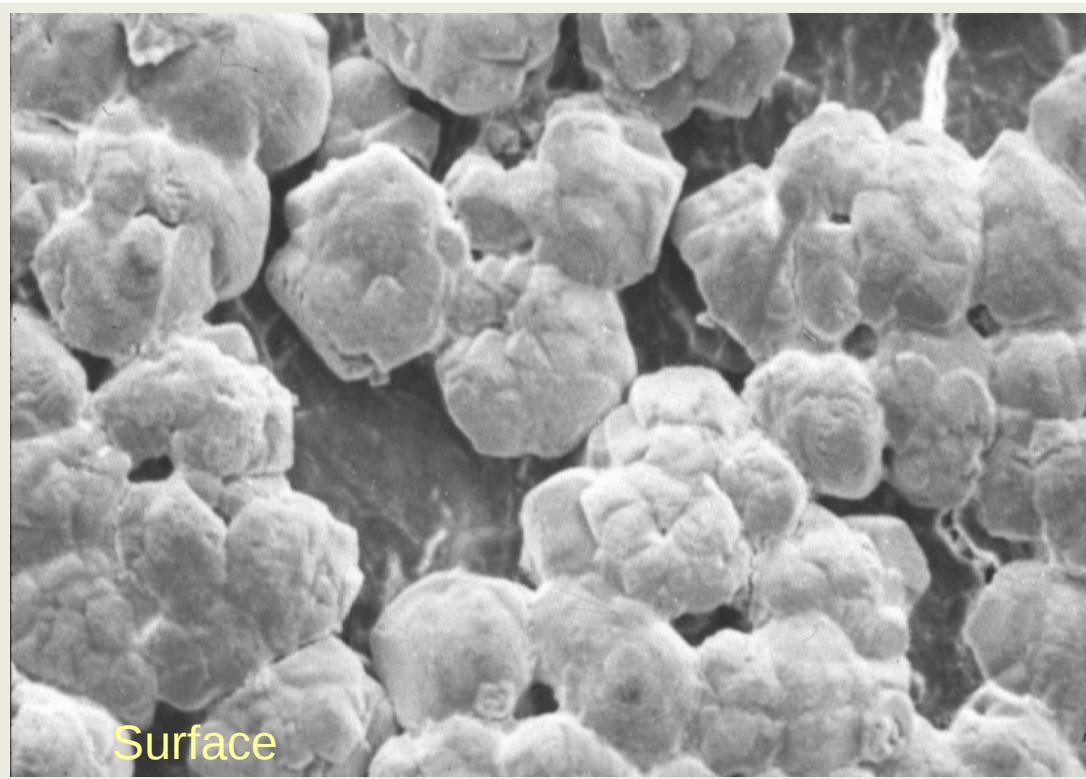
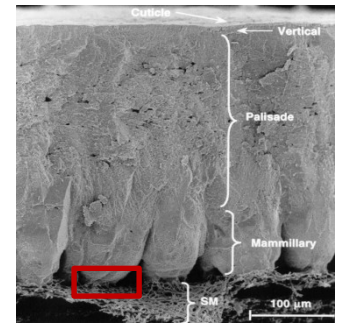
## La phase initiale



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

# La formation de la coquille

## La phase initiale

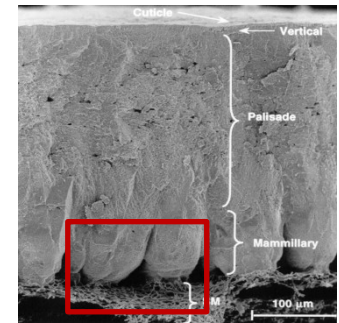
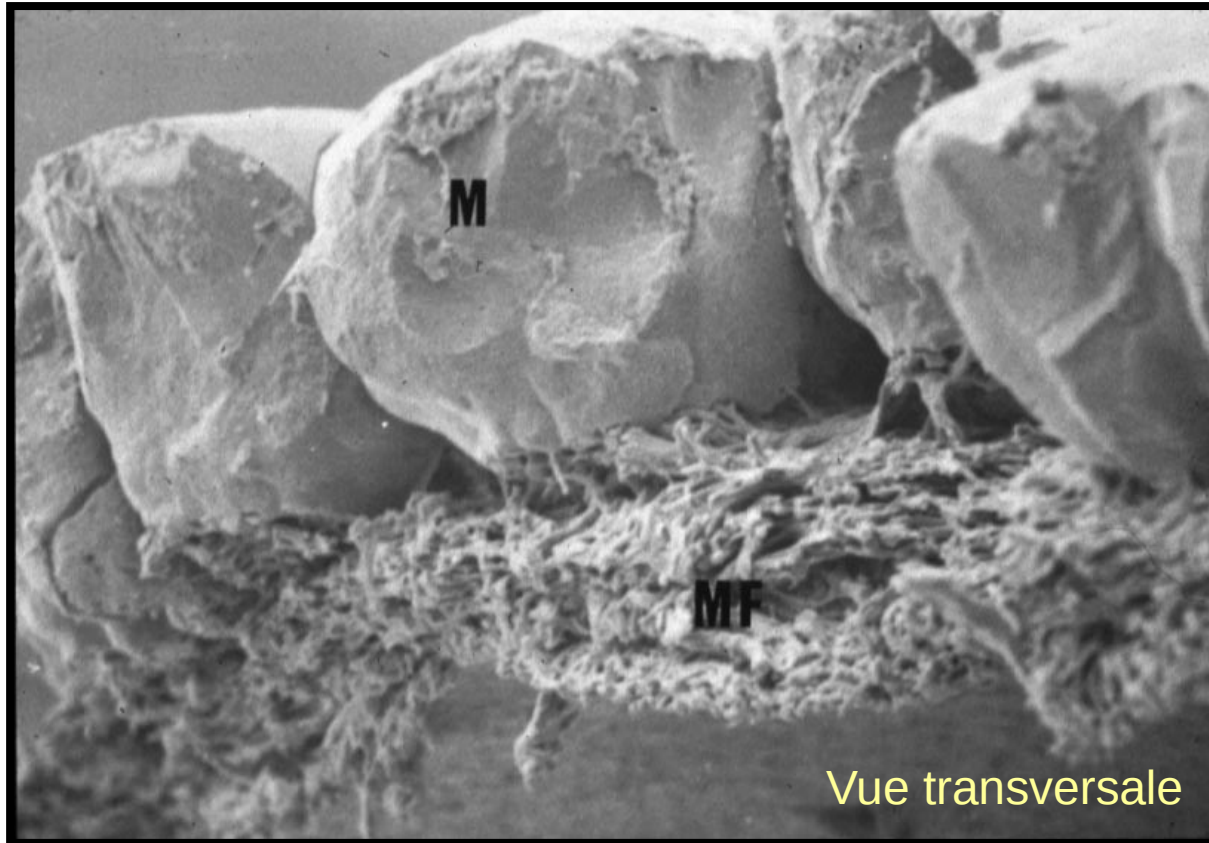


Les noyaux mamillaires recouverts de carbonate de calcium (calcite) forment des cônes qui fusionnent au fur et à mesure que la



# La formation de la coquille

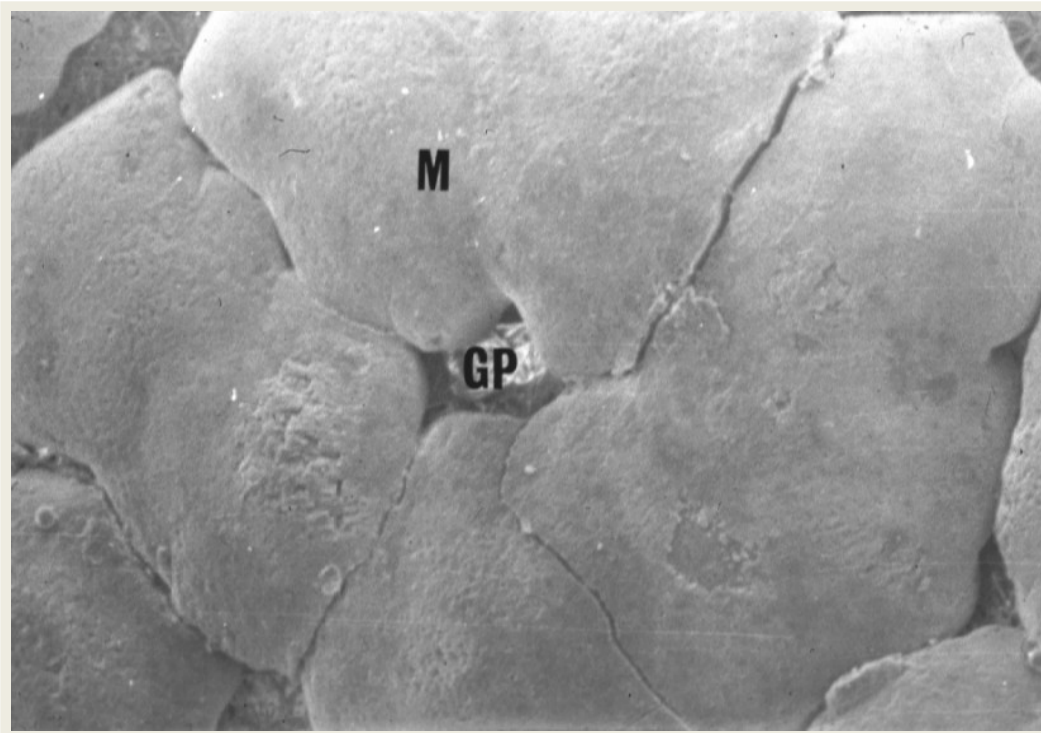
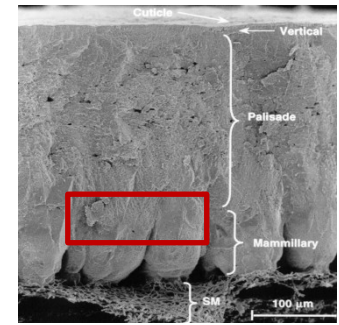
La phase de croissance



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

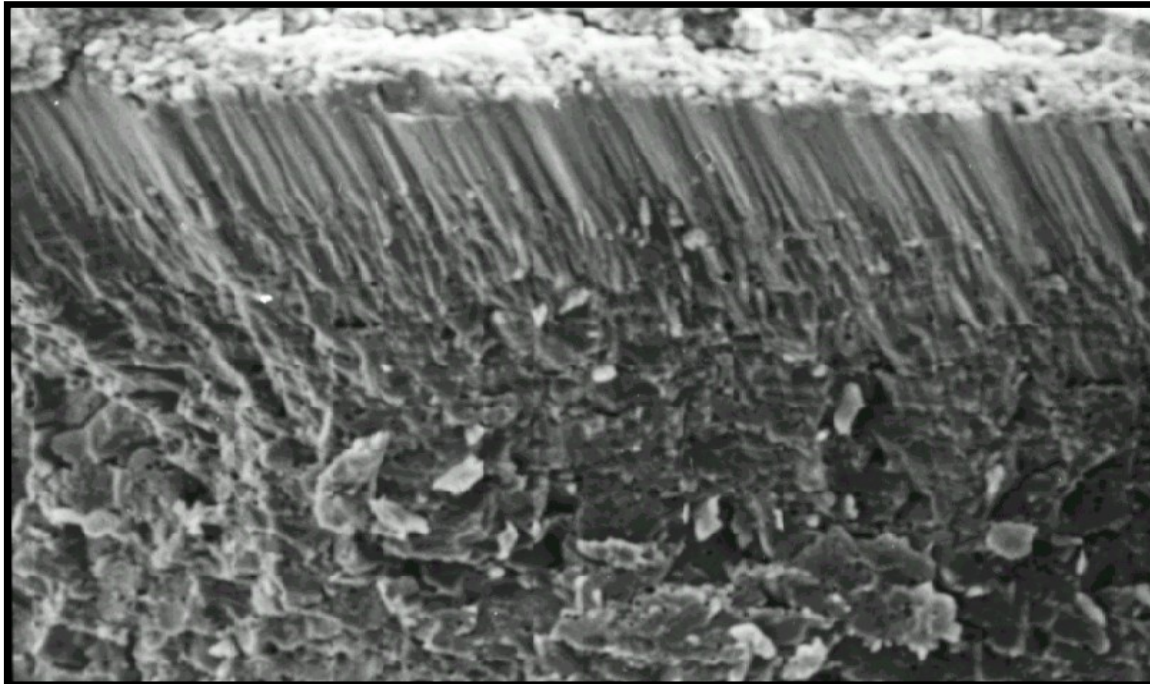
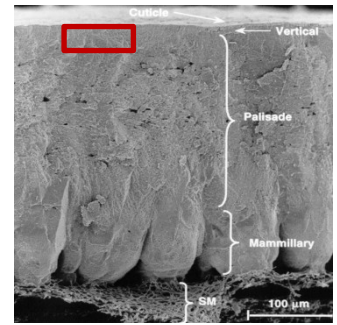
La phase de croissance



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

# La formation de la coquille

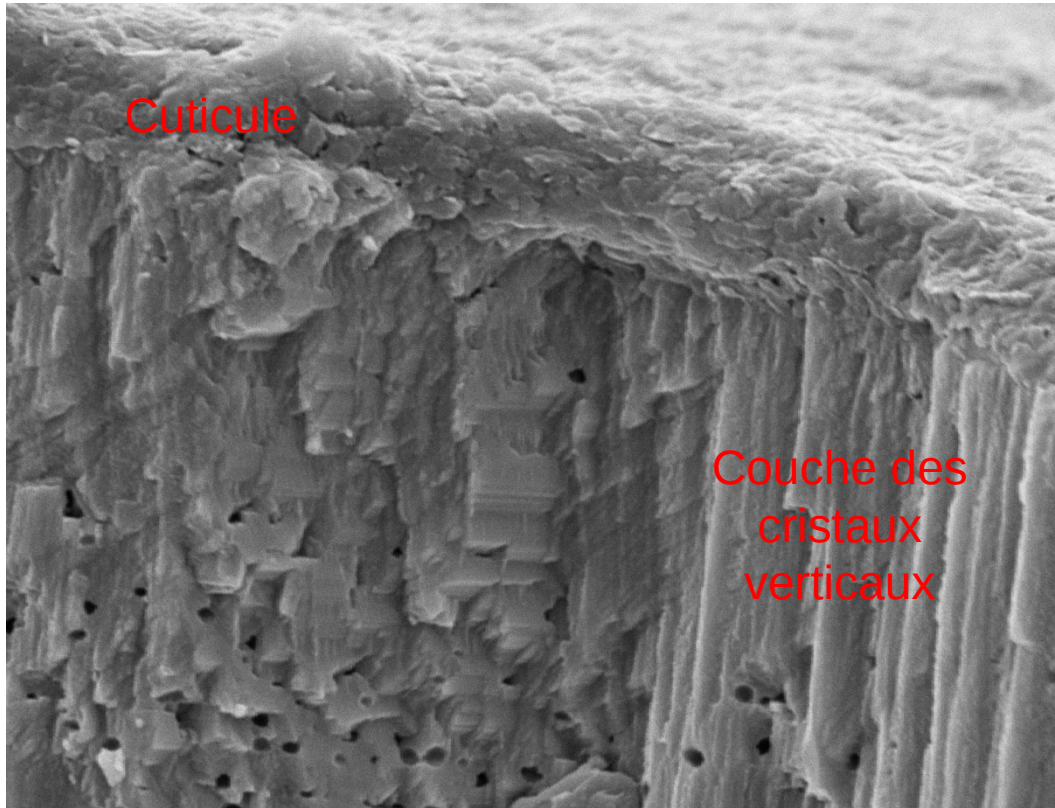
## La phase terminale



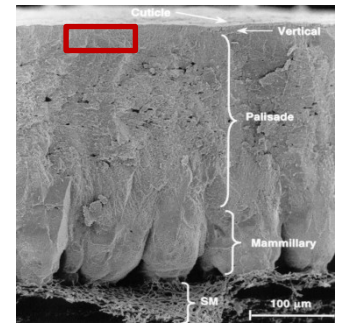
En surface de la couche calcifiée apparaît une couche monocristalline de calcite (Couche des cristaux verticaux)

# La formation de la coquille

## La phase terminale



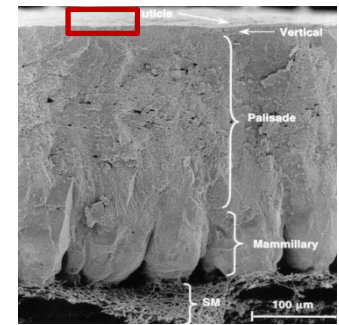
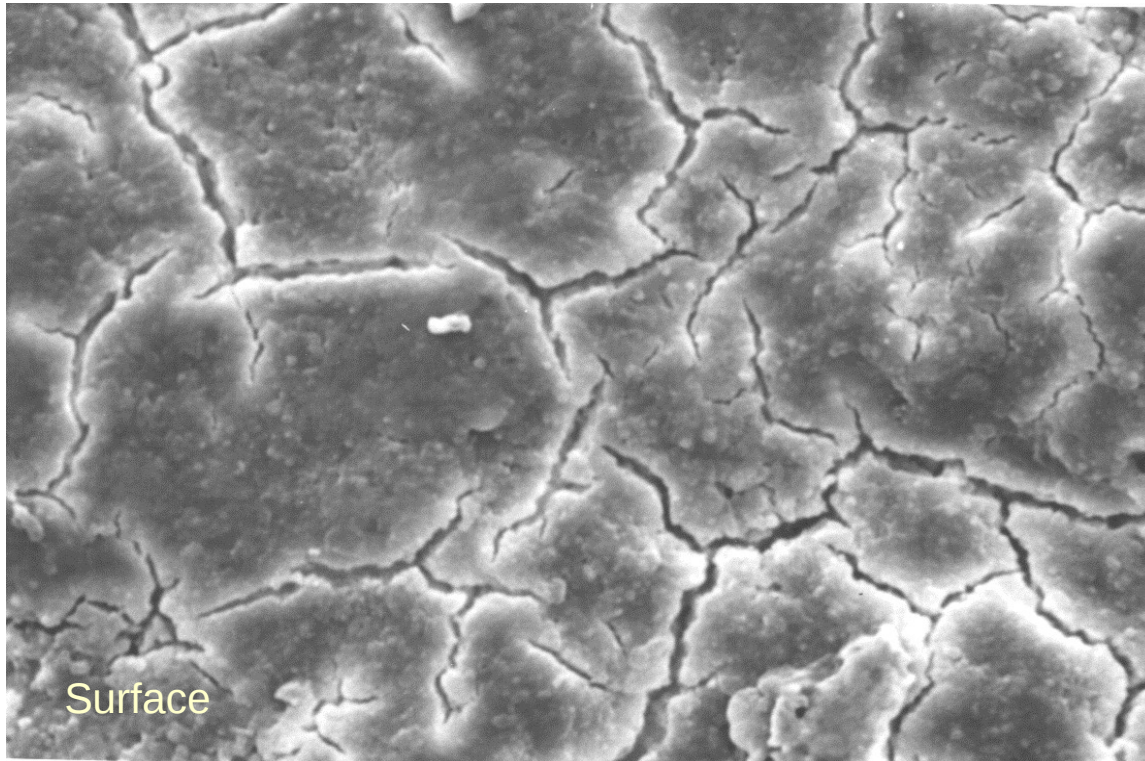
La minéralisation s'arrête. Une fine couche de matière organique vient se déposer en surface (cuticule)





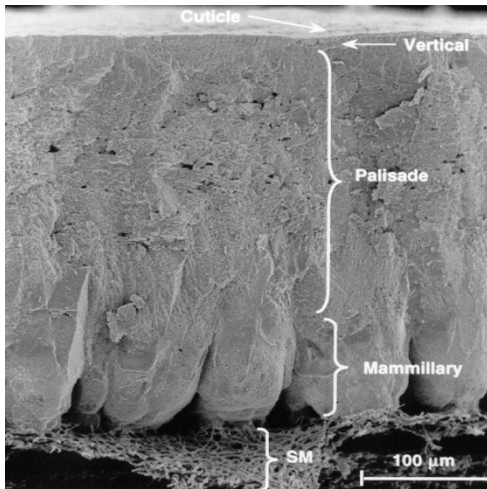
# La formation de la coquille

## 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*

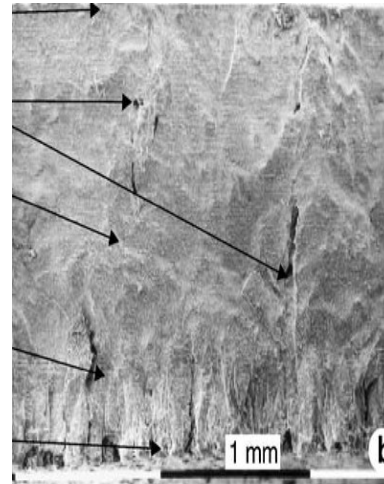
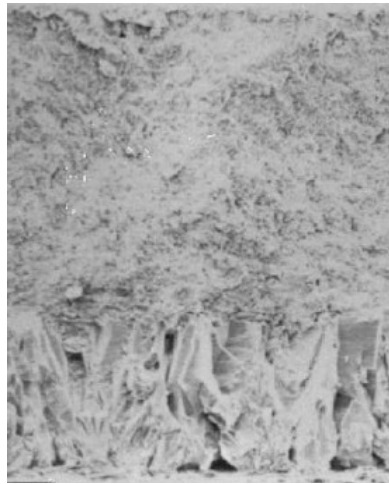
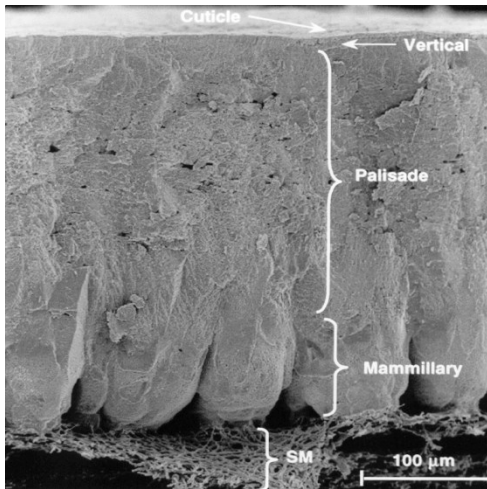


*Anas platyrhynchos*



# Similitude des coquilles d'œufs

## □ PROCESSUS DE BIOMINÉRALISATION UNIVERSEL



*Gallus gallus*



*Numida meleagris*



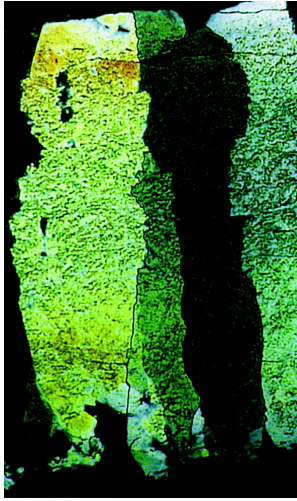
*Struthio*



*Sankofa pyrenaica*

# La formation de la coquille, un processus de biominéralisation

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



*Gallus gallus*



*Meleagris gallopavo*



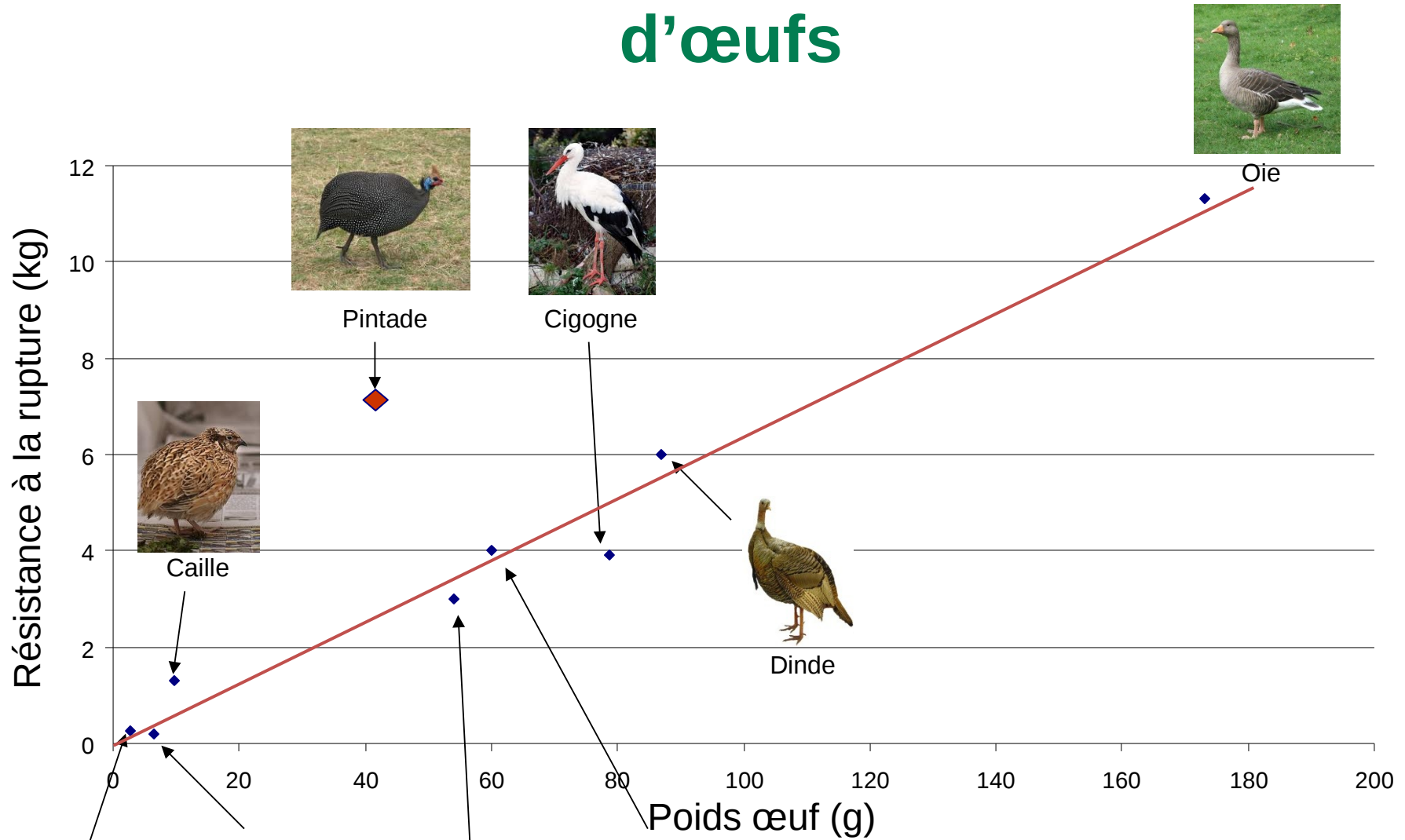
*Numida meleagris*



*Sankofa pyrenaica*



# Propriétés biomécaniques des coquilles d'œufs



Moineau



Merle noir



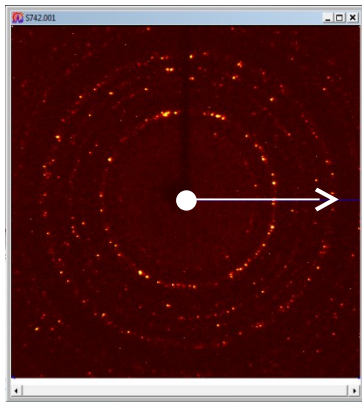
Canard



Poule

# La formation de la coquille

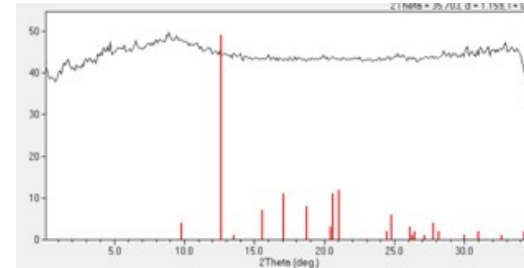
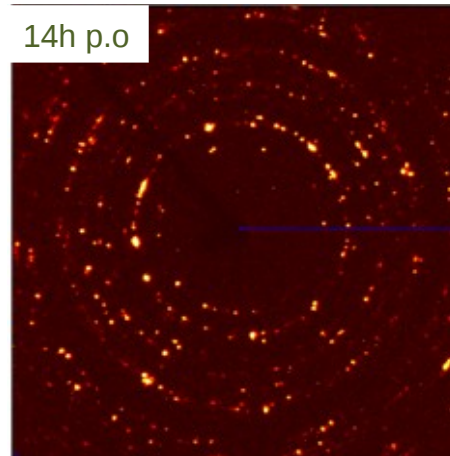
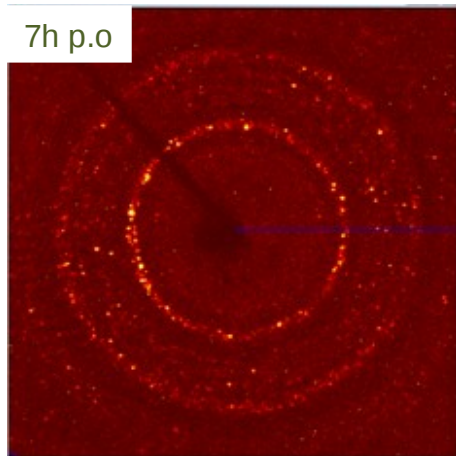
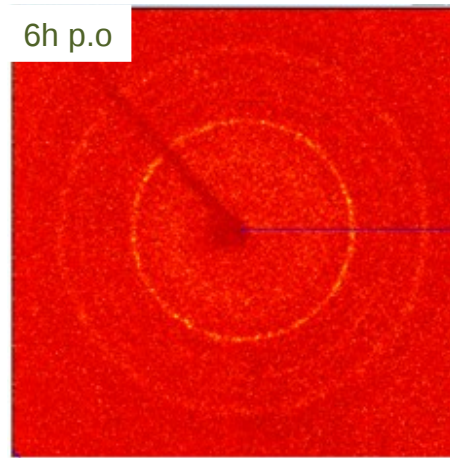
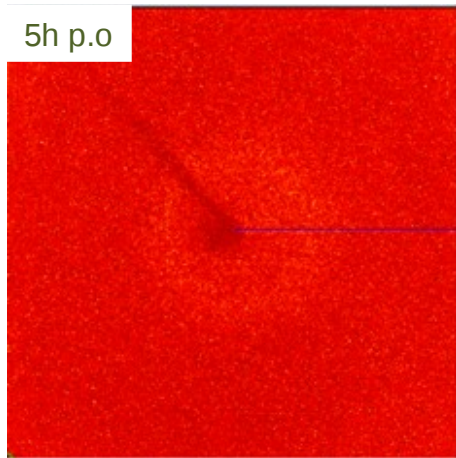
- **XRD 2D (X-Ray Diffraction)** (détermination quantitative du polymorphe cristallin présent)



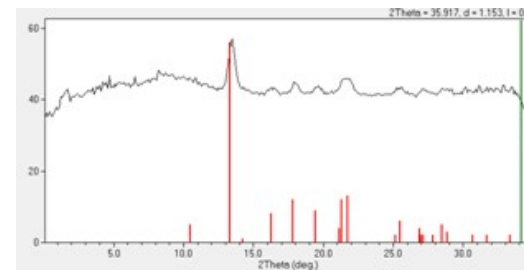
L'angle de diffraction est spécifique du type polymorphique du cristal (ici calcite)

# La formation de la coquille

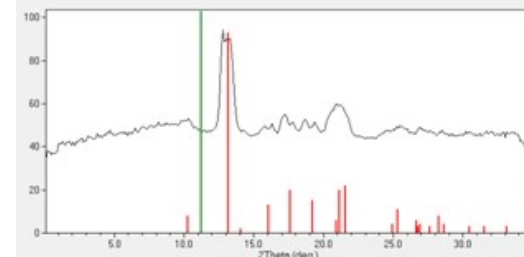
- **XRD 2D (X-Ray Diffraction)** (détermination quantitative du polymorphe cristallin présent)



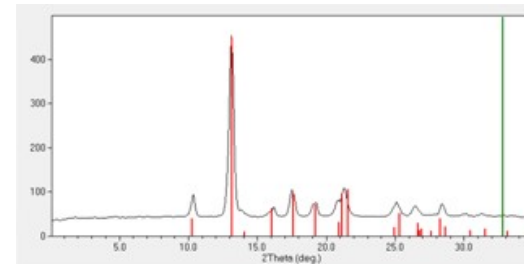
5h p.o :  
pas de  
cristal



6h p.o :  
cristallisation  
très faible



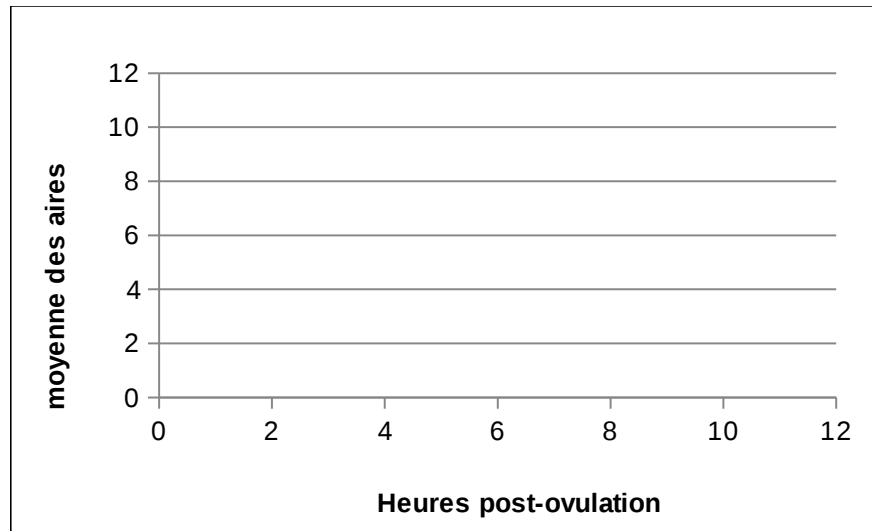
7h p.o :  
cristal plus  
organisé



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 précoces (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

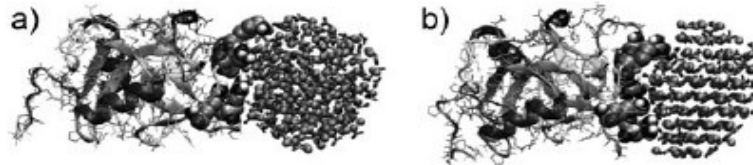
Angewandte  
International Edition  
Chemie

DOI: 10.1002/anie.201000679

**Biomínéralization**

### Structural Control of Crystal Nuclei by an Eggshell Protein\*\*

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

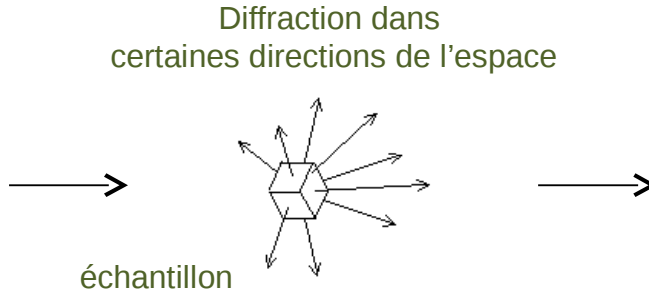


**Figure 1.** Ovocleidin-17 bound to an amorphous (a) and a crystallized (b) calcium carbonate nanoparticle containing 192 formula units. The

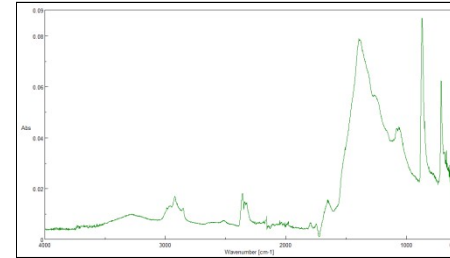
# La formation de la coquille

## quantification du ratio $\text{CaCO}_3$ cristallin/ $\text{CaCO}_3$ total (FTIR)

Faisceau IR incident



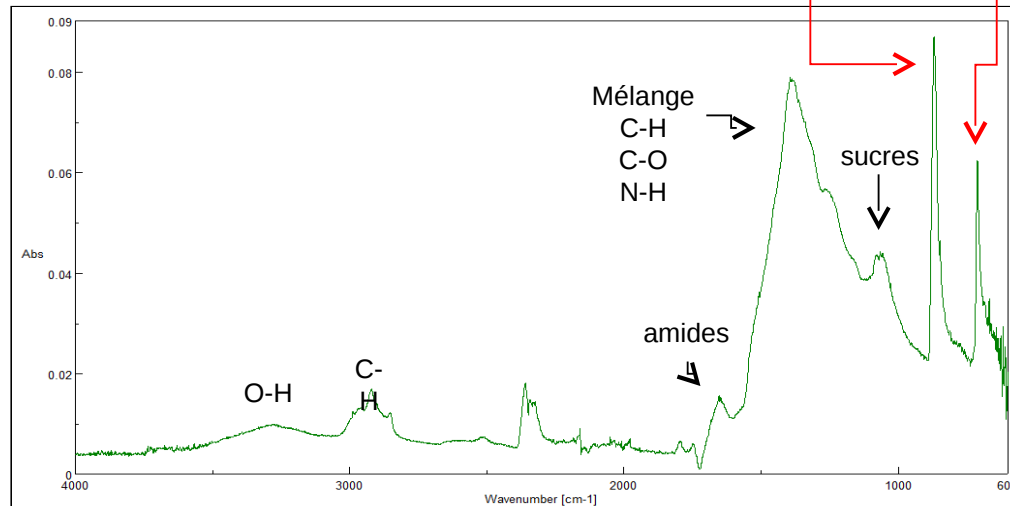
Spectre IR



Diffraction des IR en fonction des liaisons chimiques présentes

carbonate de calcium total (amorphe et cristallin) T

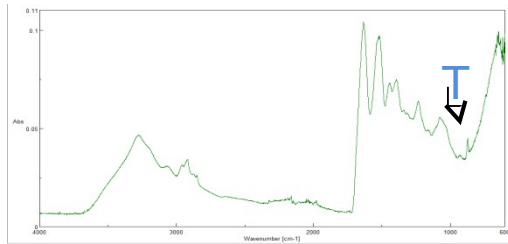
calcite C



# La formation de la coquille

quantification du ratio  $\text{CaCO}_3$  cristallin/ $\text{CaCO}_3$  total (FTIR)

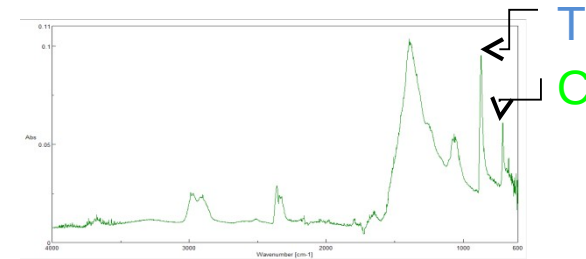
5h p.o



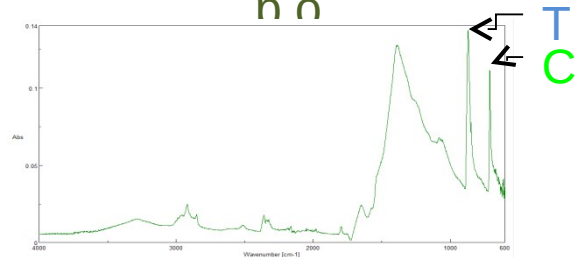
6h p.o



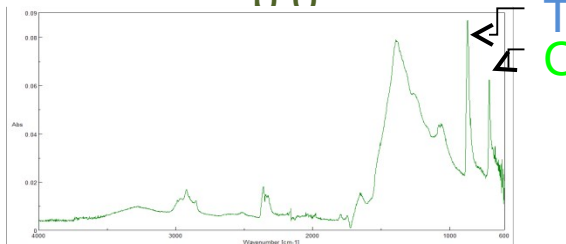
7h p.o



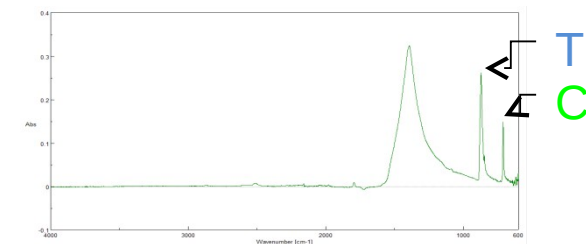
14h  
n o



16h  
n o

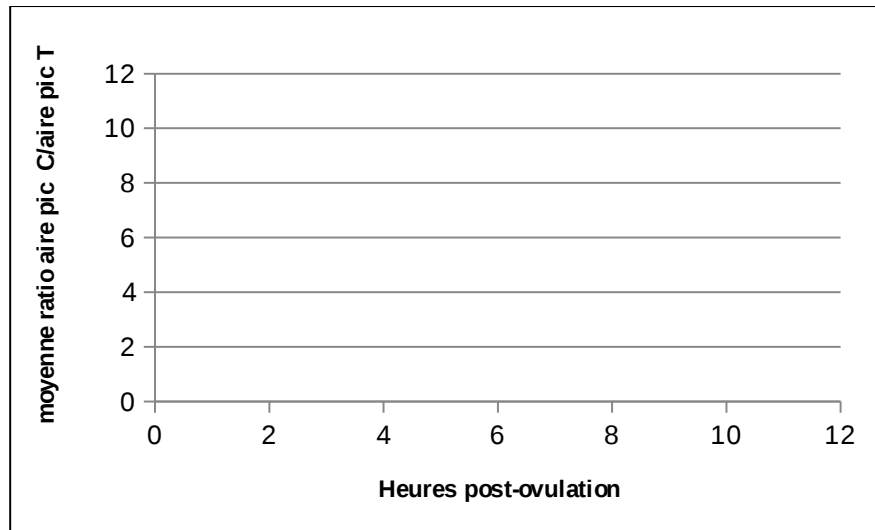


calcite pure



# La formation de la coquille

quantification du ratio  $\text{CaCO}_3$  cristallin/ $\text{CaCO}_3$  total (FTIR)



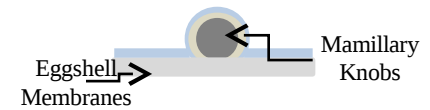
- ✓  $\text{CaCO}_3$  amorphe (ACC) aux stades précoces, mais une certaine orientation (proto-calcite)
- ✓ Augmentation du ratio aire pic C/aire pic T, qui traduit une transformation graduelle de l'ACC en calcite à tous les stades

# La formation de la coquille

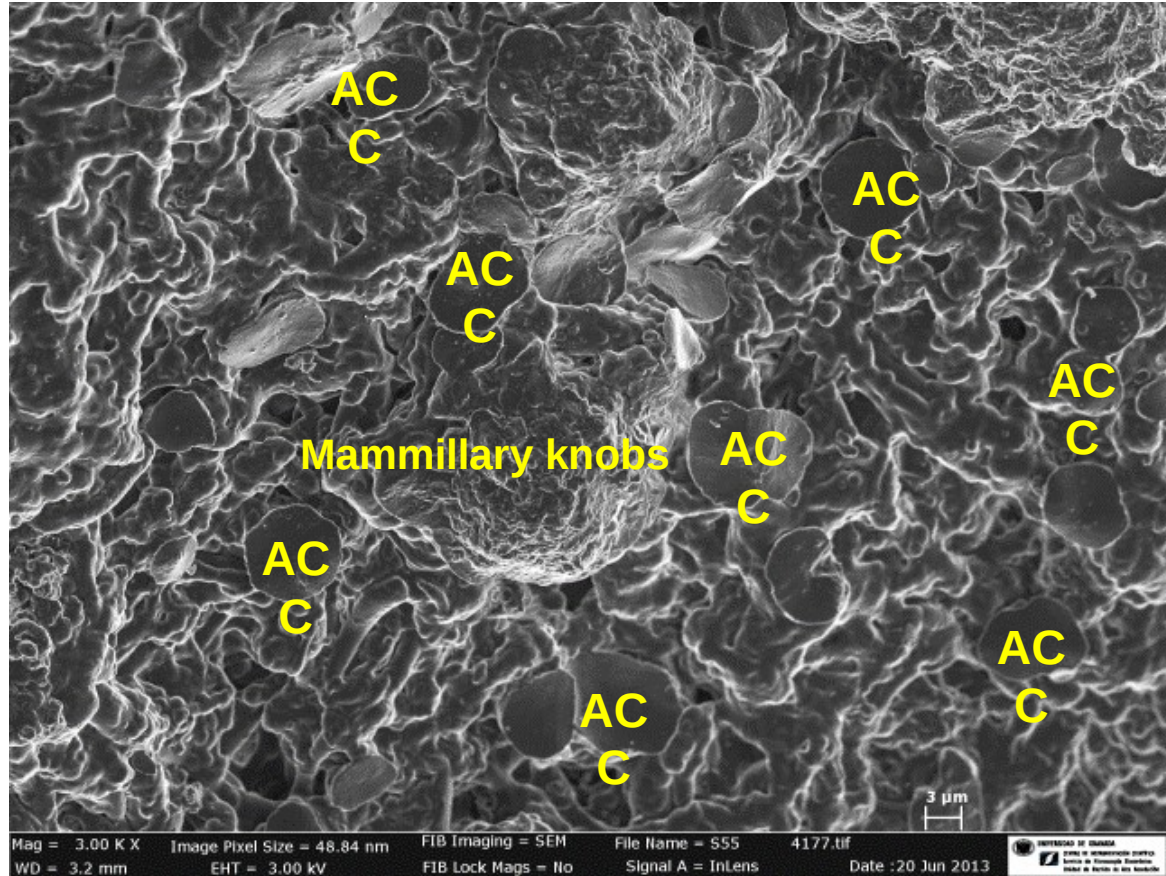
## Role of amorphous calcium carbonate (ACC)



### First nucleation events



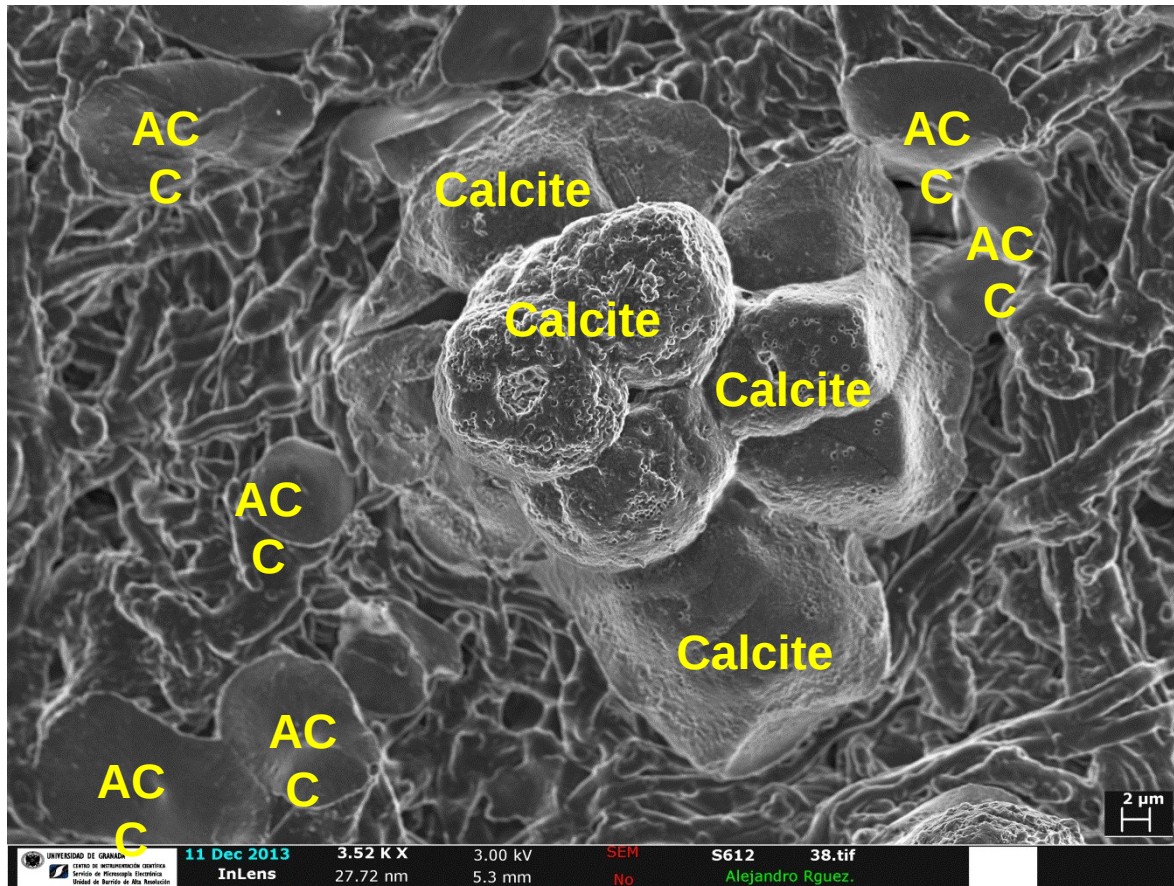
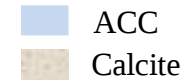
**Time 1 (5-6 h Post ovulation):**  
ACC particles nucleate on the whole eggshell membranes.  
Form massive deposits





# La formation de la coquille

## Role of amorphous calcium carbonate (ACC)



### Calcite formation

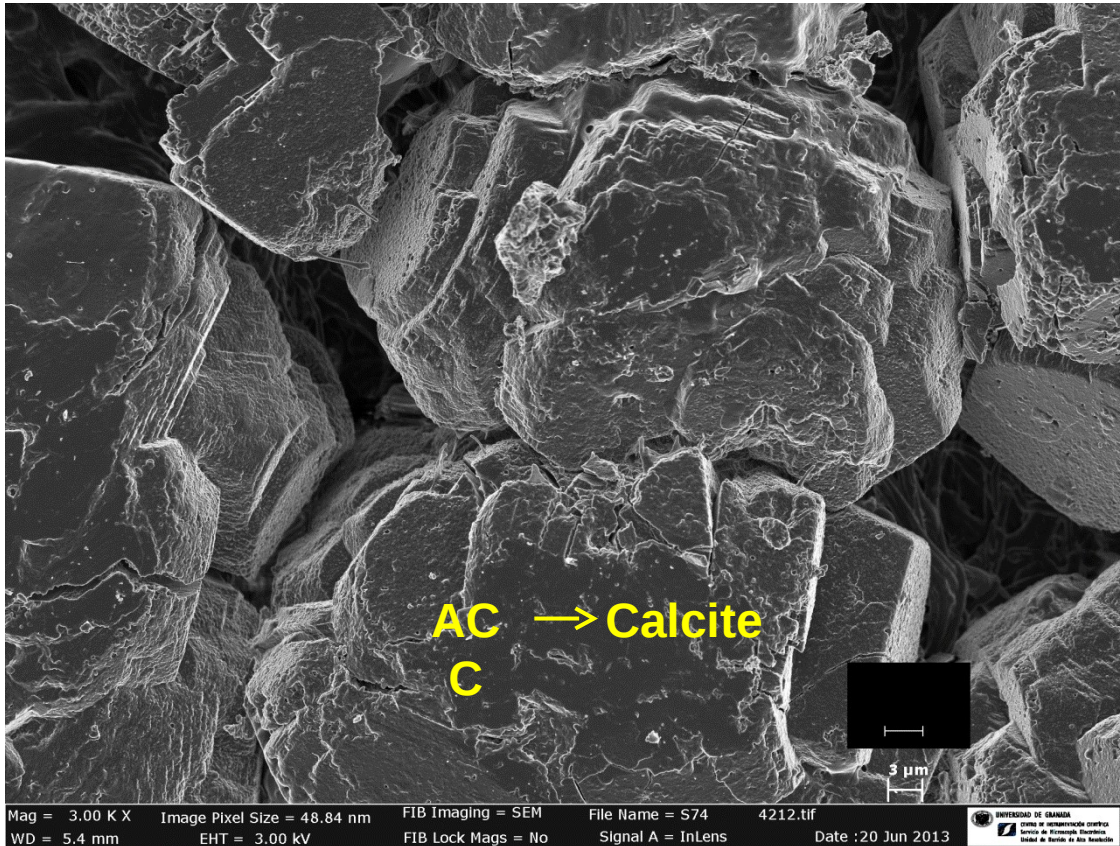


**Time 2 (6-7 h post ovulation):** Interface-coupled dissolution precipitation process

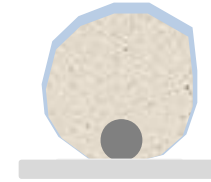
Direct transformation of ACC into calcite aggregates on mammillary knobs

# La formation de la coquille

## Role of amorphous calcium carbonate (ACC)



Large calcite crystal units deposition



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

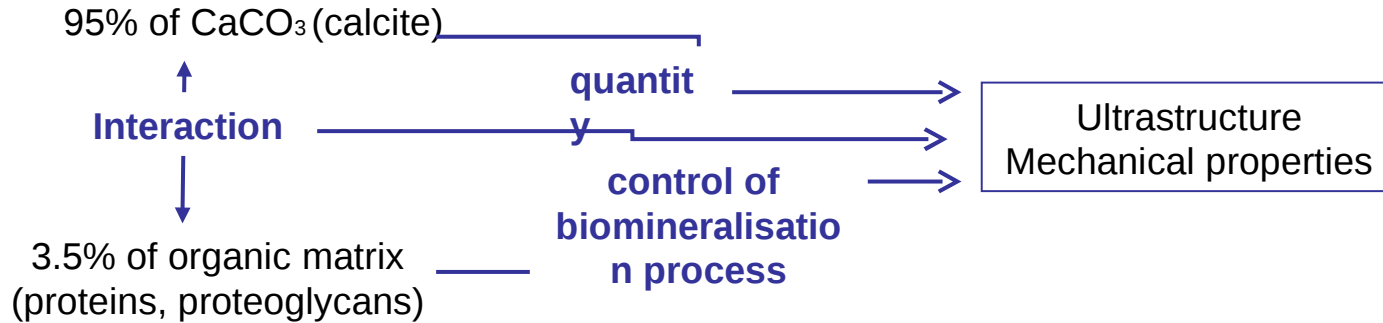
# Rôle de la matrice organique



# La matrice organique

## ✓ Organic matrix plays a key role

*determine the texture of the shell and its resulting mechanical properties*

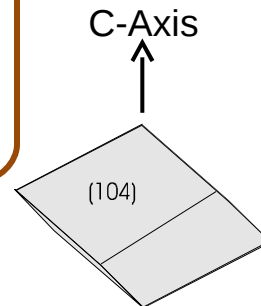


Calcium carbonate (calcite)

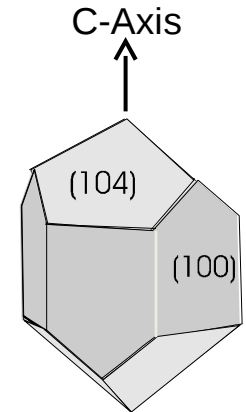


Organic matrix

***Orientation and stabilisation of calcium carbonate polymorphs  
Drive the calcite morphology***



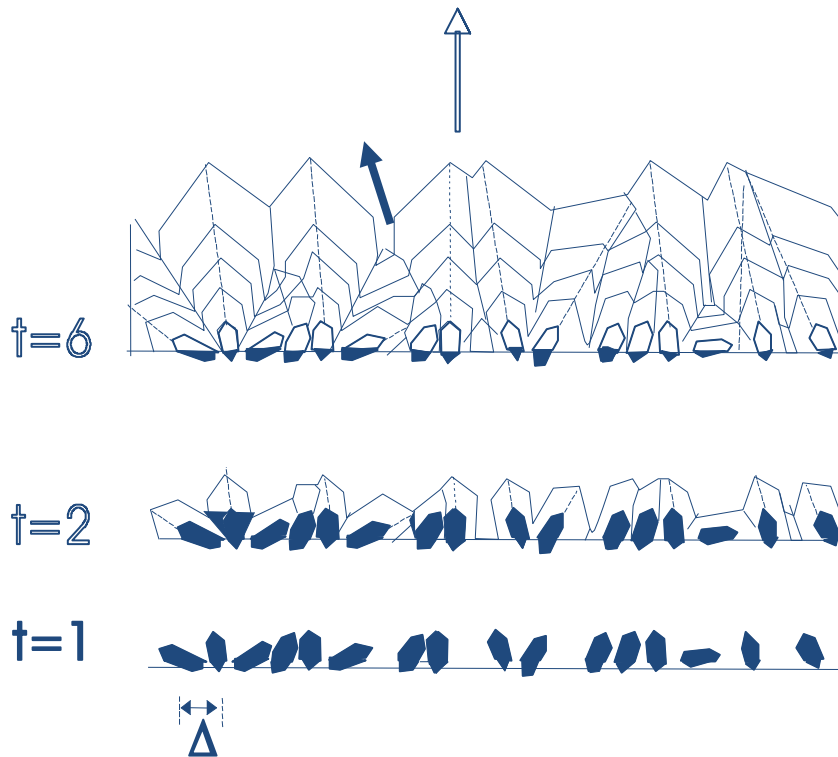
Interaction



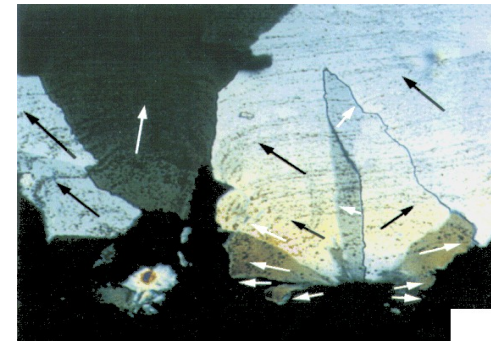
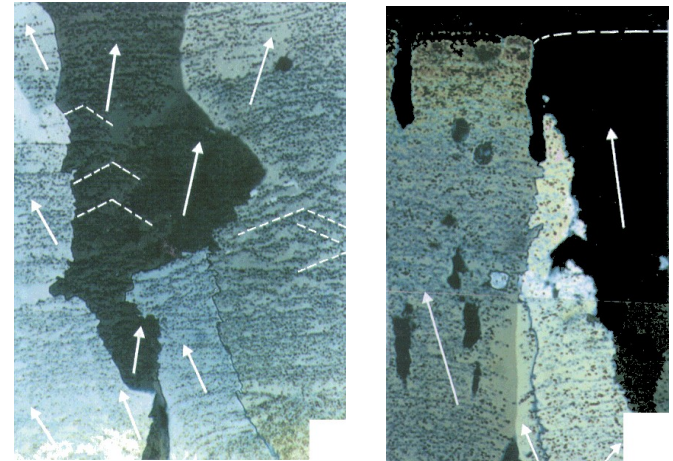
# La matrice organique

## Détermine la microstructure du biomatériau

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

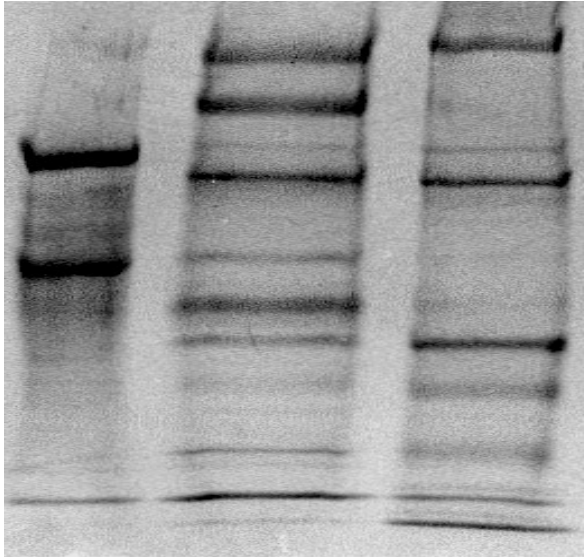


Rodriguez-Navarro et al., 2000; Nys et al., (2004)



Images: J.M. Garcia-Ruiz, Granada

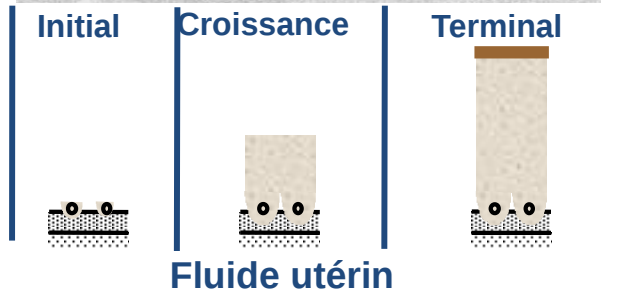
# Protéines de la matrice et minéralisation de la coquille



Composition variable du fluide utérin au cours du processus de calcification



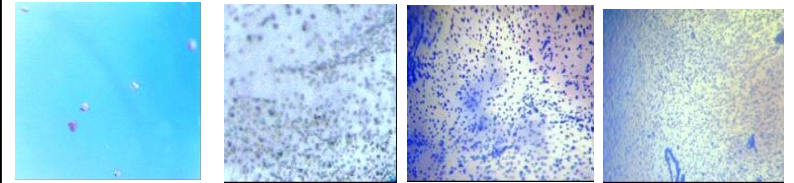
Adaptation du contenu organique selon le stade de minéralisation



# Protéines de la matrice et minéralisation de la coquille

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

**Augmente le nombre de cristaux**



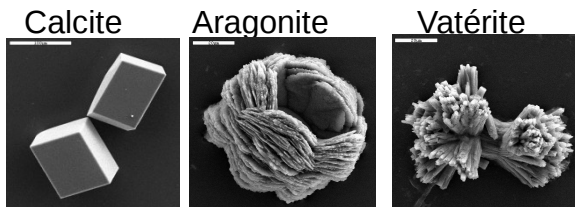
Témoins  
40 cristaux

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

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

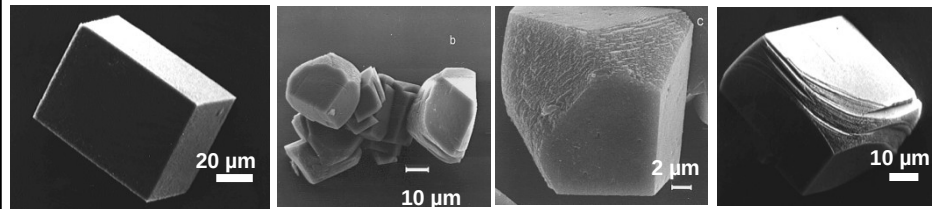
(*Poultry Sci.*, 2000, 79, 901-907 ; *J. Crystal Growth*, 2008, 310, 1754-1759 ; *Cryst. Growth. Des.*, 2008, 8, 4330-4339)

**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**



Témoin

Initiale

Croissance  
**Fluide utérin**

Terminale

Identification des protéines de la matrice organique



# Identification des protéines de l'œuf

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

## Les techniques classiques

‣ Biochimie (Fractionnement des composés de l'œuf par chromatographie, électrophorèses...) et biologie moléculaire (banque cDNA, EST ...)

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

# Les protéines de la matrice organique

## 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**

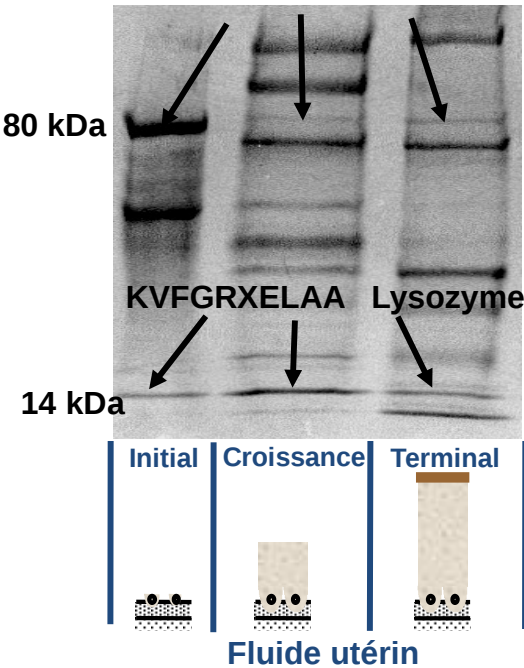
**L'ovocalyxine-25**

**L'ovocalyxine-21**

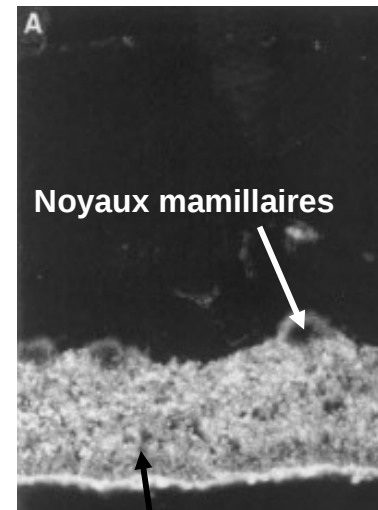
# Les protéines préalablement identifiées dans le blanc d'œuf

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

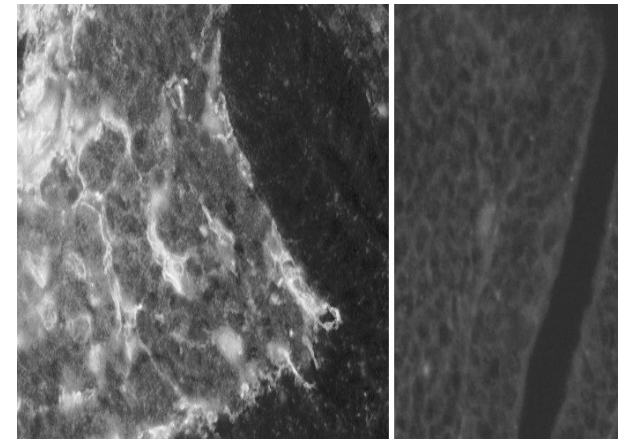
APPKSVIRXXTISS Ovotransferrine



Localisation du lysozyme dans la coquille



Origine utérine de l'ovotransferrine



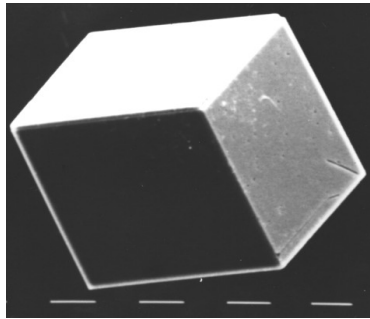
- **Présentes dans la coquille**
- **sécrétées par les tissus où se forme la coquille**

# Les protéines préalablement identifiées dans le blanc d'œuf

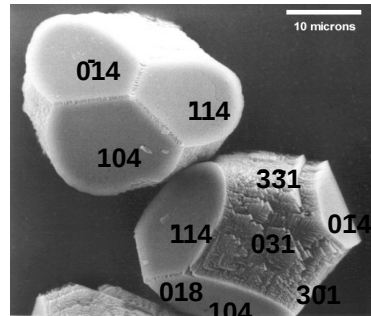
□ **lysozyme** (*Matrix Biol.*, 2000, 19, 443-453) **et ovotransferrine** (*Connect. Tissue. Res.*, 2001, 42, 225-267)

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

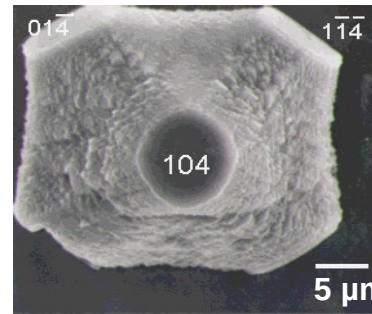
**Interaction avec le carbonate de calcium**



**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**

# 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**

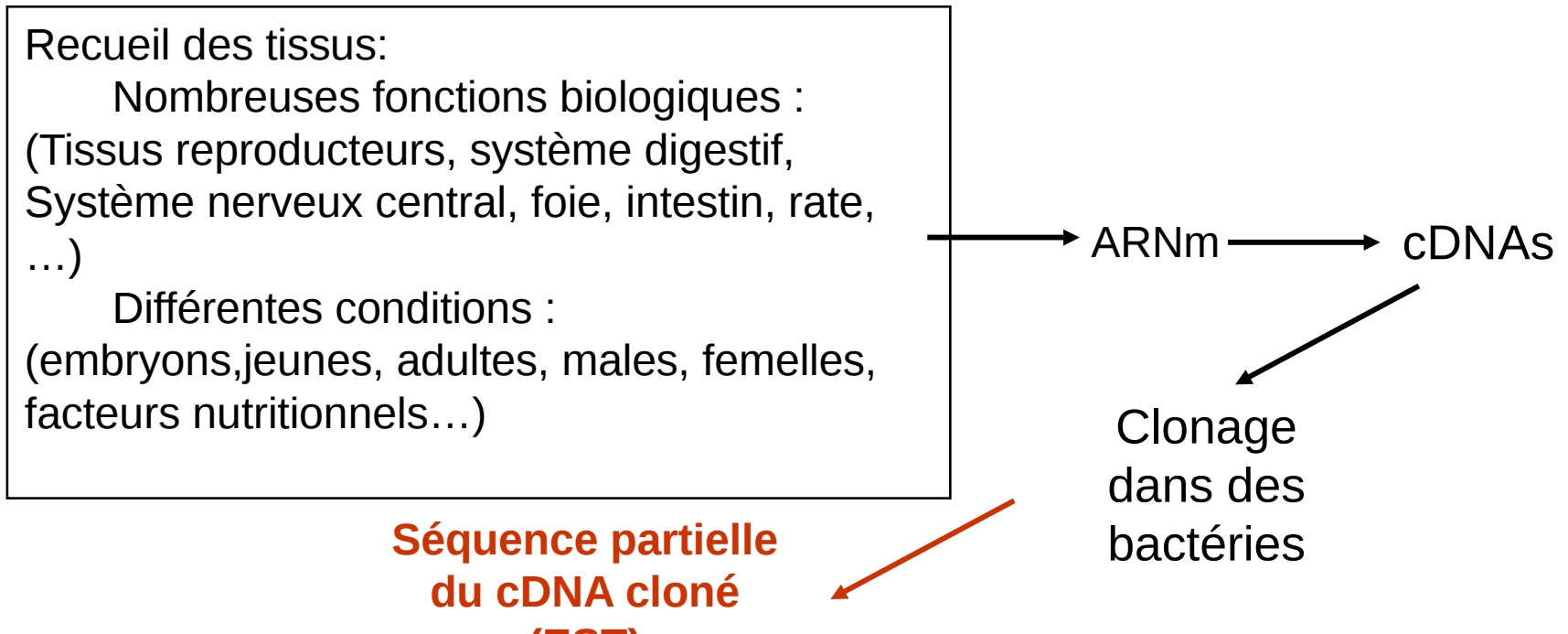
## Utilisation des banques EST

Le but

- \* Identifier les gènes fonctionnels

Méthode

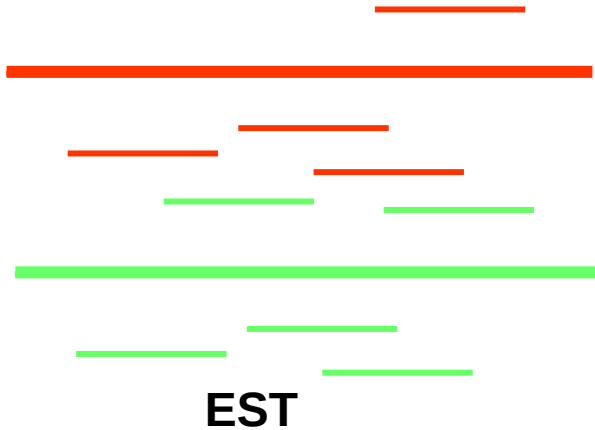
- \* Un catalogue compréhensible de l'ensemble des séquences d'un organisme ou d'un tissu spécifique ou d'une fonction biologique





# Les protéines spécifiques de la coquille

## Utilisation des banques 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](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](http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Gallus_gallus/index.html))

# Les protéines spécifiques de la coquille

## Utilisation des banques EST

Séquençage des Protéines et traduction en nucléotides

### Protein sequencing of OCX-32

#### N terminal sequence

ERLPWPQVPGVMHPLNPKHREAV

#### Internal peptide sequences

CB3	GLAIVGSSH(I)
CB4	YLV
	ERLPW
K1	X(O)IRK
K2	(G)NF
K3	KSPXVVHAK
K4	DNAVAFK
K5	X(O)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)

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

# Les protéines spécifiques de la coquille

## Utilisation des banques EST

Séquençage des Protéines et traduction en nucléotides

### Protein sequencing of OCX-32

#### N terminal sequence

ERLPWPQVPGVMHPLNPKHREAV

#### Internal peptide sequences

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

Traduction en séquences  
nucléotidiques  
(code dégénéré)

Recherche dans les bases de données  
Banques de séquences EST (tblastN)

Identification des séquences EST  
correspondantes

# Les protéines spécifiques de la coquille

## Utilisation des banques EST

Séquençage des Protéines et traduction en nucléotides

\* Full length cDNA sequence



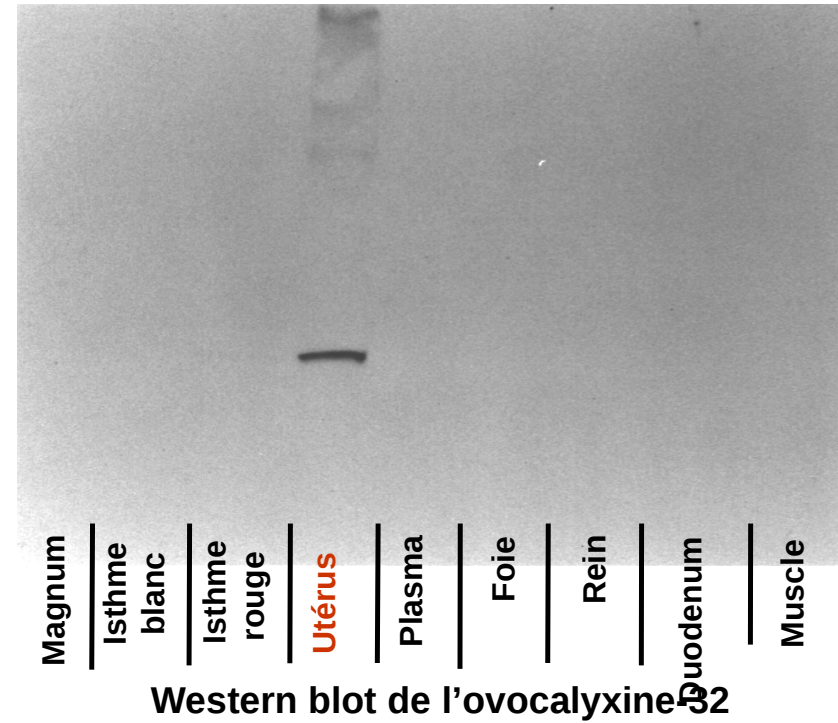
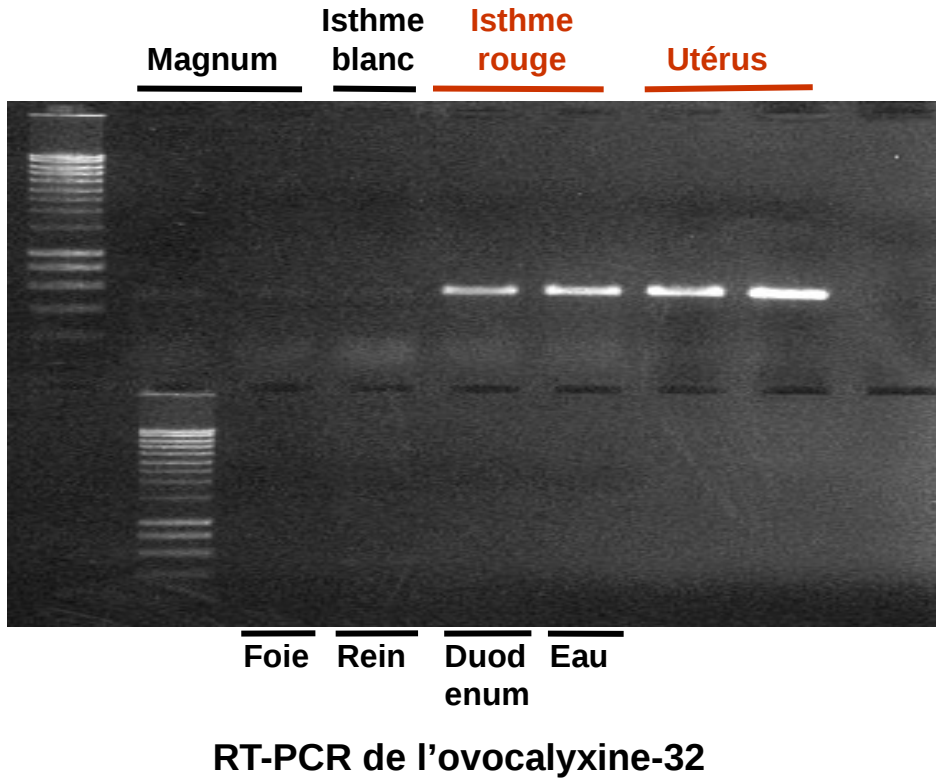
*Amino acid translation*

**EFGTSAAERLPWPQVPGVMRPLNPSHREAVWAAWTALHYINSHEASPSRP  
LALHKVVKAASKMIPRLGWKYYVHCTTEGYIHGENAGSCFATVLYLKKSP  
PVVHGKCVHAQNKKQIQEEDHRFYEYLQHQQKPITANYIPDSNGNIAHDH  
LQLWGLAIVGSSYIMWKQSTEHTGYLLAQVSSVKQQIRKDNAVAFKFIVL  
LHEIPTQQLNVCHMYLVWTLGHPIRVKYSCAPDNHGLEDSGQDSGSAAG  
TSHETKGNF**

# 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**



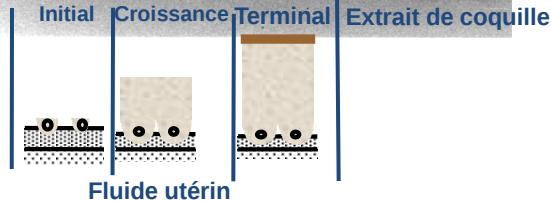
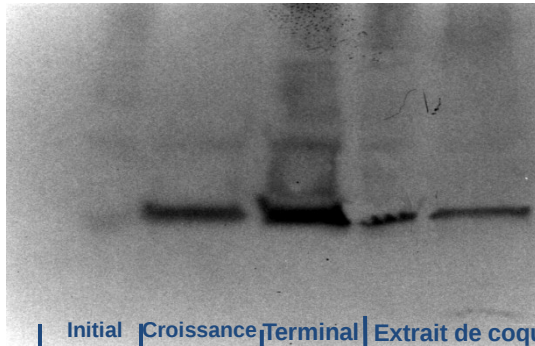


# Les protéines spécifiques de la coquille

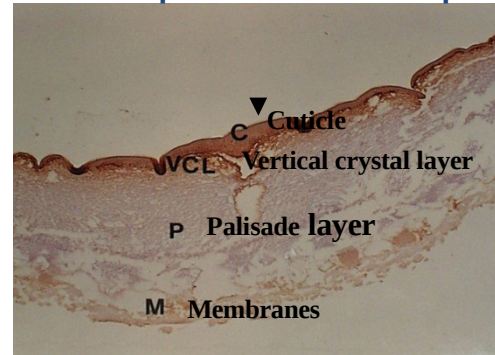
## □ **Ovocalyxine -32** (*J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 39243-39252) **(3/3)**

### ➤ **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

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\*

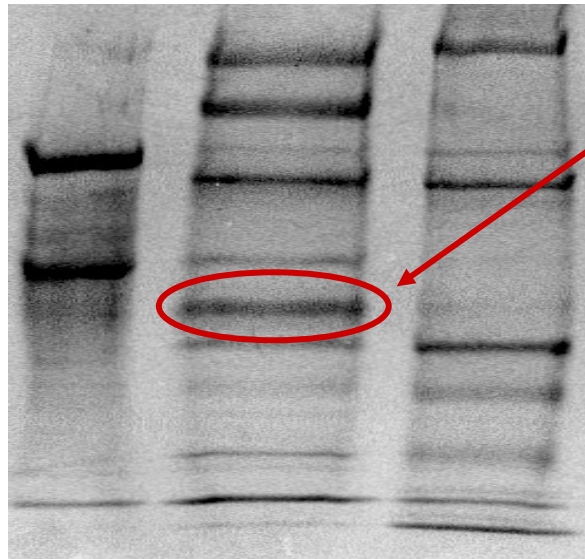
Received for publication, November 3, 2006, and in revised form, December 14, 2006. Published, JBC Papers in Press, December 19, 2006, DOI 10.1074/jbc.M610294200

Joël Gautron<sup>†1</sup>, Emi Murayama<sup>§</sup>, Alain Vignal<sup>¶</sup>, Mireille Morisson<sup>¶</sup>, Marc D. McKee<sup>||</sup>, Sophie Réhault<sup>‡</sup>,  
Valérie Labas<sup>\*\*</sup>, Maya Belghazi<sup>\*\*</sup>, Mary-Laure Vidal<sup>‡</sup>, Yves Nys<sup>‡</sup>, and Maxwell T. Hincke<sup>††</sup>

# Les protéines spécifiques 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

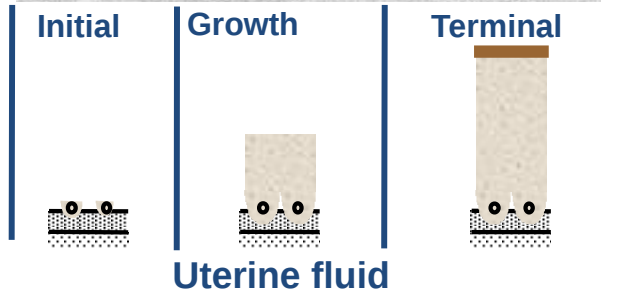


36 kDa Band

N-terminal Amino acid sequencing :  
VLGSGLSCAISPRAMQQVLSDAIIQTGGL

No correspondences in databases

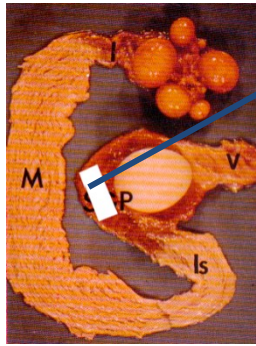
Specific antibodies



# Les protéines spécifiques 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



RNA prepared from uterus harvested during the shell calcification

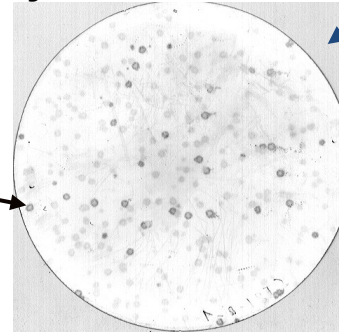
Preparation of a bacteriophage cDNA expression library

OCX-36 specific dies



Expression screening of the cDNA

cDNA sequence of positive clones

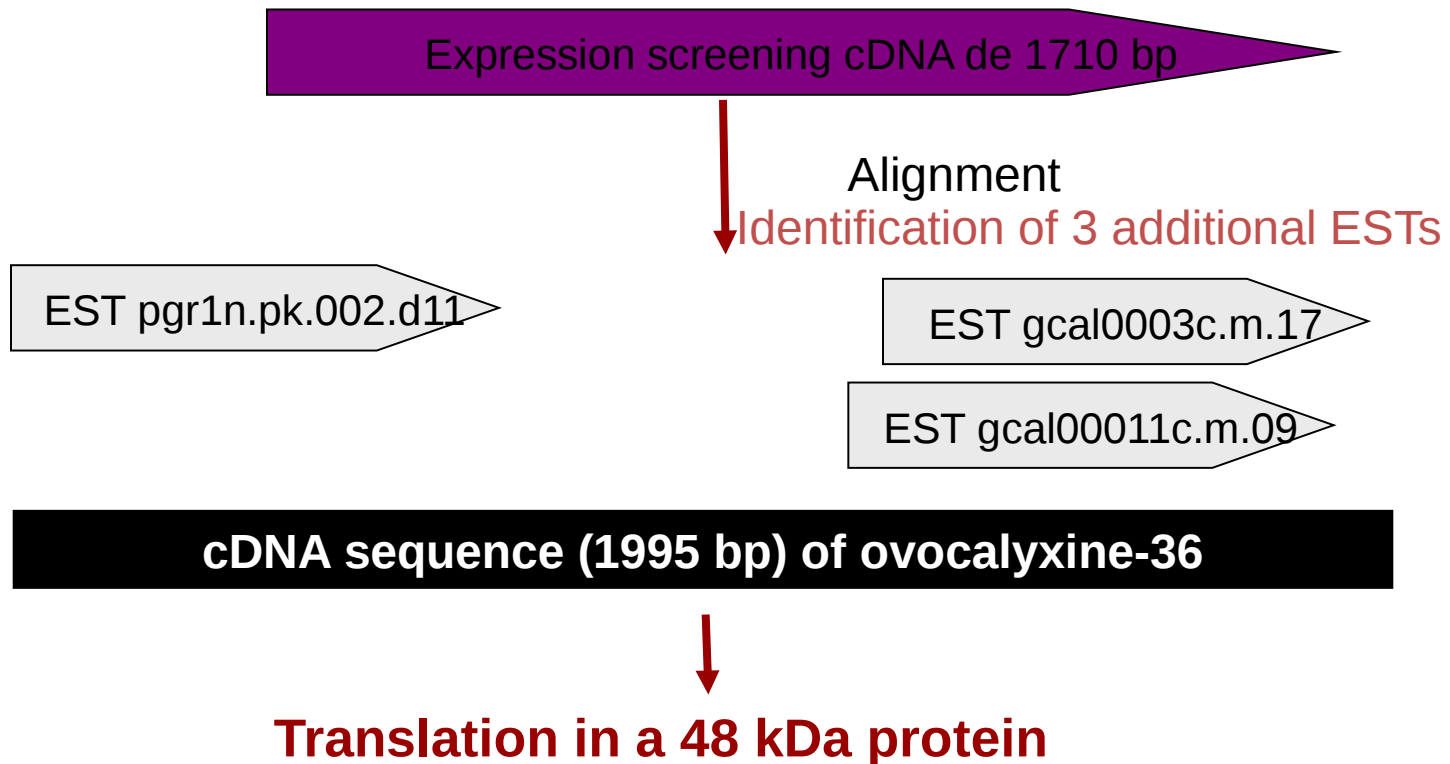


cDNA sequence of 1710 bp

# Les protéines spécifiques 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





# Les protéines spécifiques 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  $10^{-28}$

# Les protéines spécifiques 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

Séquence cDNA (1995 bp) de l'ARNm de l'Ovocalyxin-36

Warning

This release of *G. gallus* OQAVY contains a sequence that is not specific to chromosome W. A large portion of the sequence assigned to W was done so based on the presence of W-specific repeats. These repeats have now been shown to be not specific to chromosome W. Thus, the only portions of OQAVY which should currently be considered specific to W are:

- Chr.V, bases 1 - 165821
- Chr.V, bases 805842 - 816846
- All of Chr.W, random

BLAT Search Genome

Genome: Chicken Get output: Hybrid

Upload sequence: [text area]

submit I'm feeling lucky clear

Identification de la séquence génomique de l'Ovocalyxin-36  
Chromosome 20  
Position 9842171 et 9842177

# Les protéines spécifiques de la coquille

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

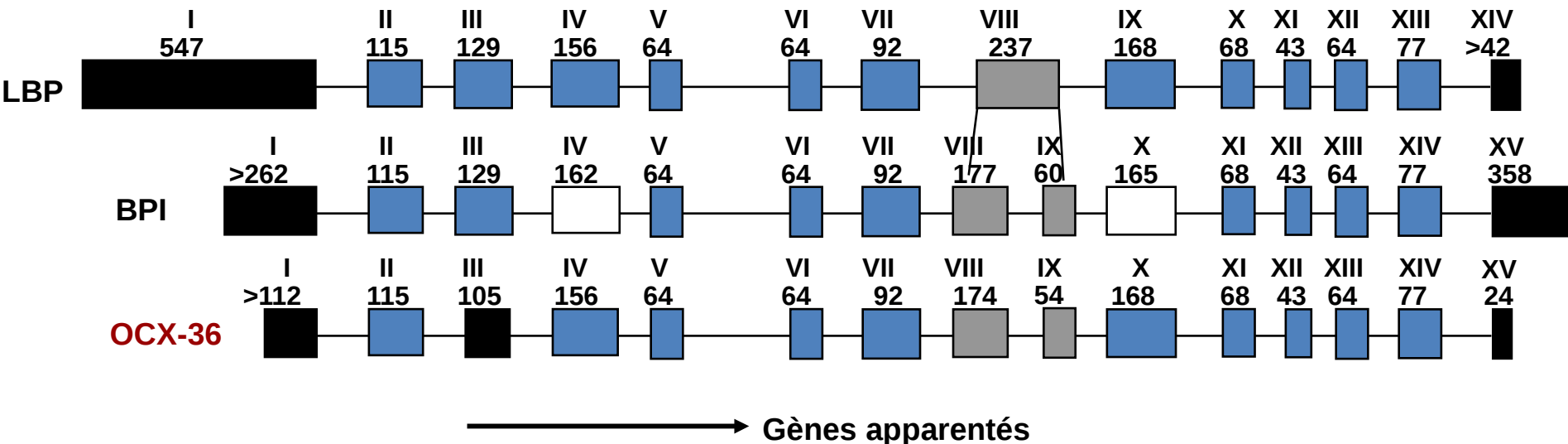
Ovocalyxin-36, une protéine spécifique de la matrice organique de la coquille

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

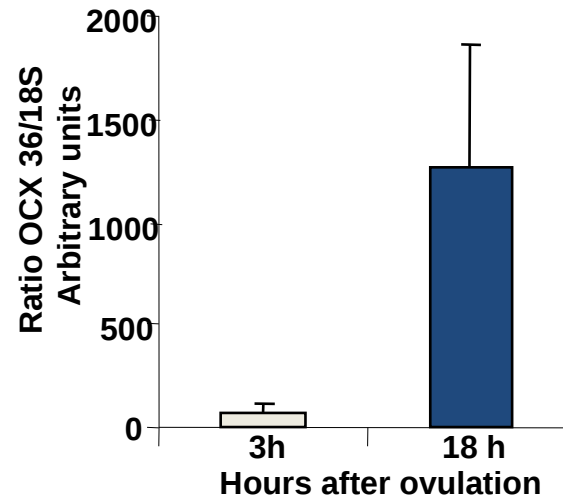
Architecture du gène



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

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

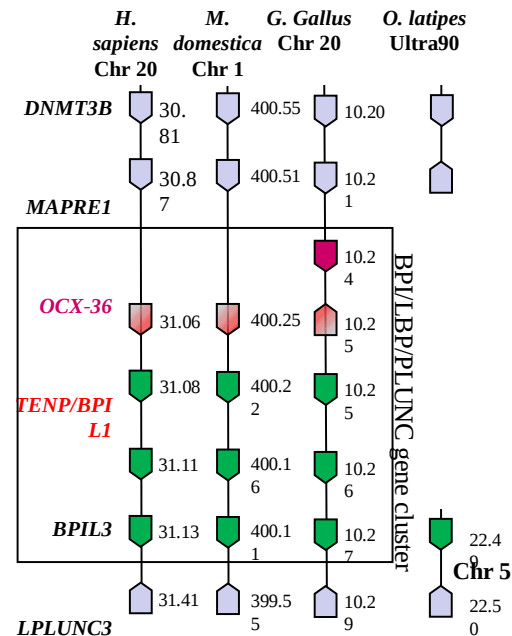
BIOLOGY OF REPRODUCTION 83, 893–900 (2010)  
Published online before print 11 August 2010.  
DOI 10.1095/biolreprod.110.085019

## Minireview

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



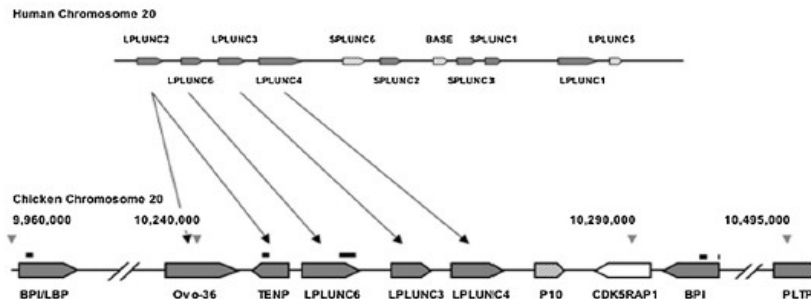
Identification and characterisation of the BPI/LBP/PLUNC-like gene repertoire in chickens reveals the absence of a LBP gene<sup>2\*</sup>

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

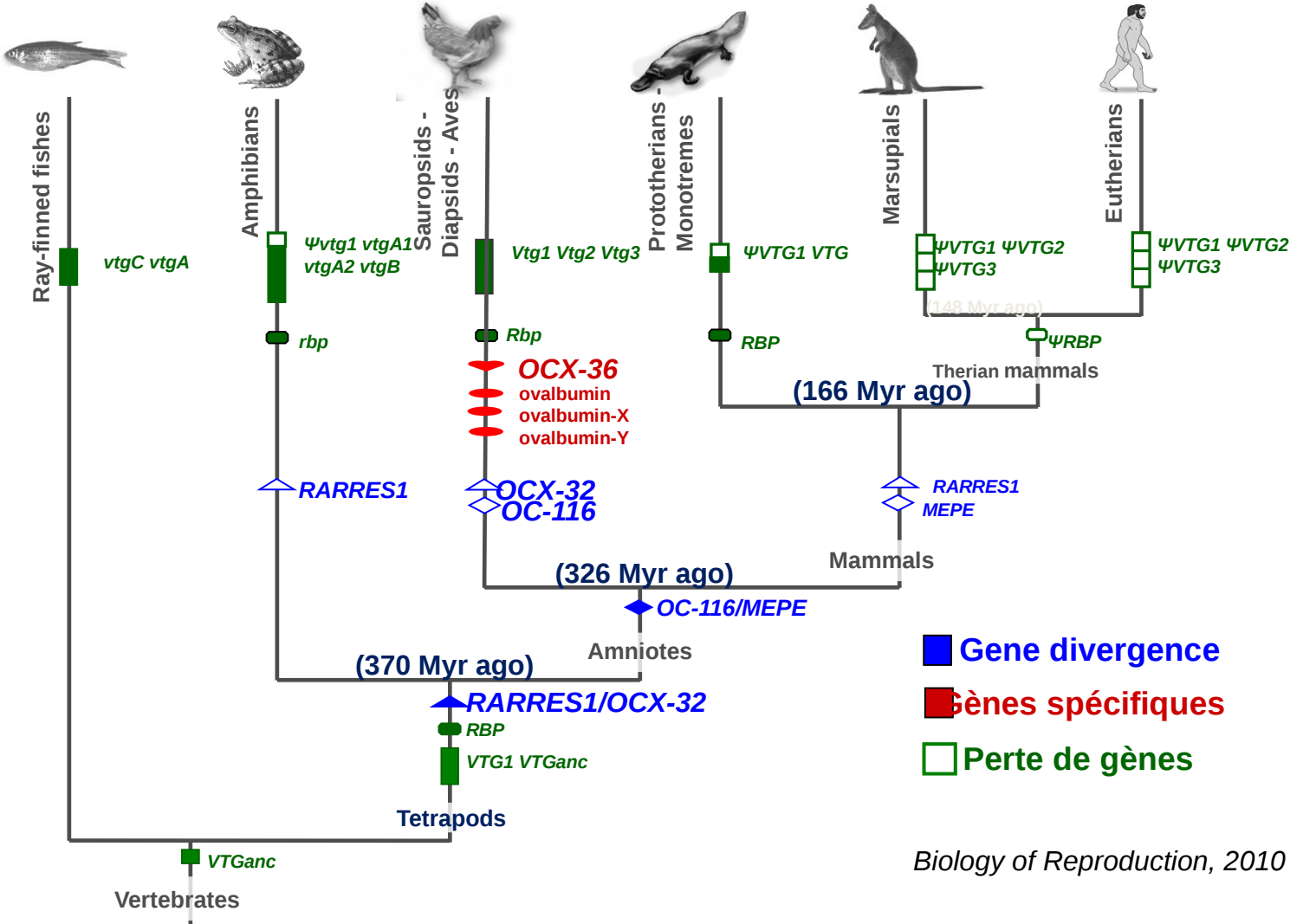
<sup>b</sup> Department of Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, P.O. Box 80.165, 3508 TD Utrecht, The Netherlands

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



# Utilisation combinée des banques cDNA, EST, génomique et des 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

✓ 2004, Publication de la séquence génomique de la poule



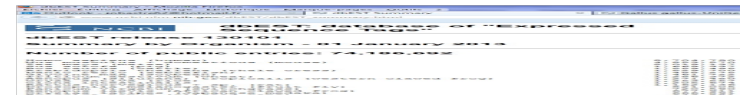
✓ Genome-wide non redundant catalog of 33 838 different genes

The image is a screenshot of the NCBI UniGene database. The search bar shows 'Gallus gallus[organism]' and the results page displays 'Gallus gallus: UniGene Build #46'. Below this, there is a 'Lineage' section with a list of taxonomic categories. A table lists the number of sequences included in UniGene, categorized by type: mRNAs, Models, HTC, EST, 3reads, EST, 5reads, EST, other/unknown, and total sequences in clusters. On the right side, there is a small image of two chicks and a section titled 'UniGene Links' with various links like Clusters, Library Browser, DDD, Query Tips, FAQ, and Finding cDNAs.

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

**Mise à disposition des techniques « omics » et des outils de data mining pour identifier de nouvelles protéines de l'œuf**

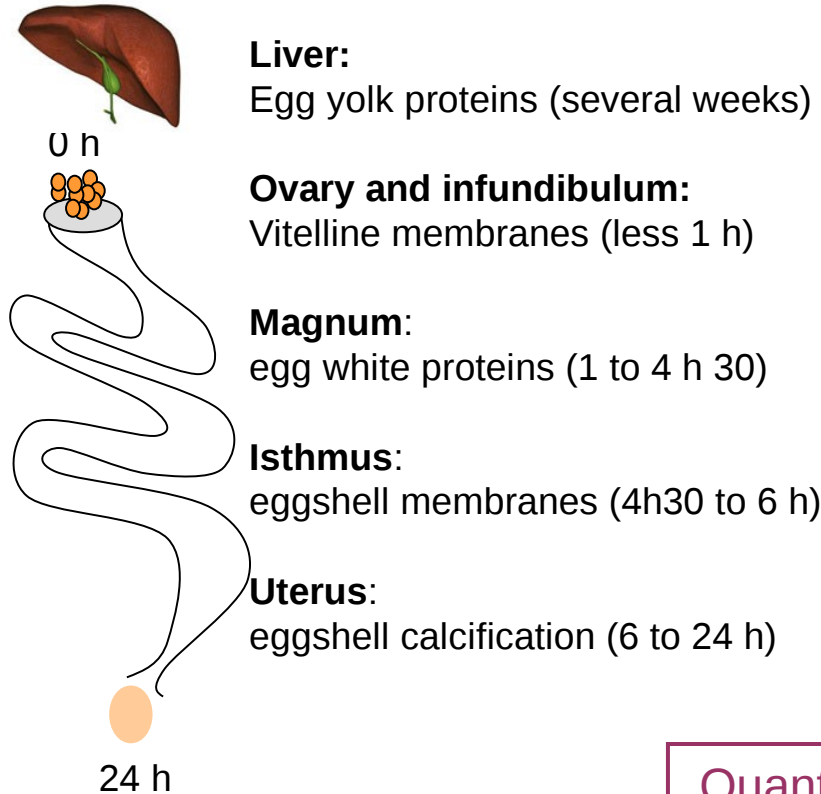
✓ cDNA and ESTs libraries  
(Identification of 600 434 functional genes in chickens)



# « omics » to identify novel egg proteins



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



## Egg formation *Spatial and temporal regulation*

Different tissues or organs  
Egg components are deposited at different times  
Different physiological stages

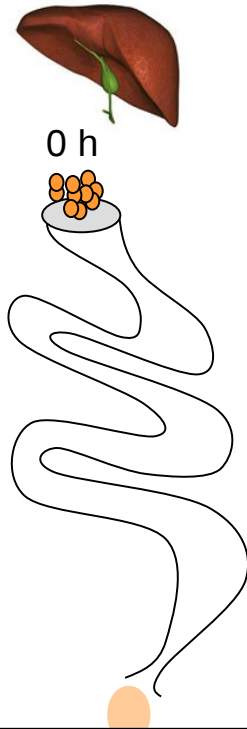
↓  
Comparison of gene expression in the  
various segment of the reproductive tract

↓  
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



✓ **Transcriptomics** (*microarrays, RNA*)



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

EggMeat symposia 2011 - Leipzig

Joël Gautron<sup>1</sup>, Aurélien Brionne<sup>1</sup>, Christelle Hennequet-Antier<sup>1</sup>, Cédric Cabau<sup>1</sup>, Nicolas Guyot<sup>1</sup>, Larry Cogburn<sup>2</sup>, Sophie Réhault-Godbert<sup>1</sup>, Yves Nys<sup>1</sup>

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

Jingwen Du<sup>a</sup>, Maxwell Hincke<sup>a, d</sup>, Aurelien Brionne<sup>b</sup>, Christelle hennequet -Antier<sup>b</sup>, Larry A. Cogburn<sup>c</sup>, Yves Nys<sup>b</sup>, Joel Gautron<sup>b</sup> **Submitted**

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 Jonchère<sup>1</sup>, Sophie Réhault-Godbert<sup>1</sup>, Christelle Hennequet-Antier<sup>1</sup>, Cédric Cabau<sup>1</sup>, Vonick Sibut<sup>1,3</sup>, Larry A. Cogburn<sup>2</sup>, Yves Nys<sup>1</sup>, Joel Gautron<sup>1\*</sup>

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



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 Brionne, Yves Nys, Christelle Hennequet-Antier and Joël Gautron\*

# I. Analyse exhaustive des protéines

# II. Caractérisation des défenses

# III. Variabilité des défenses

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

## ✓ Proteomics

JOURNAL OF PROTEOMICS 75 (2012) 2697–2706

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ELSEVIER

SciVerse ScienceDirect

[www.elsevier.com/locate/jprot](http://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 119 (2015) 178–193

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ELSEVIER

ScienceDirect

[www.elsevier.com/locate/jprot](http://www.elsevier.com/locate/jprot)

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

Pauline Marie<sup>a</sup>, Valérie Labas<sup>b</sup>, Aurélien Brionne<sup>a</sup>, Grégoire Harichaux<sup>b</sup>, Christelle Hennequet-Antier<sup>a</sup>, Yves Nys<sup>a</sup>, Joël Gautron<sup>a,\*</sup>

JOURNAL OF PROTEOMICS 116 (2015) 81–96

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

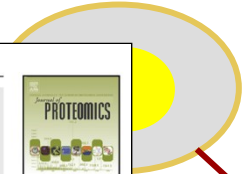
ELSEVIER

ScienceDirect

[www.elsevier.com/locate/jprot](http://www.elsevier.com/locate/jprot)

**Novel identification of matrix proteins involved in calcitic biomineralization**

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



shell

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

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 Mikulikova  
*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 eggshell 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

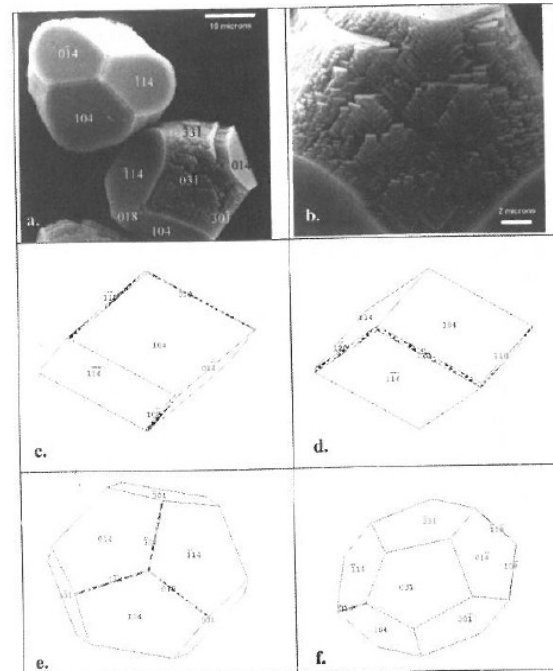
## ➤ calcification process

### ✓ 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<sup>a</sup>, M.T. HINCKE<sup>b</sup>, M. PANHELEUX<sup>a</sup>, J.M. GARCIA-RUIZ<sup>c</sup>, T. BOLDICKE<sup>d</sup> and Y. NYS<sup>a,\*</sup>



**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

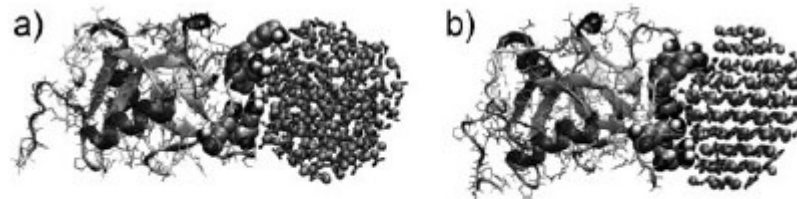
Angewandte  
International Edition  
Chemie

DOI: 10.1002/anie.201000679

### **Biomaterialization**

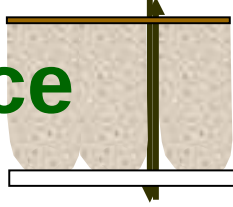
#### **Structural Control of Crystal Nuclei by an Eggshell Protein\*\***

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



**Figure 1.** Ovocleidin-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



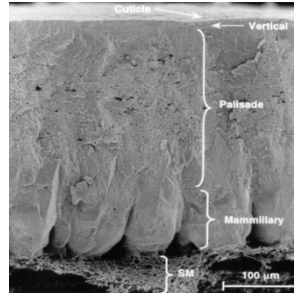
## ➤ **calcification process**

- 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)*

Hiérarchiser les Protéines de la matrice organique intervenant dans le processus de minéralisation

# Étude de la biominéralisation de la coquille des oiseaux

95% de  $\text{CaCO}_3$  (calcite)  
↑  
**Interaction** — **Contrôle du processus de calcification**  
↓  
3,5% de matrice orga  
(protéines, protéoglyc

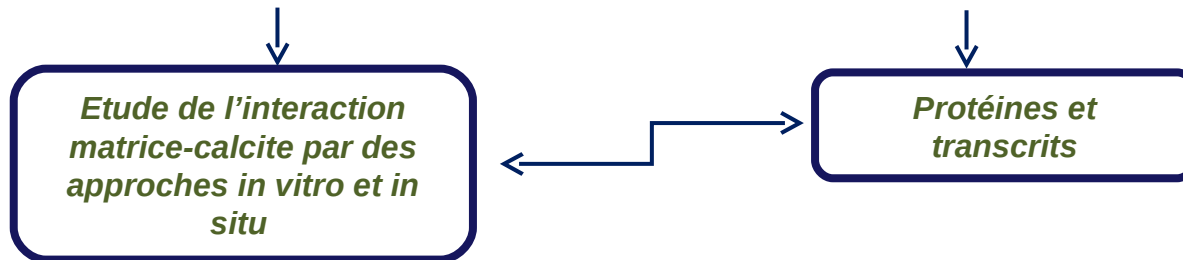


Approches globales et non hiérarchisées

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

Archiver les acteurs moléculaires prépondérants lors du processus de minéralisation

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

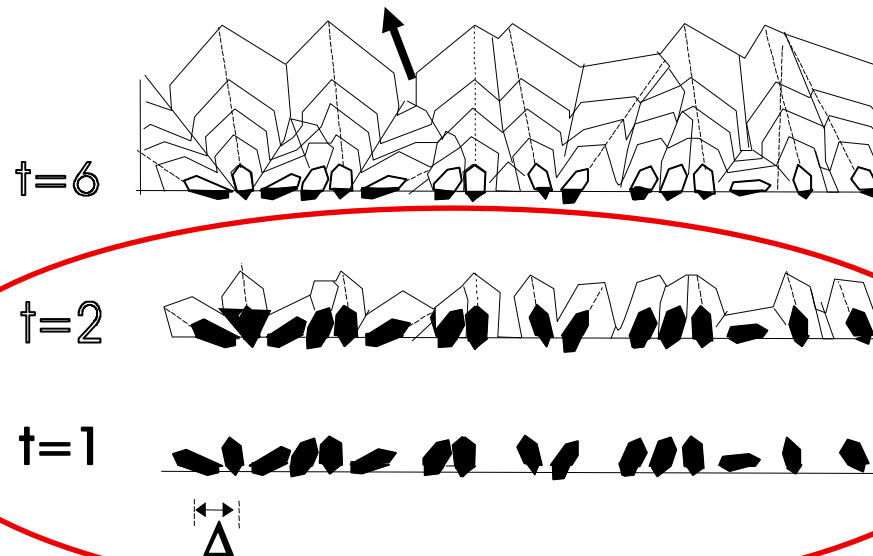


# Étude de la biominéralisation de la coquille des oiseaux

(Propriétés mécaniques exceptionnelles)

## □ 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



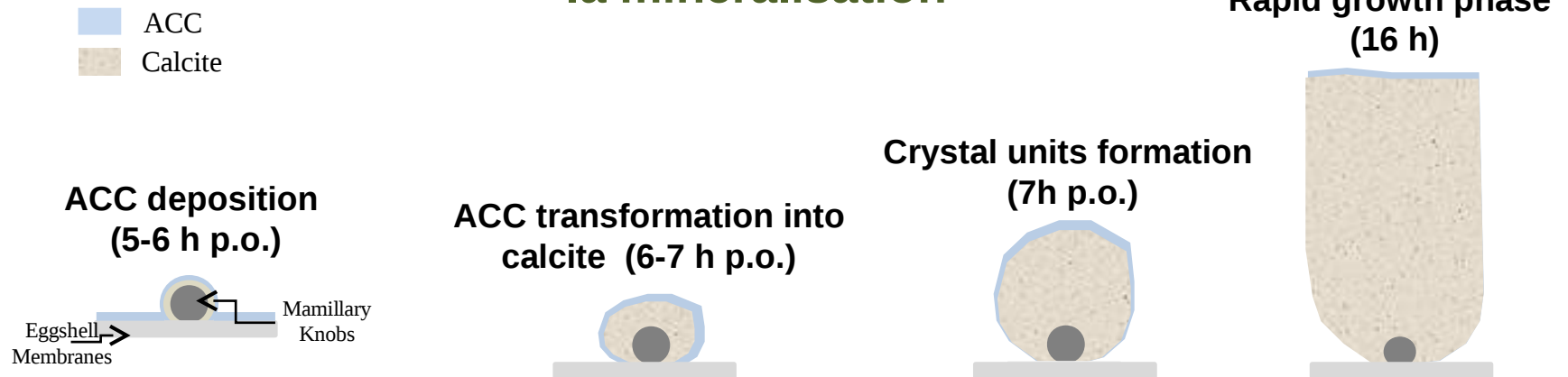
# Étude de la biominéralisation de la coquille des oiseaux

(Propriétés mécaniques exceptionnelles)

## □ Importance de l'initiation de la minéralisation

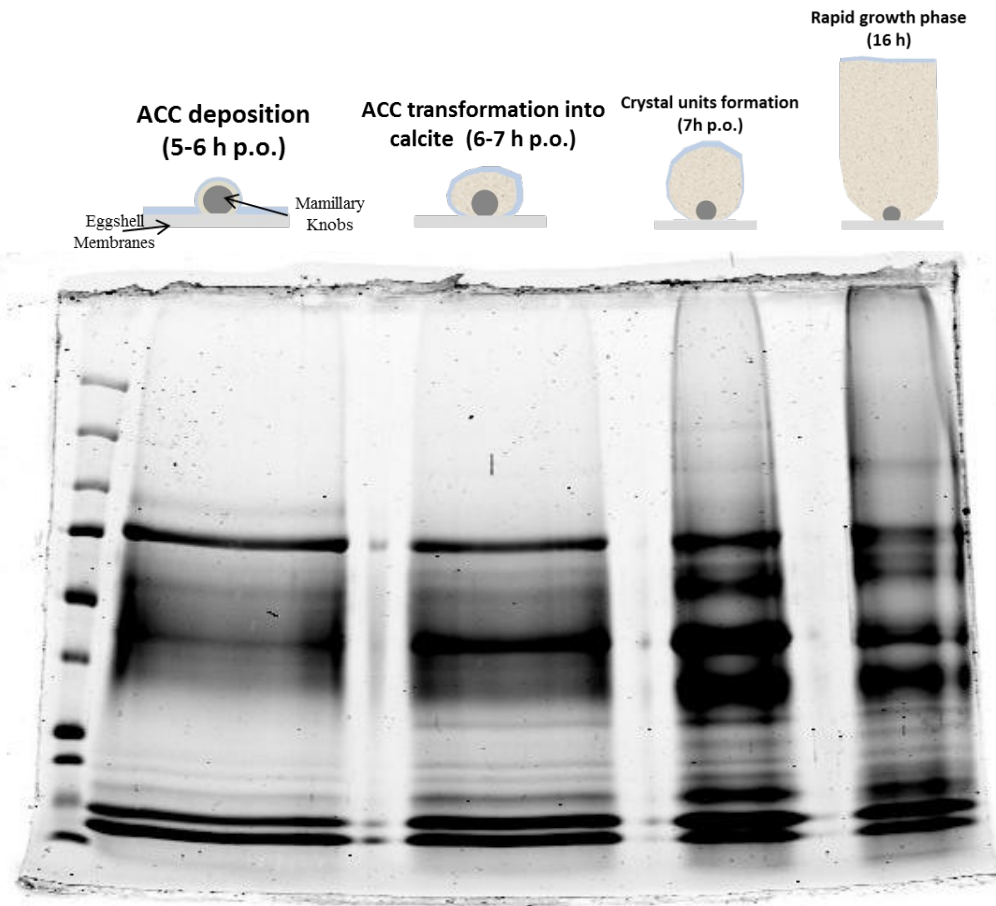
• Etape cruciale pour la suite de la biominéralisation

• Détermine les propriétés mécaniques de la Coquille en formation collectée à différents points de l'initiation de la minéralisation



# Etude de la coquille à différents temps de la minéralisation

SDS-PAGE 4-20



Analyse protéomique  
sur LTQ-VelosOrbitrap  
des bandes

Identification des protéines

Etablissement d'une liste  
non redondante de 216  
protéines

# Etude de la coquille à différents temps de la minéralisation

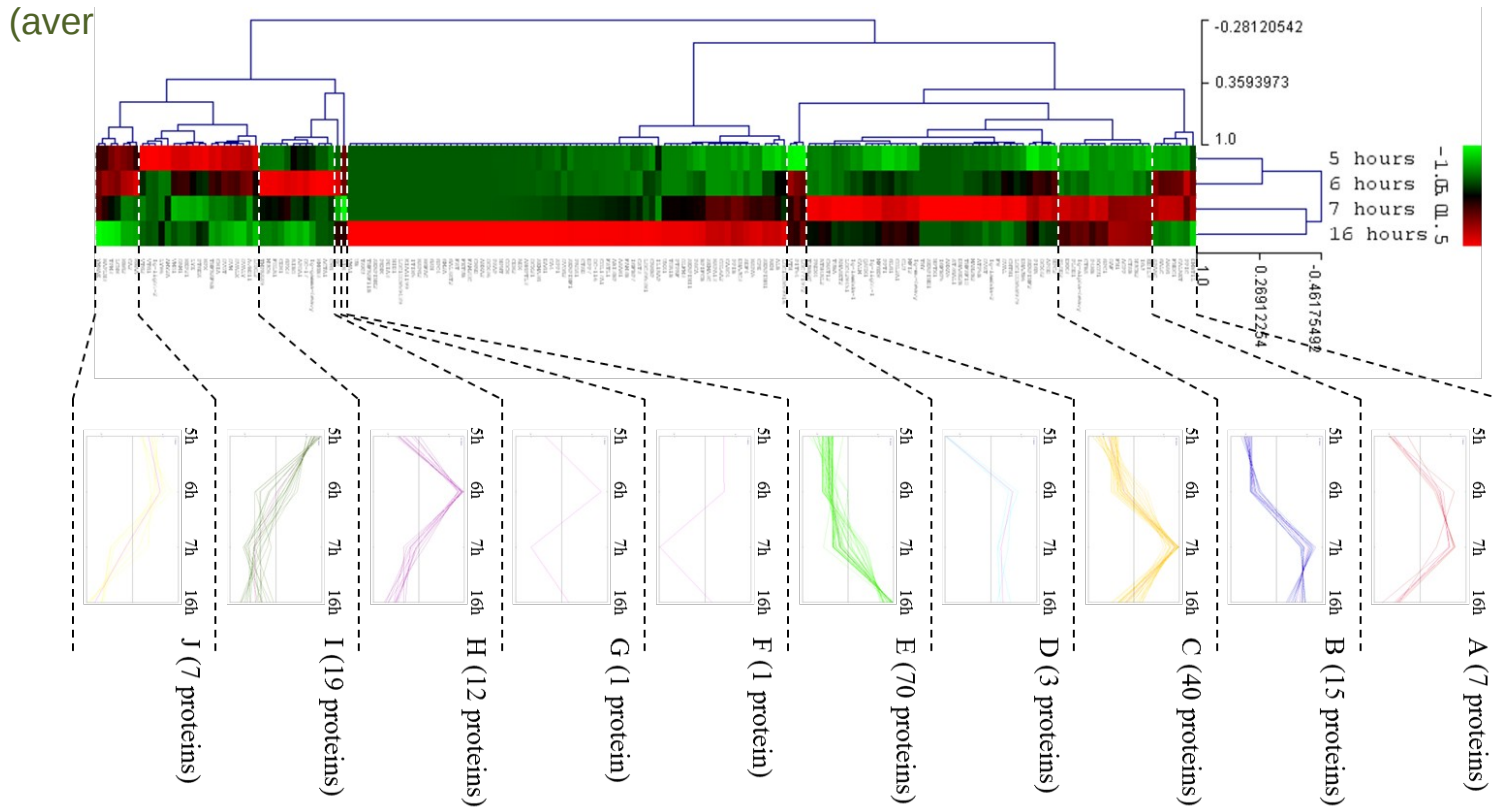
- **216 protéines quantifiées**
- **Détermination de l'abondance relative dans chacun des 4 stades**
- **Analyses statistiques**
  - ANOVA  
175 Protéines ont des variations d'abondance significatives selon les stades
  - Cluster hiérarchique profils d'abondance protéique

# Etude de la coquille à différents temps de la minéralisation

## Classement des protéines selon leur profil d'abondance

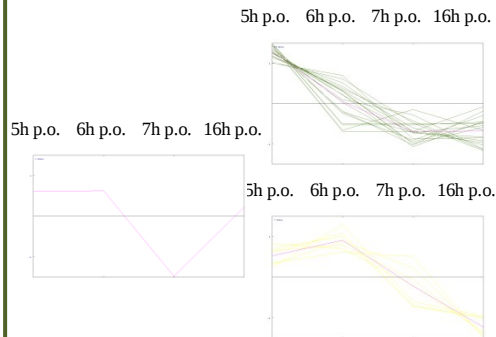
### Réalisation d'un cluster hiérarchique pour les 175 protéines

- Valeur moyennée et 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

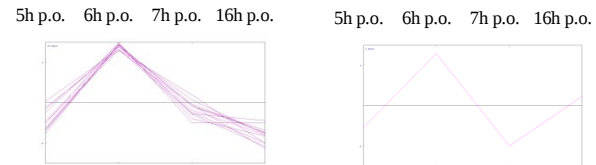


# Etude de la coquille à différents temps de la minéralisation

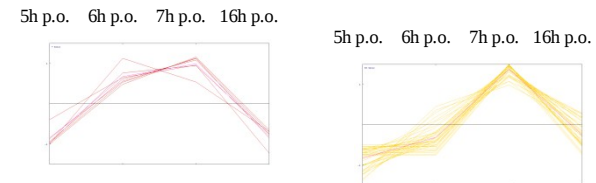
## 27 protéines overabundantes pendant les événements primaires de la minéralisation de la coquille



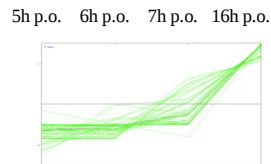
## 13 protéines overabundantes pendant la transformation de l'ACC en agrégats de calcite



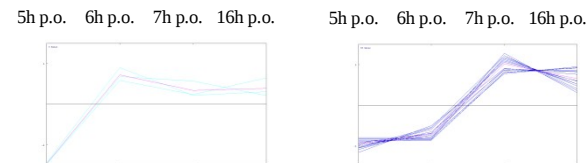
## 47 protéines overabundantes lorsque de grandes unités cristallines de calcite sont formées



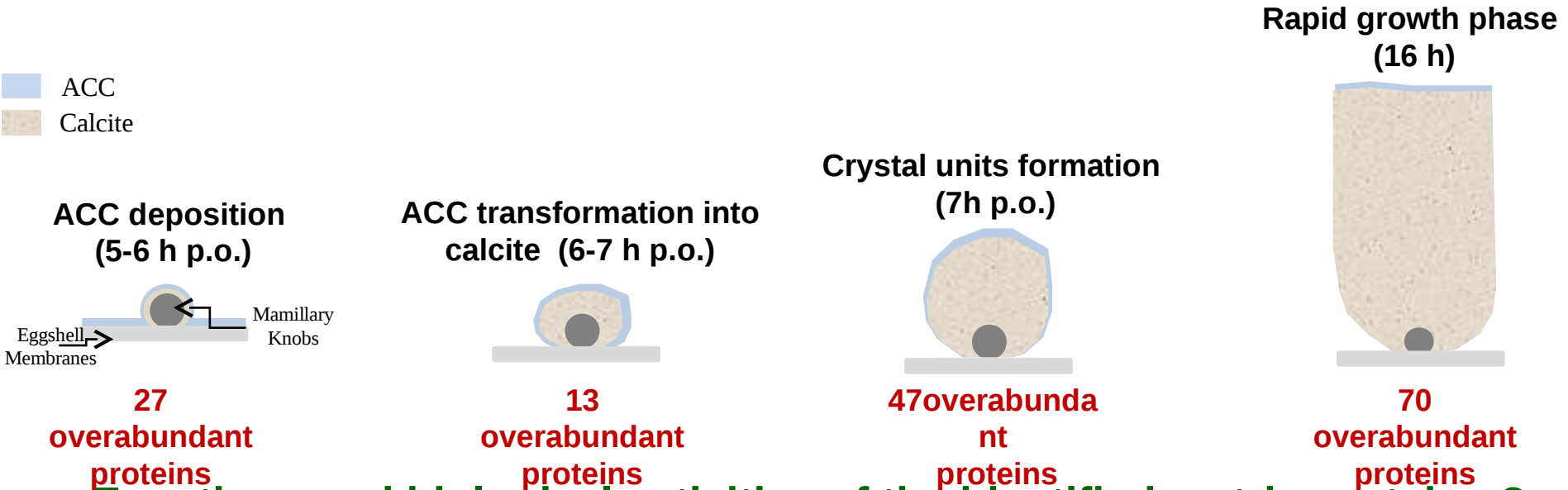
## 70 protéines overabundantes pendant la phase de croissance rapide



## 18 protéines overabundantes aux stades associés à la présence de calcite



# Etude de la coquille à différents temps de la minéralisation



## Functions and biological activities of the identified matrix proteins ?



Literature, data mining and bioinformatics tools

Classification in different groups according to their potential functions

Associated to Mineralization process

Involved in the regulation of activity of proteins

Antimicrobial proteins



# Etude de la coquille à différents temps de la minéralisation

## □ Proteins associated to shell mineralization process

✓ Proteins involved in the **biomineralization** of shell or other biominerals (bones, molluscan...)

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

- Identification of numerous novel CaBPs

*Numerous proteins with EF-hand and EGF-like calcium binding domains are present in the shell*

✓ **Proteoglycans** et proteoglycan binding proteins

- proteoglycans have a negative charge to attract  $\text{Ca}^{2+}$  ions

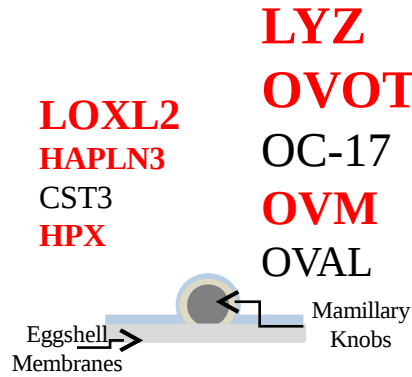
✓ **Eggshell membranes** proteins

# Etude de la coquille à différents temps de la minéralisation

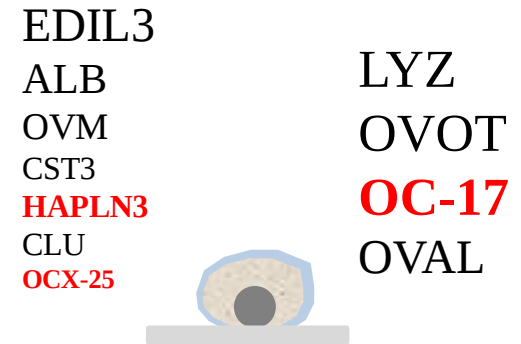
- **Proteins involved in the regulation of activity of proteins driving mineralisation**
- ✓ Proteins involved in the **proper folding of the eggshell matrix**
  - *An appropriate conformation of proteins is required to ensure calcium and mineral interactions and to ensure template to the mineralized 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*
  - *Direct action of proteins to inhibit or activate the molecular actors present in the milieu.*
    - *Molecular chaperone interact with proteins driving mineralisation*
    - *Proteases and protease inhibitors (specific and controlled role during calcification process, either by degrading proteins or regulating processing of proteins into their mature forms)*
- ✓ Mineralisation depends of the **degree of protein phosphorylation**
  - *Kinases*
  - *Phosphatases*

# Etude de la coquille à différents temps de la minéralisation

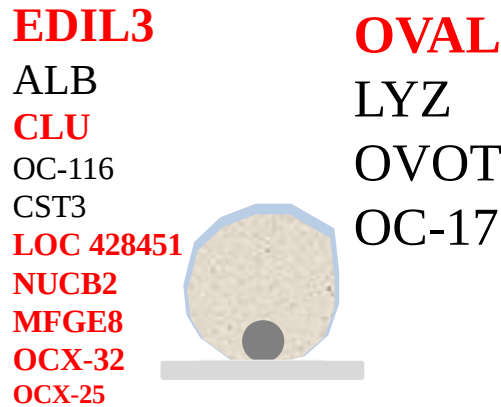
ACC  
Calcite



**ACC deposition  
(5-6 h p.o.)**



**ACC transformation into calcite  
(6-7 h p.o.)**



**Crystal units formation  
(7h p.o.)**



**Rapid growth phase  
(16 h)**

# Bio-minéralisation 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....)