



Bio-minéralisation de la coquille d'oeufs d'oiseaux

Joël Gautron

► To cite this version:

Joël Gautron. Bio-minéralisation de la coquille d'oeufs d'oiseaux. UE Bio-minéralisation, 2016, pp.87.
hal-02798816

HAL Id: hal-02798816

<https://hal.inrae.fr/hal-02798816>

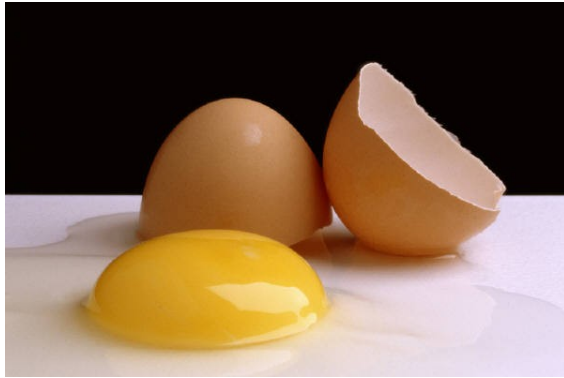
Submitted on 5 Jun 2020

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

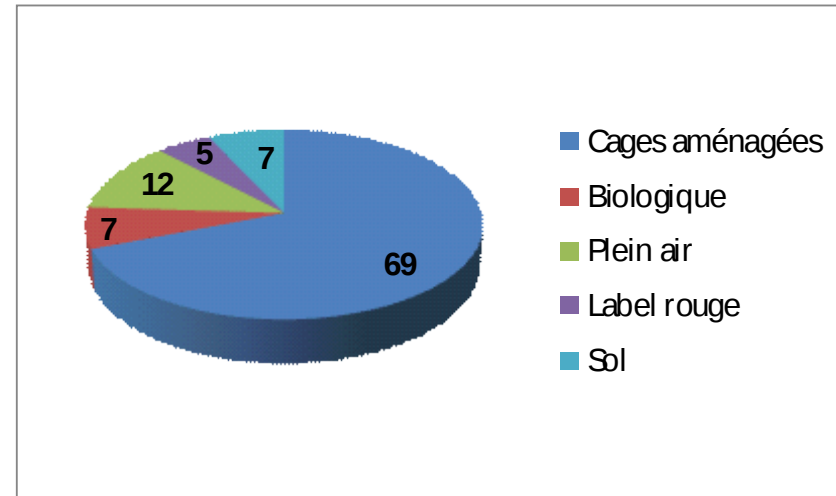
L'Œuf, un produit de base pour l'alimentation humaine

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 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

L'Œuf, un p Chambre is

Doit contenir la totalité des composants nécessaires au développement embryonnaire

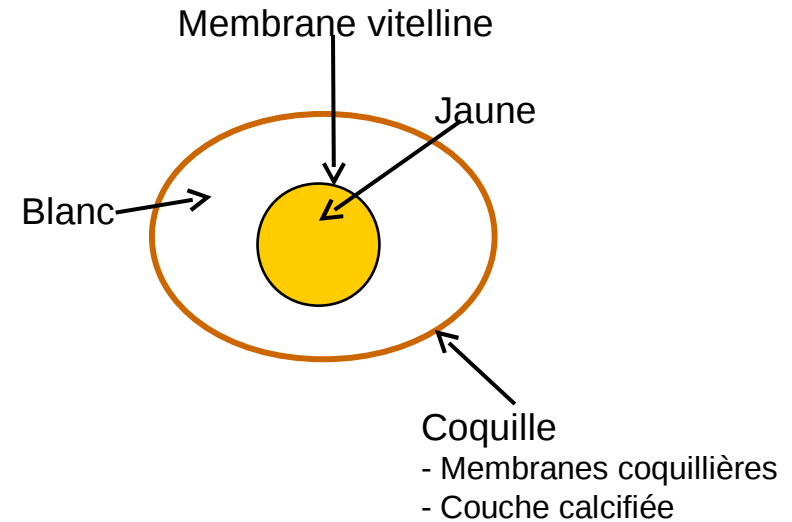
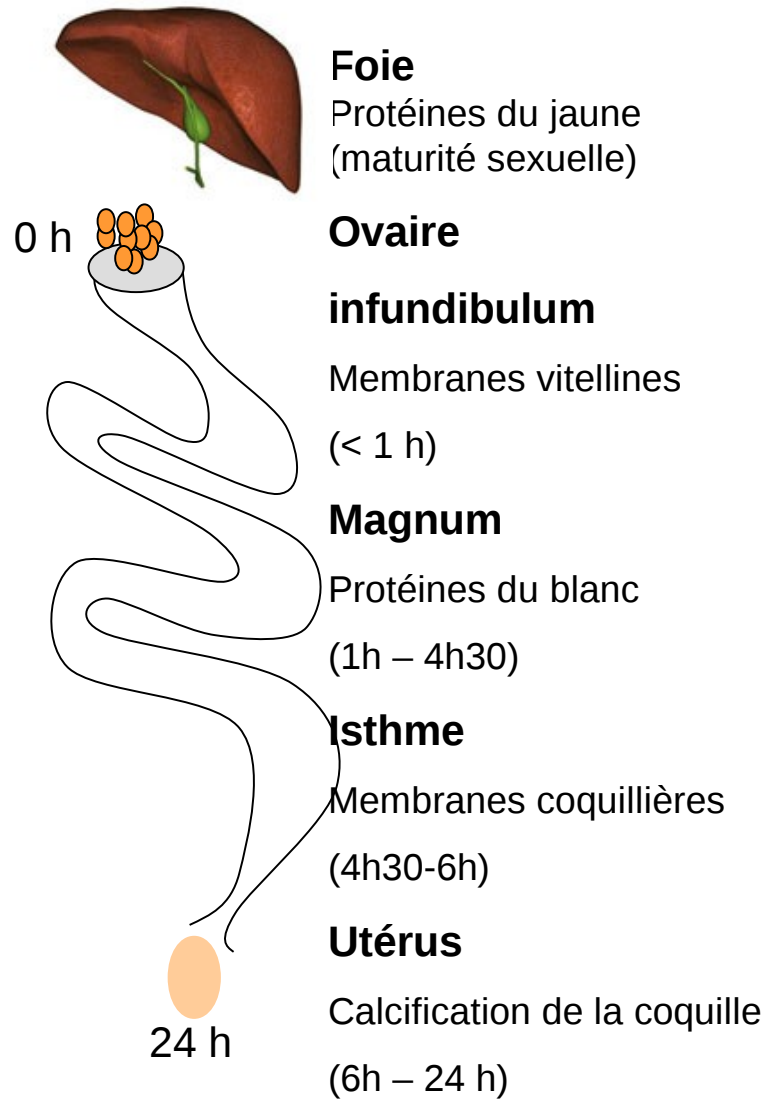


Agressions
physiques

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)

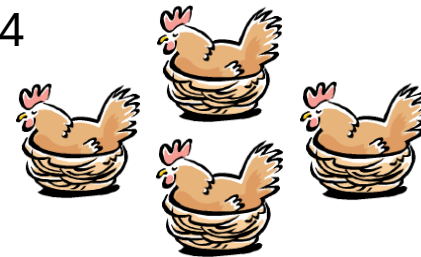
La formation de l'œuf



Le contexte européen



Directive EU 1999/74
Animal welfare

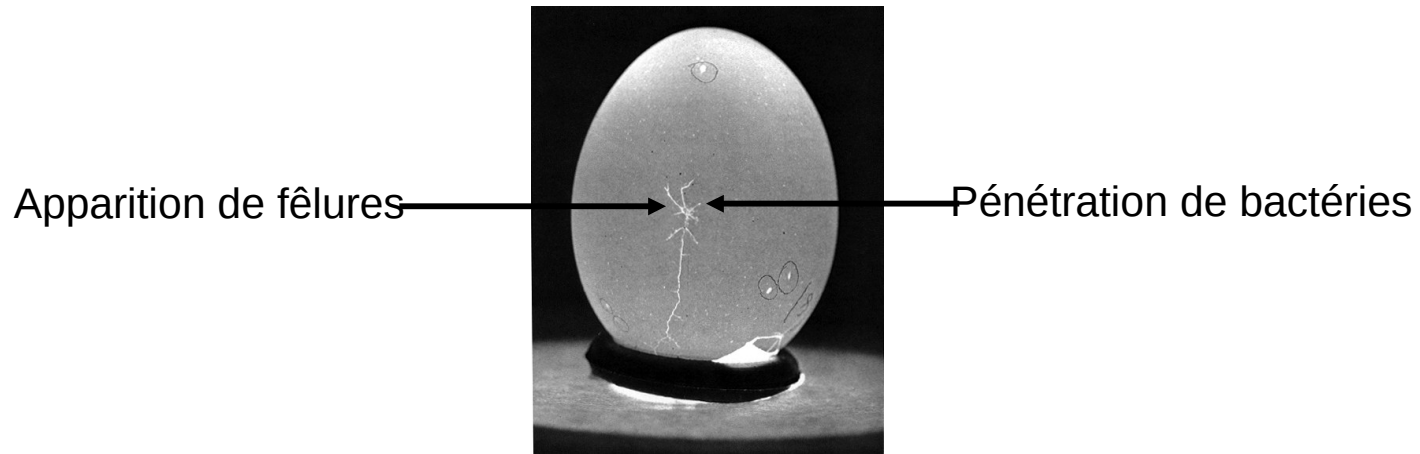


**Cages aménagées, volières
ou autres systèmes au sol**

Impact sur la qualité hygiénique de l'oeuf ?

La coquille : une barrière physique contre la pénétration bactérienne

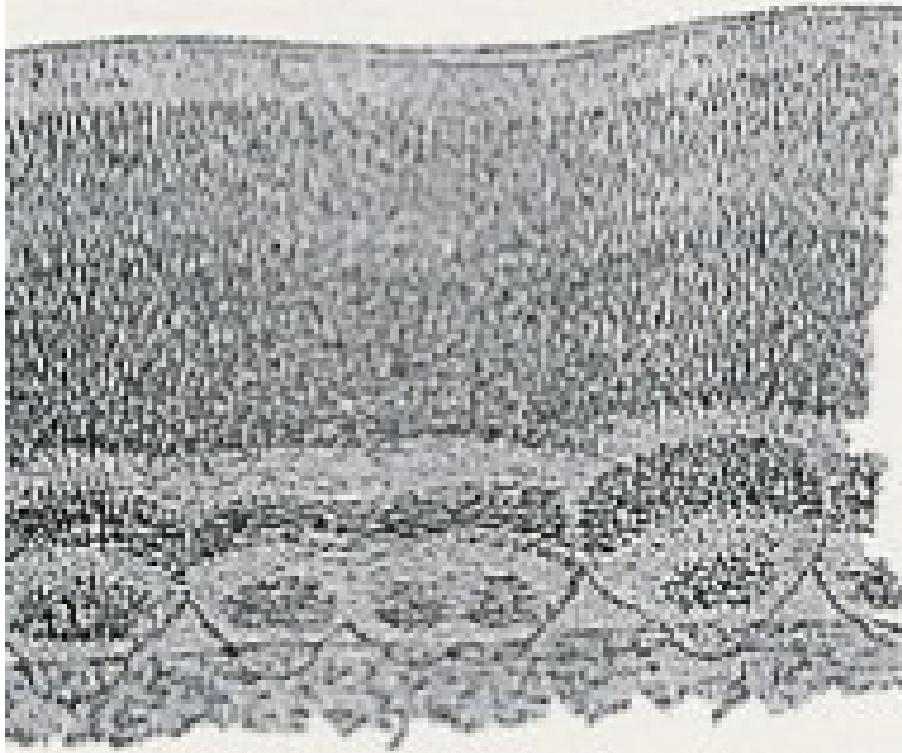
- L'intégrité de la coquille est cruciale pour la sécurité alimentaire du consommateur



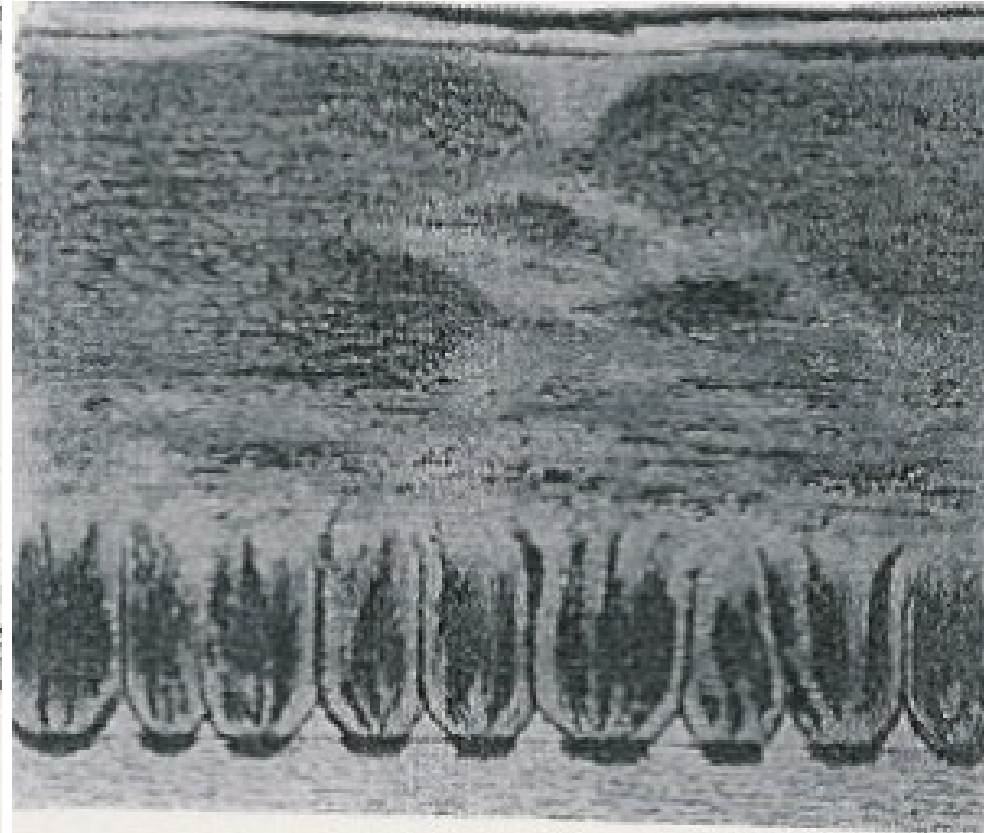
Comprendre les mécanismes de fabrication de la coquille et déterminer l'origine de ses faiblesses

Développer de nouveaux outils pour la sélection

La coquille (défense physique)



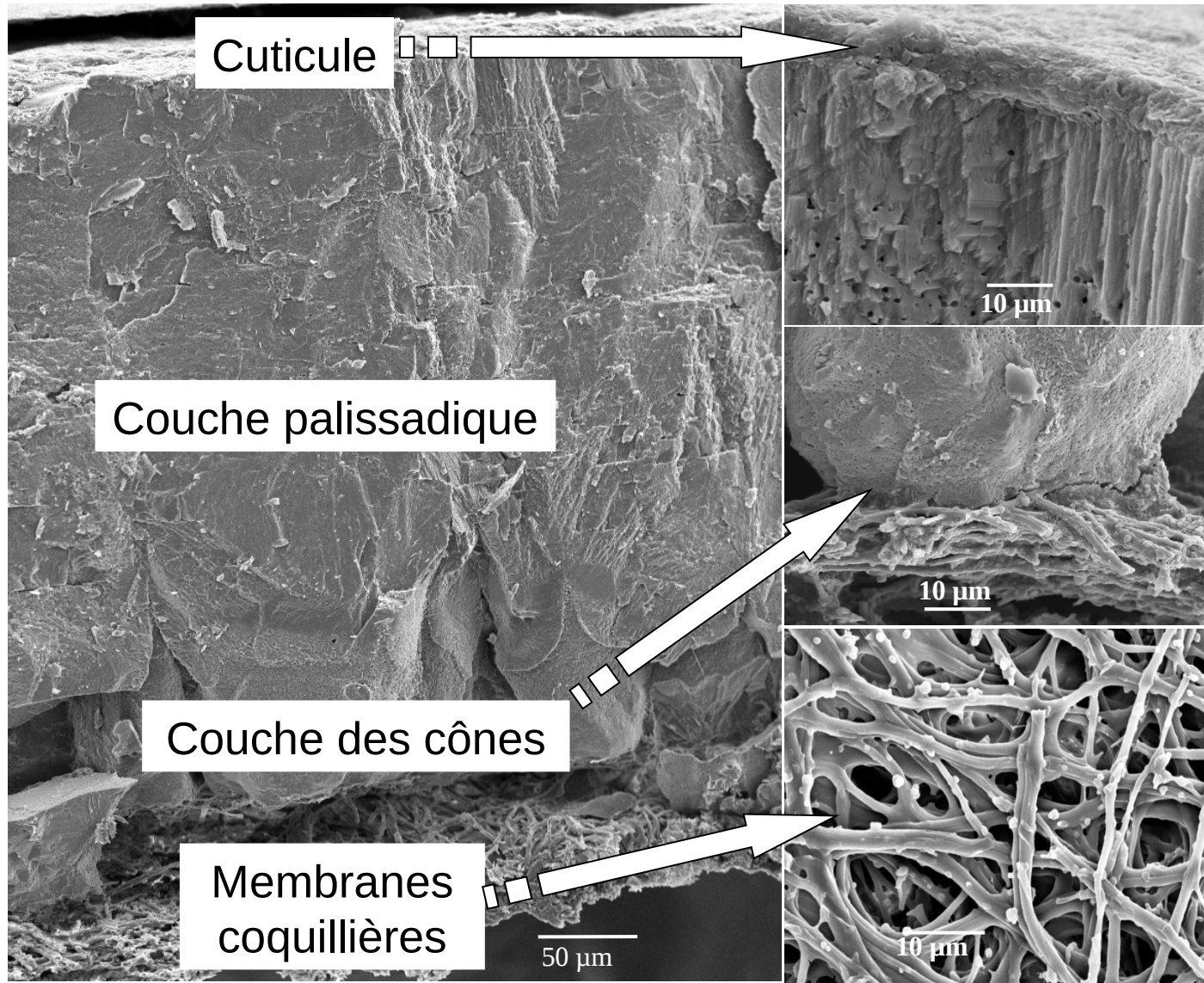
Gallus gallus x 72



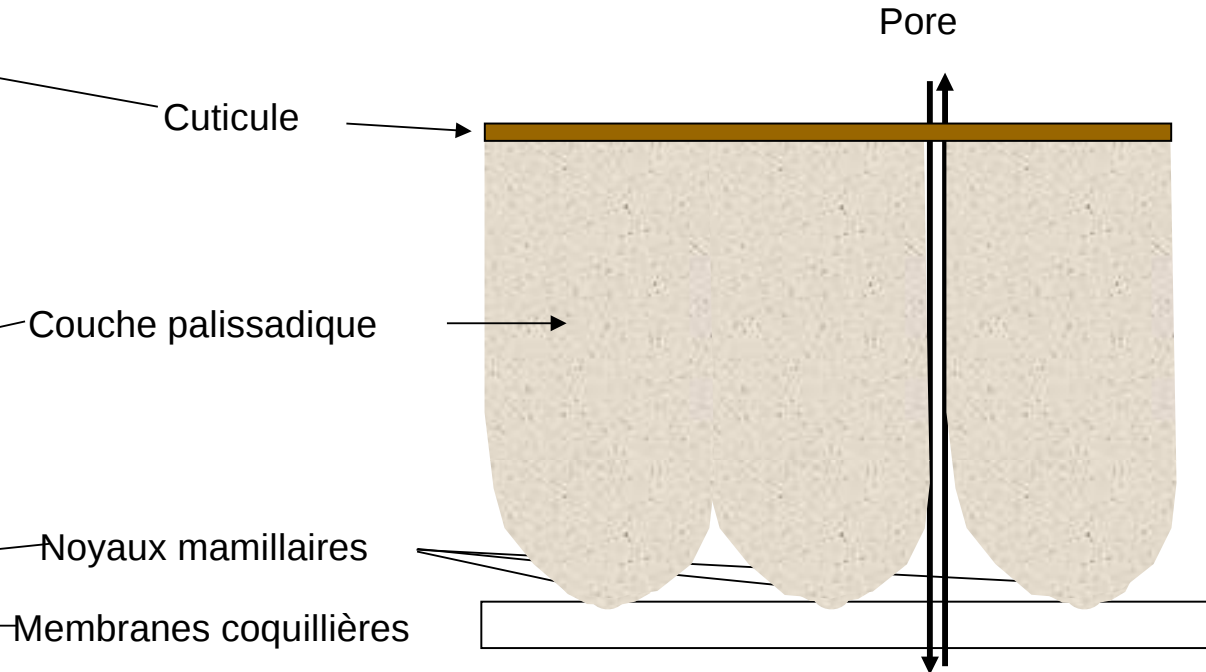
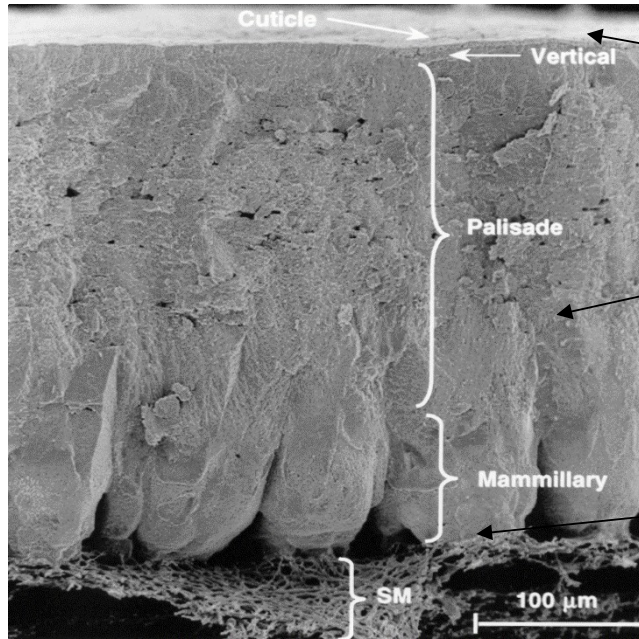
Cygnus x 53

Dessin de Wilhem von Nathusius, 1821-99

La coquille (défense physique)



La coquille (défense physique)



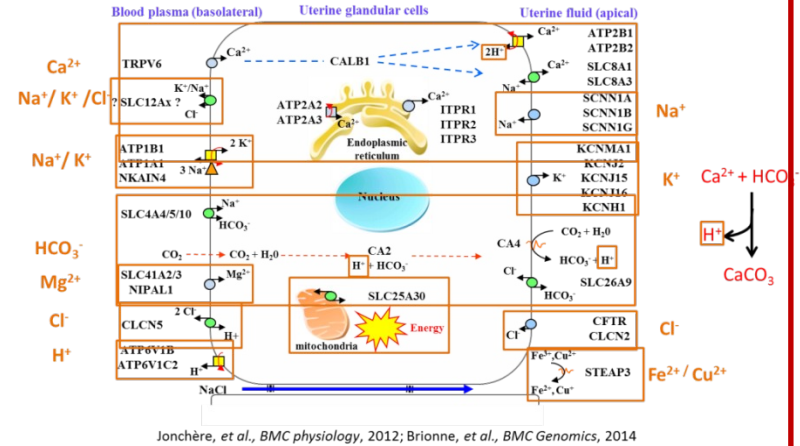
Eggshell Biomineralisation in uterus

Supply of minerals for shell mineralization

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

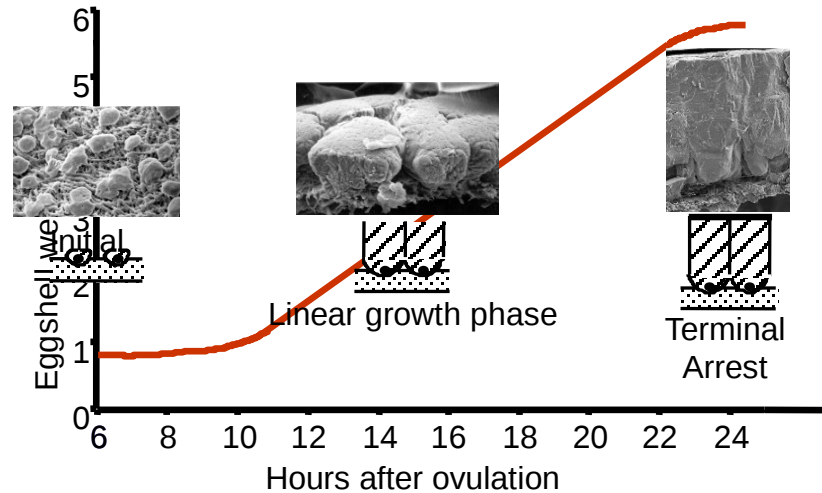
Jonchère et al., 2012, BMC physiology

Brionne et al., 2014, BMC Genomics



Biomineralisation process

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

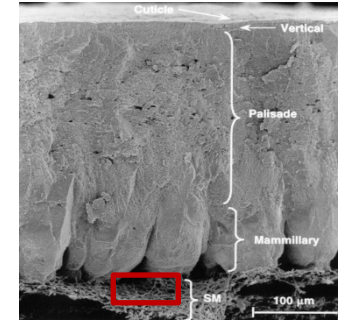
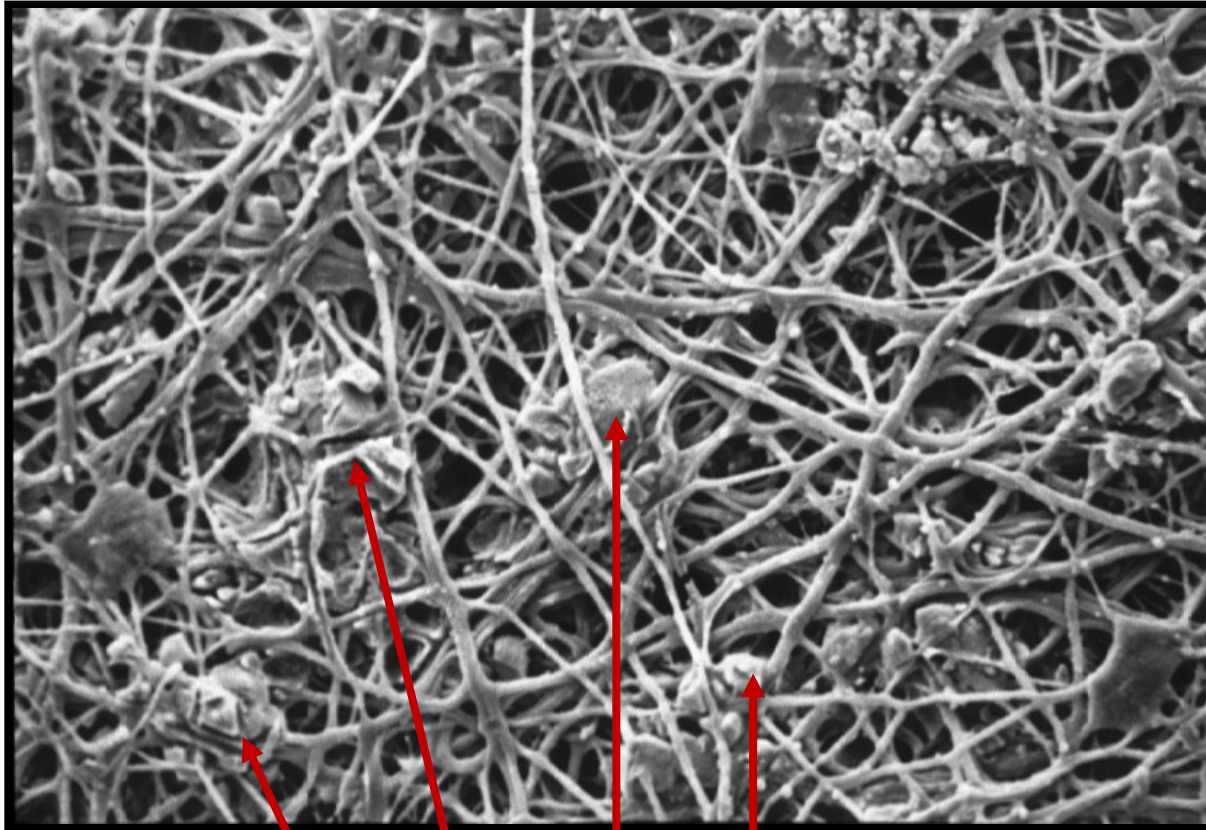


La formation de la coquille des oiseaux, un processus de biominéralisation

- ☐ **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

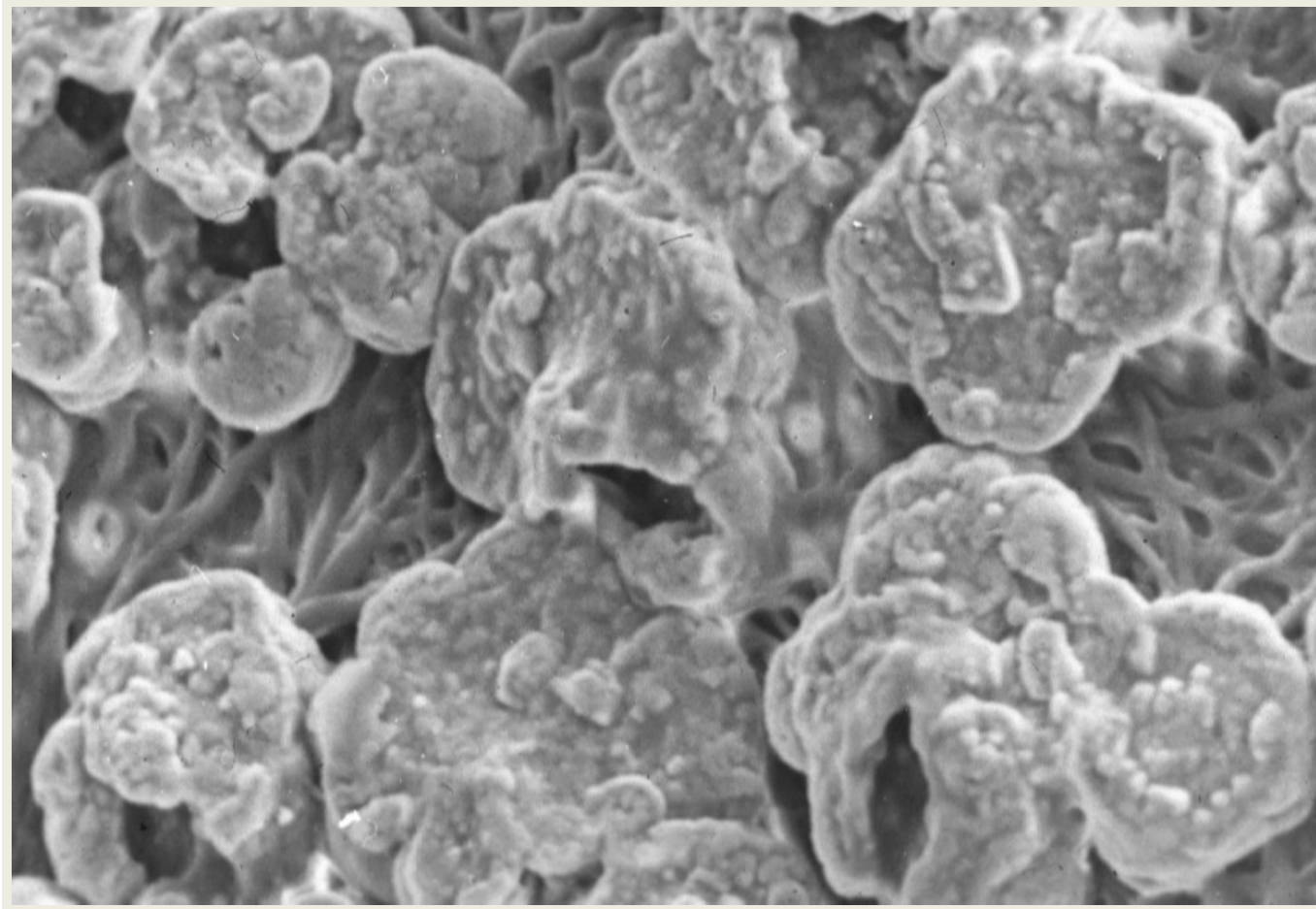
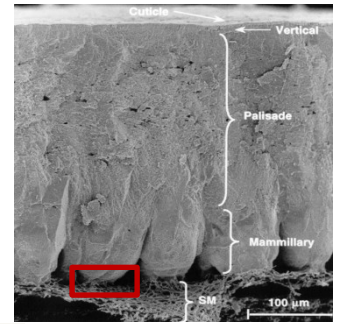
La phase initiale



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

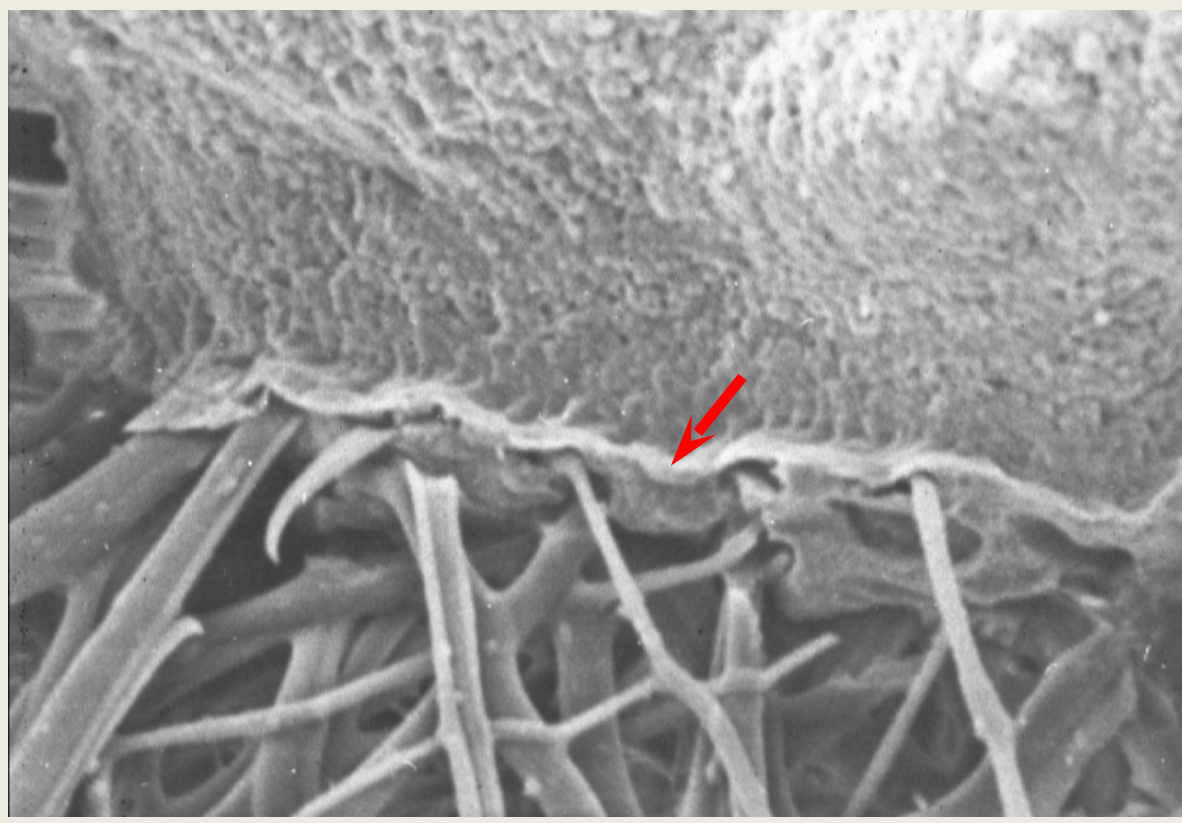
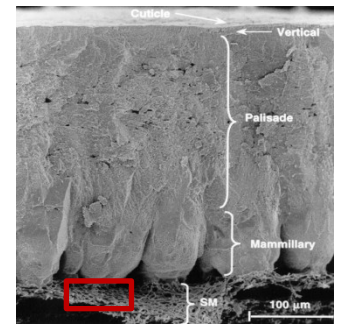
La phase initiale



Peu à peu les noyaux mamillaires sont recouverts de calcite

La formation de la coquille

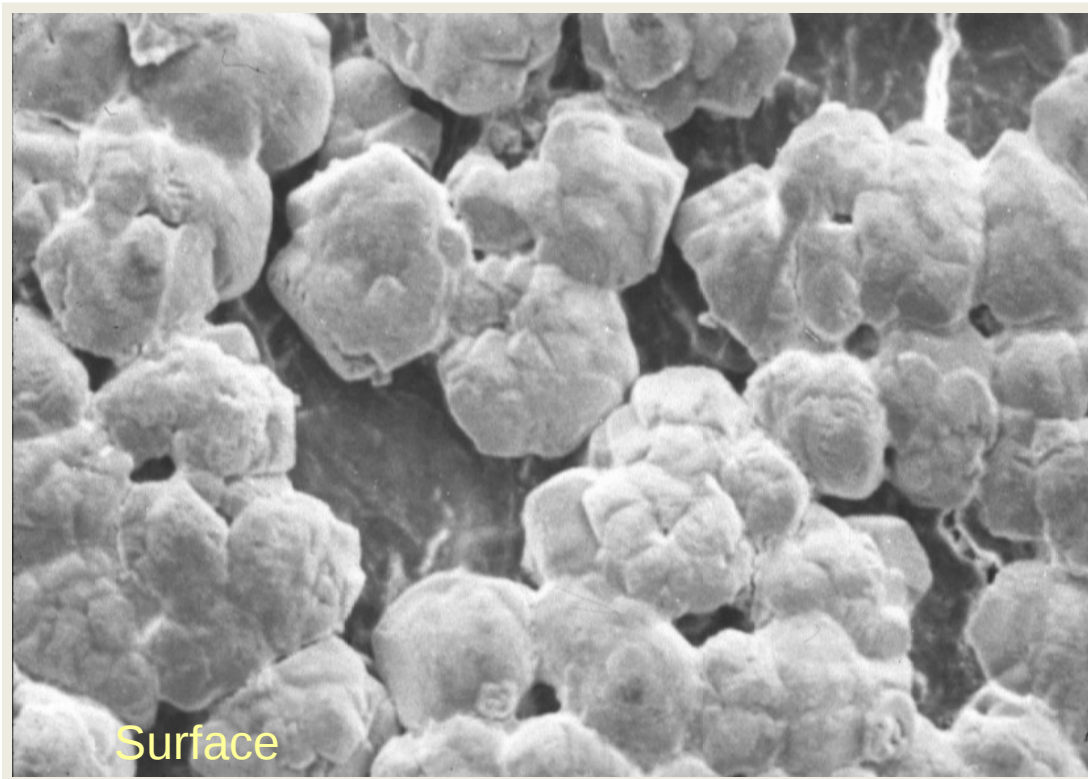
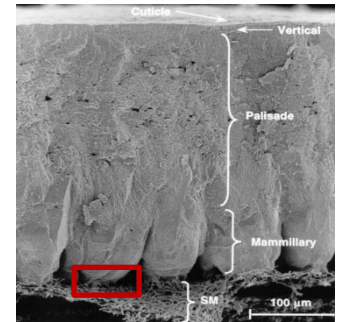
La phase initiale



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

La formation de la coquille

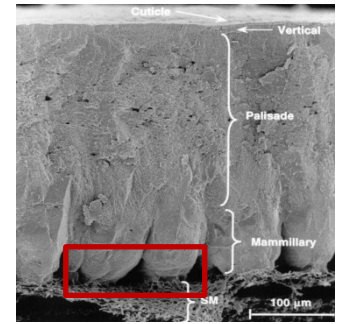
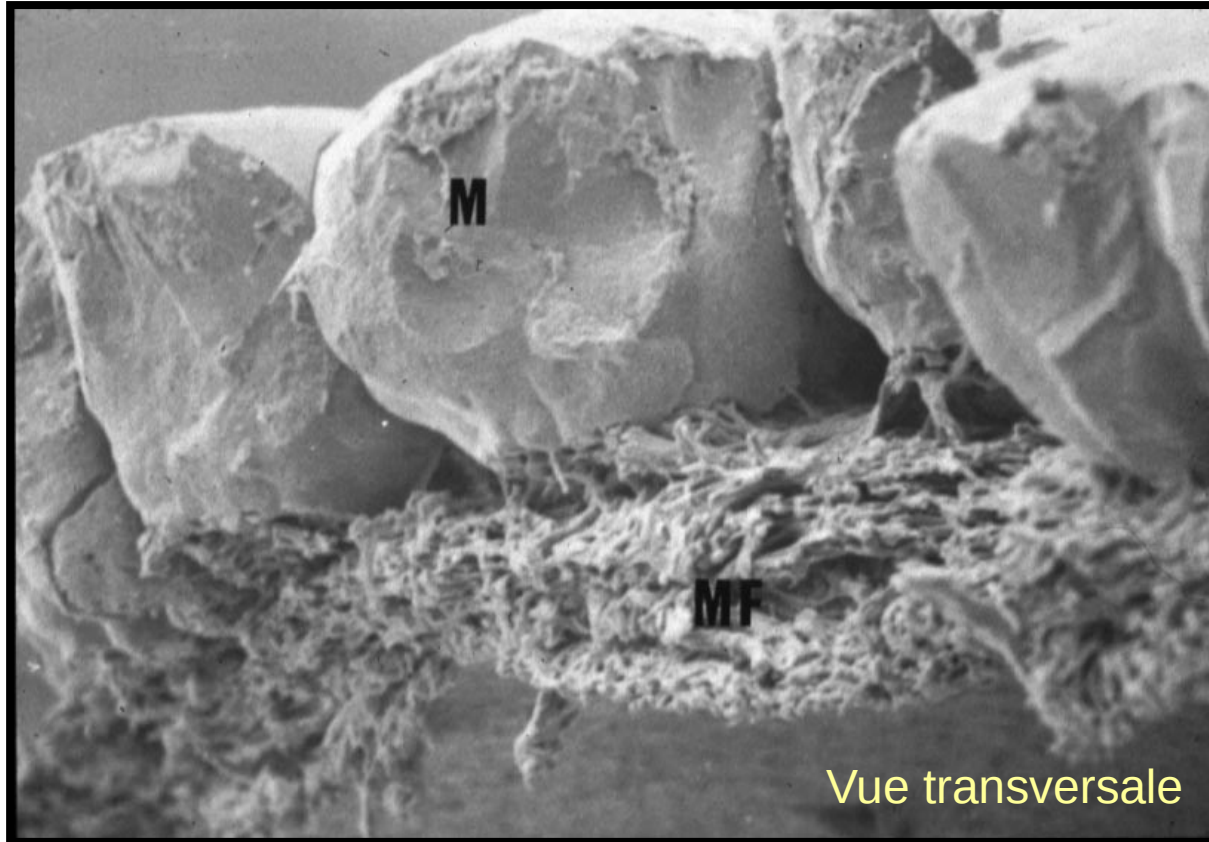
La phase initiale



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

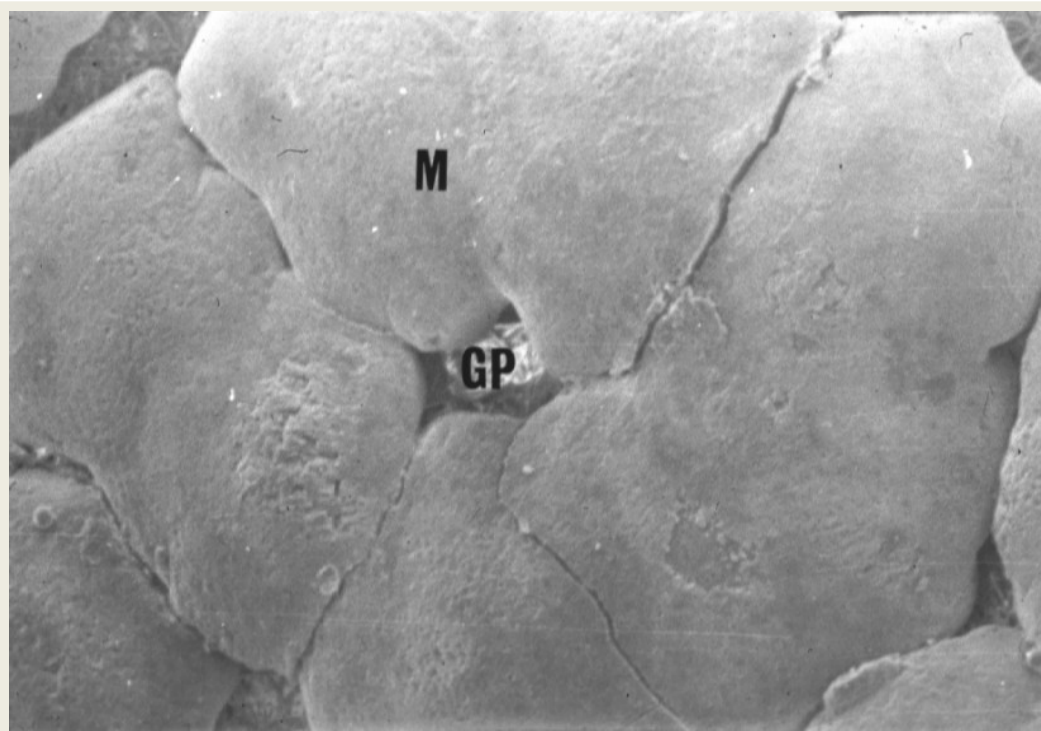
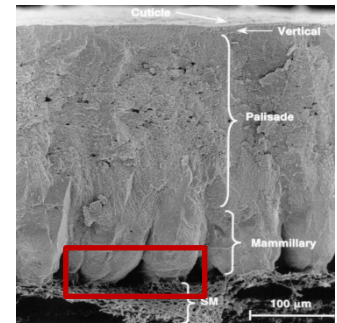
La phase de croissance



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

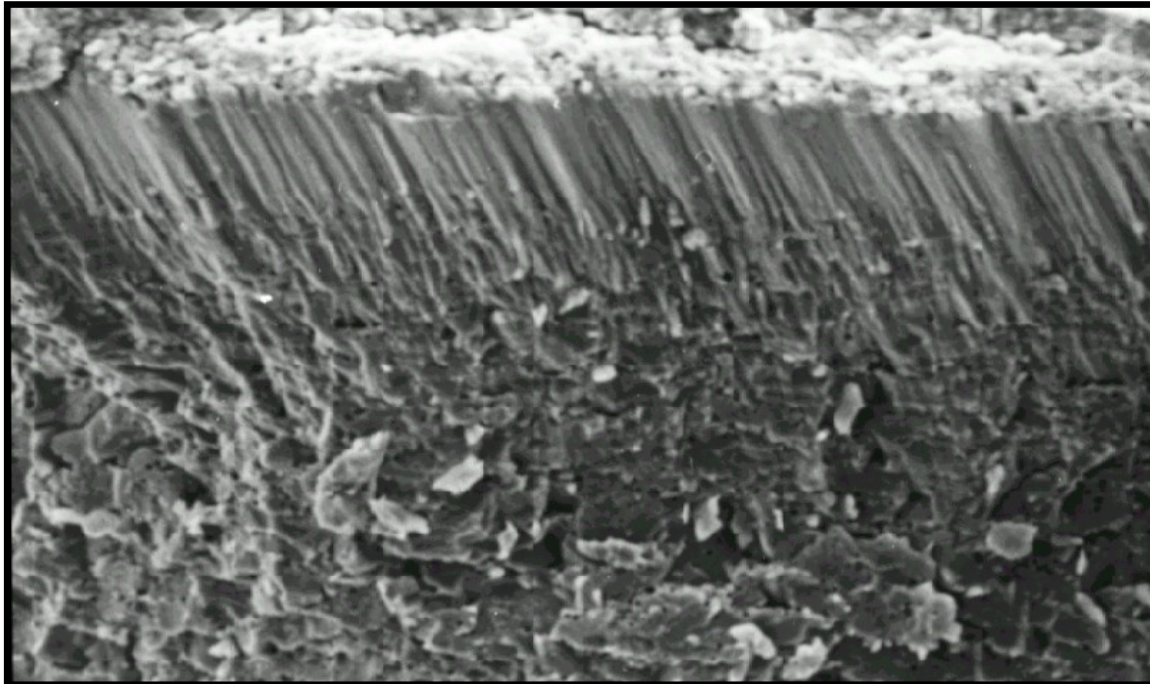
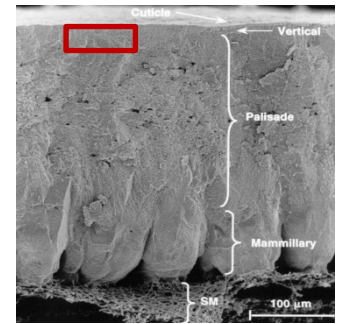
La phase de croissance



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

La formation de la coquille

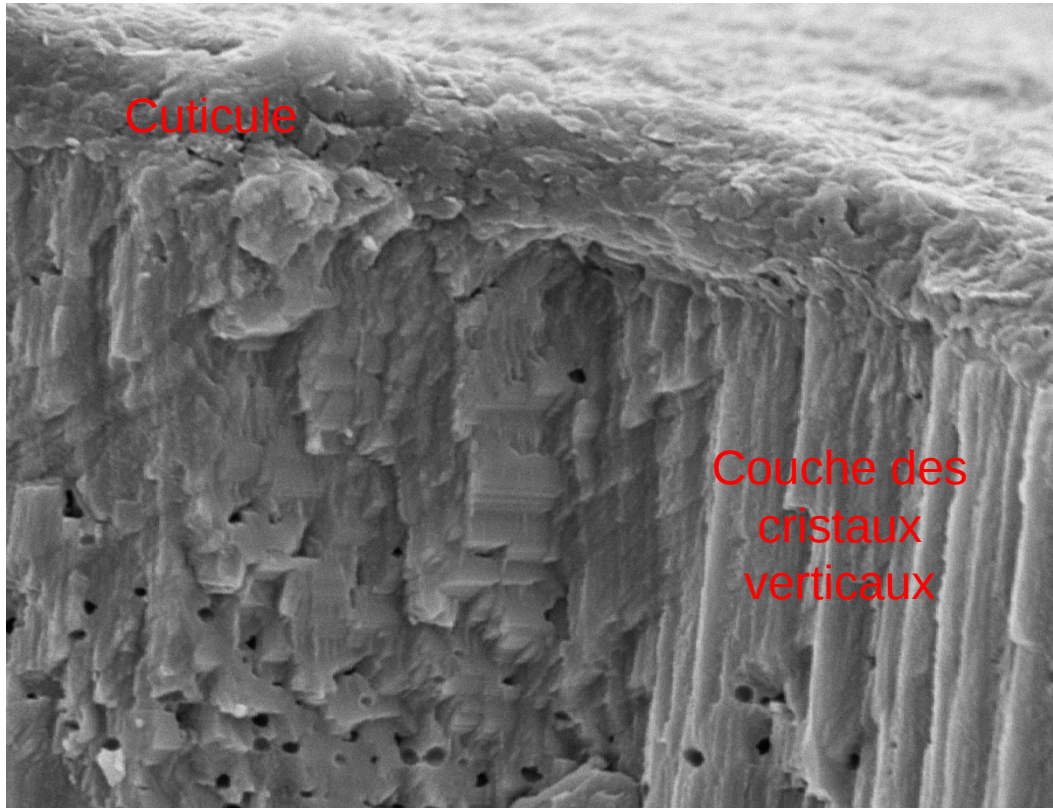
La phase terminale



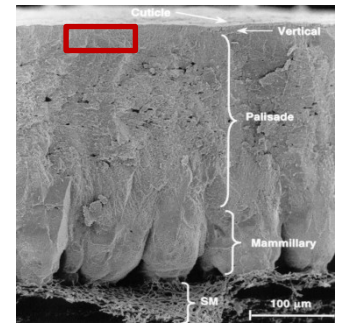
En surface de la couche calcifiée apparaît une
couche monocristalline de calcite
(Couche des cristaux verticaux)

La formation de la coquille

La phase terminale

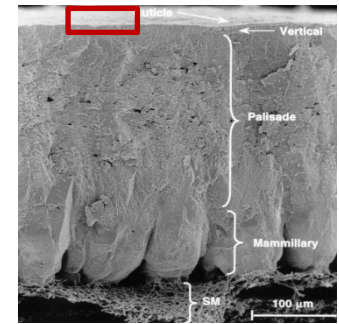
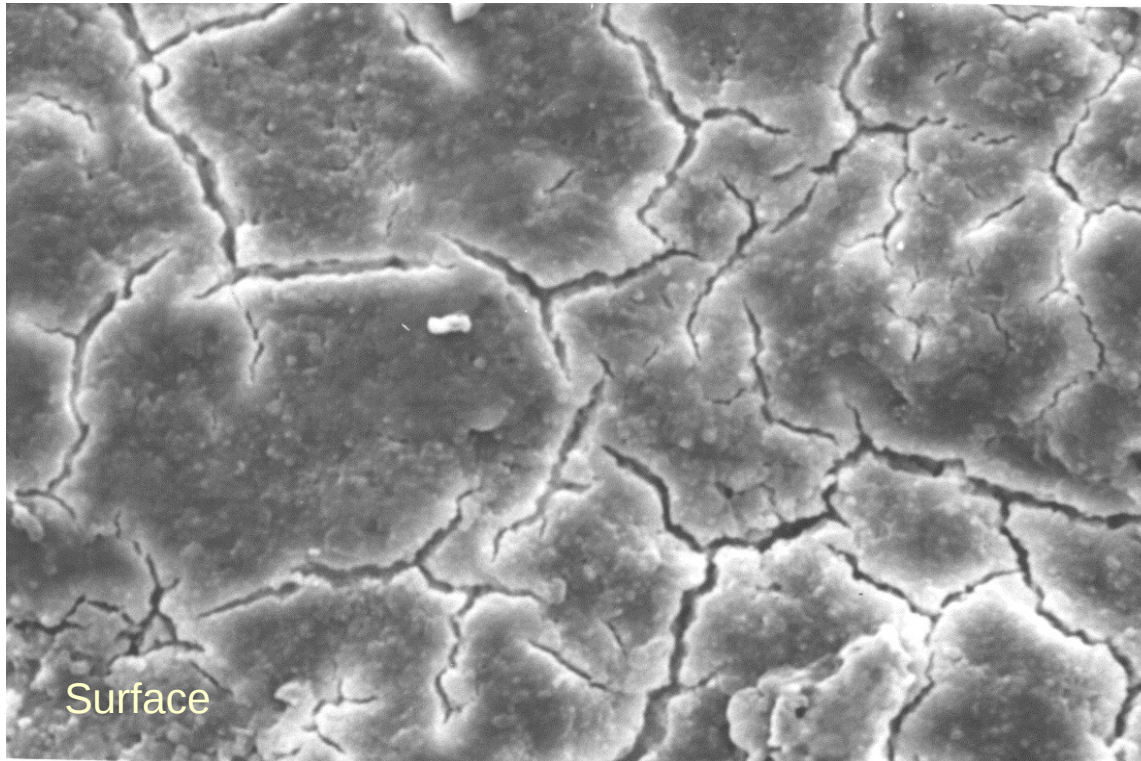


La minéralisation s'arrête. Une fine couche de matière organique vient se déposer en surface (cuticule)



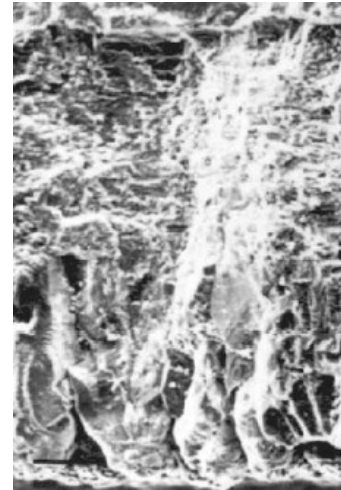
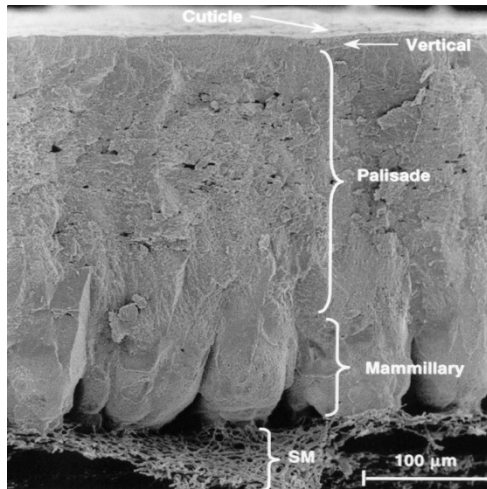
La formation de la coquille

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



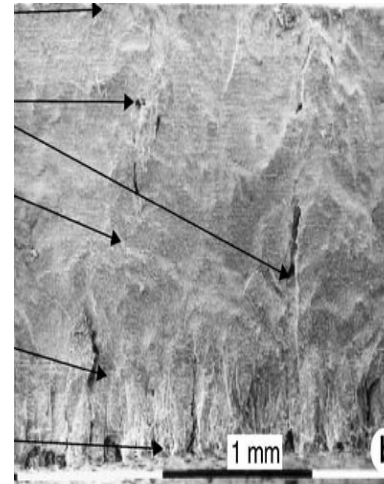
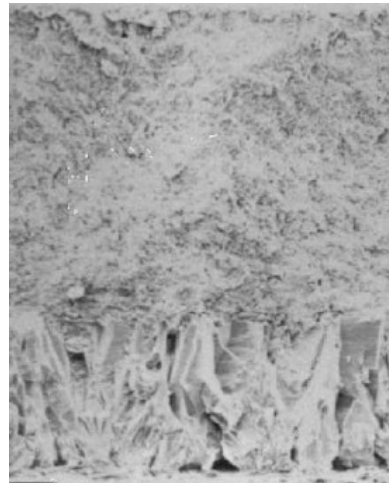
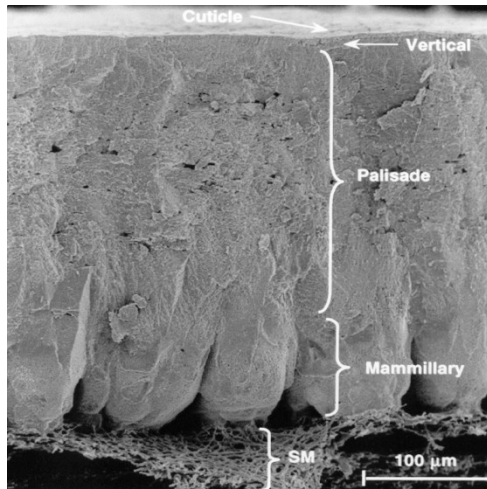
Meleagris gallopavo



Anas platyrhynchos

Similitude des coquilles d'œufs

□ PROCESSUS DE BIOMINÉRALISATION UNIVERSEL



Gallus gallus



Numida meleagris

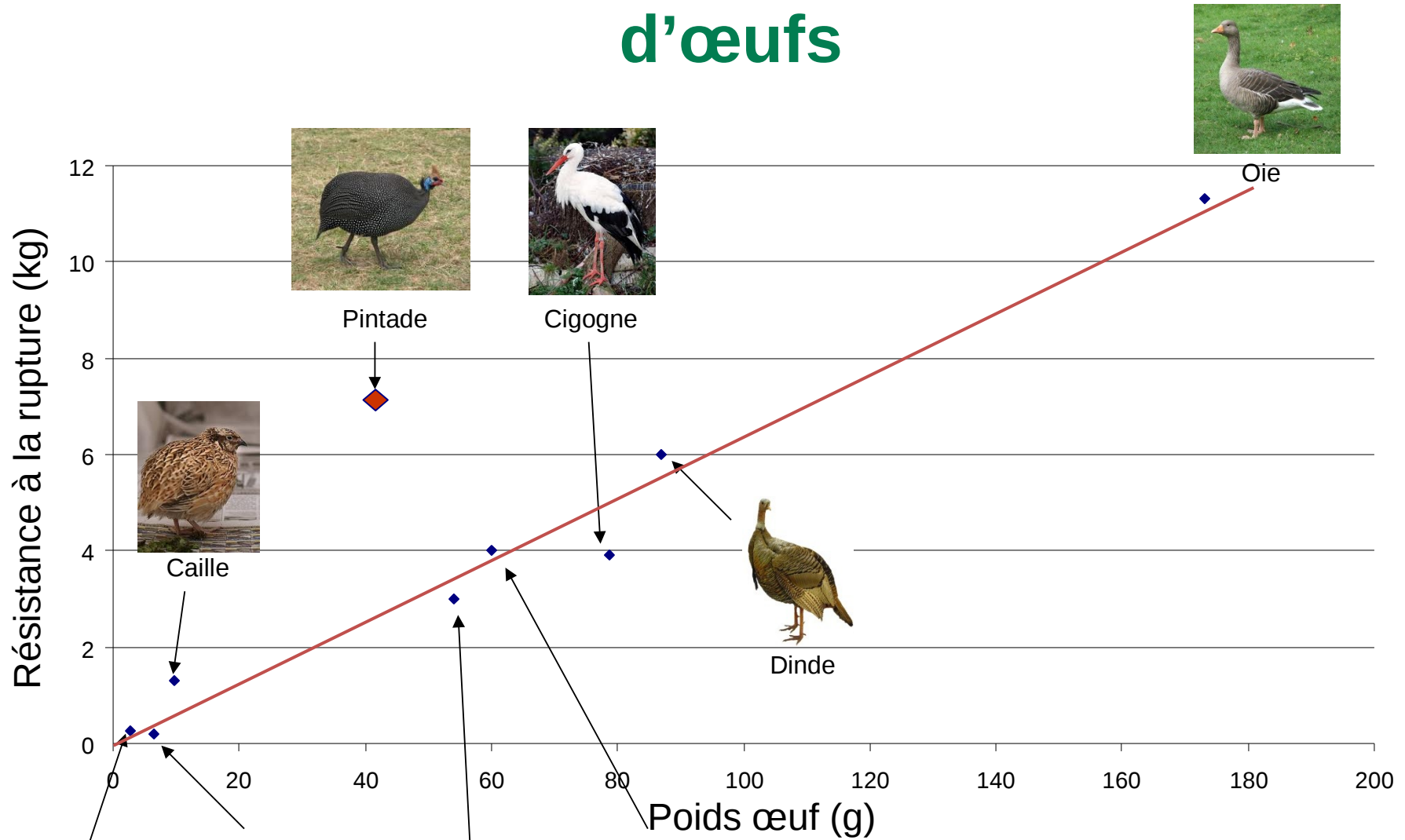


Struthio



Sankofa pyrenaica

Propriétés biomécaniques des coquilles d'œufs



Moineau



Merle noir



Canard



Poule

La formation de la coquille, un processus de biominéralisation

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



Gallus gallus



Meleagris gallopavo



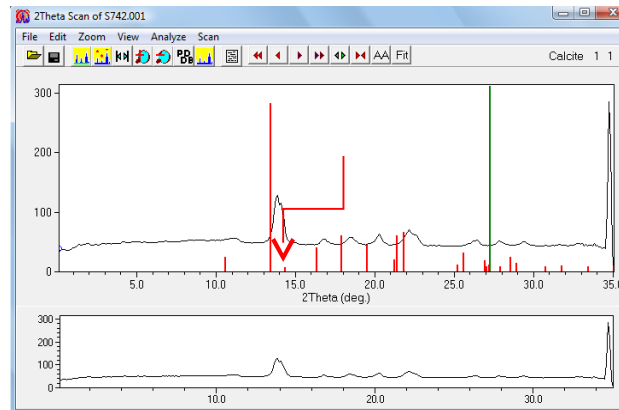
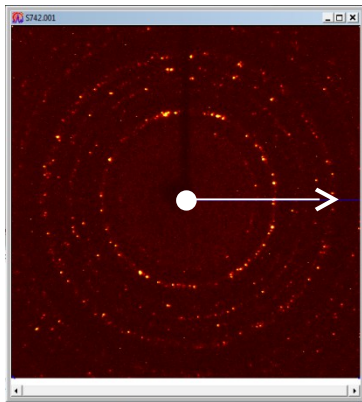
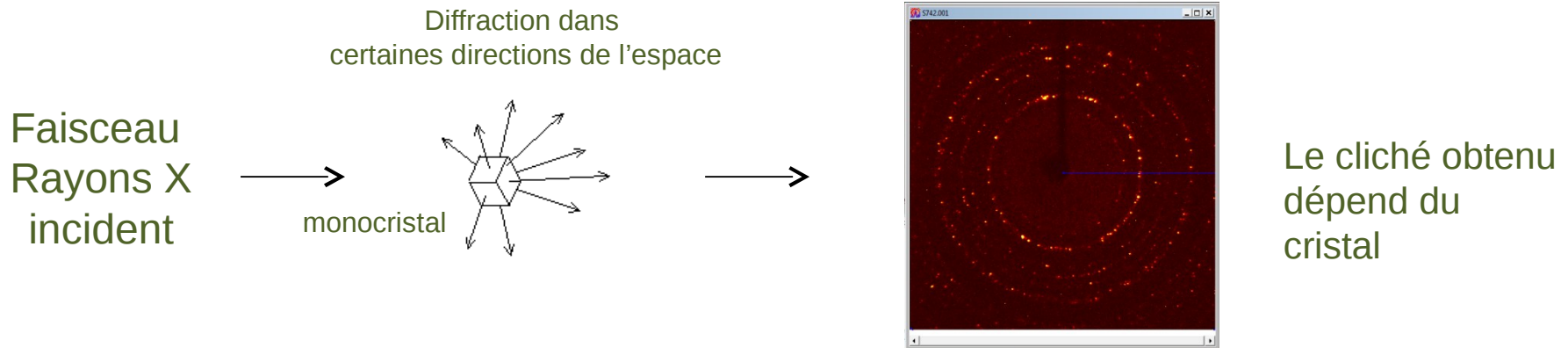
Numida meleagris



Sankofa pyrenaica

La formation de la coquille

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

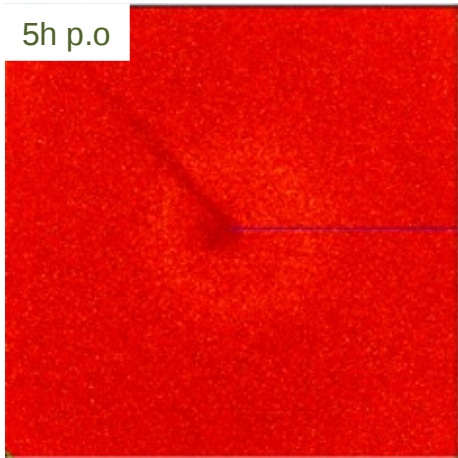


L'angle de diffraction est spécifique du type polymorphique du cristal (ici calcite)

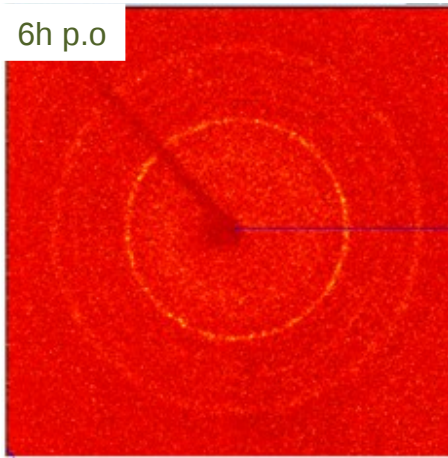
La formation de la coquille

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

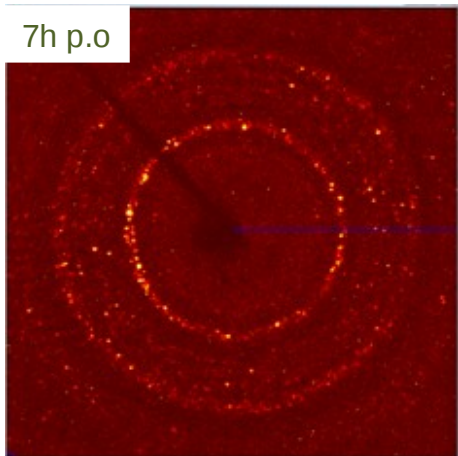
5h p.o



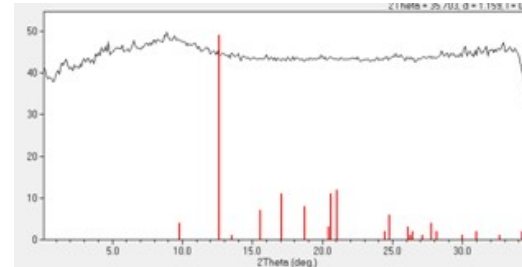
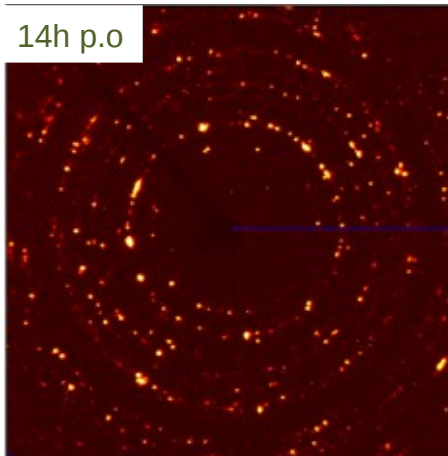
6h p.o



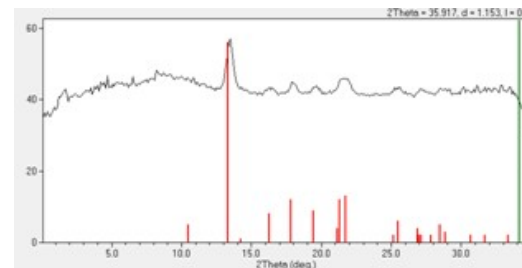
7h p.o



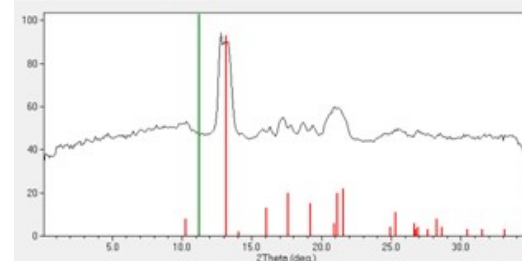
14h p.o



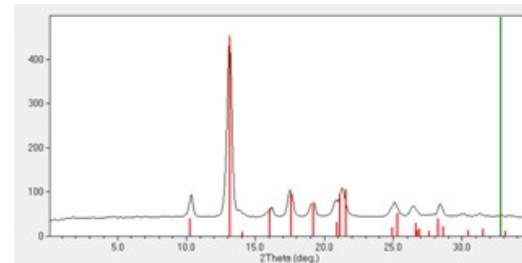
5h p.o :
pas de
cristal



6h p.o :
cristallisation
très faible



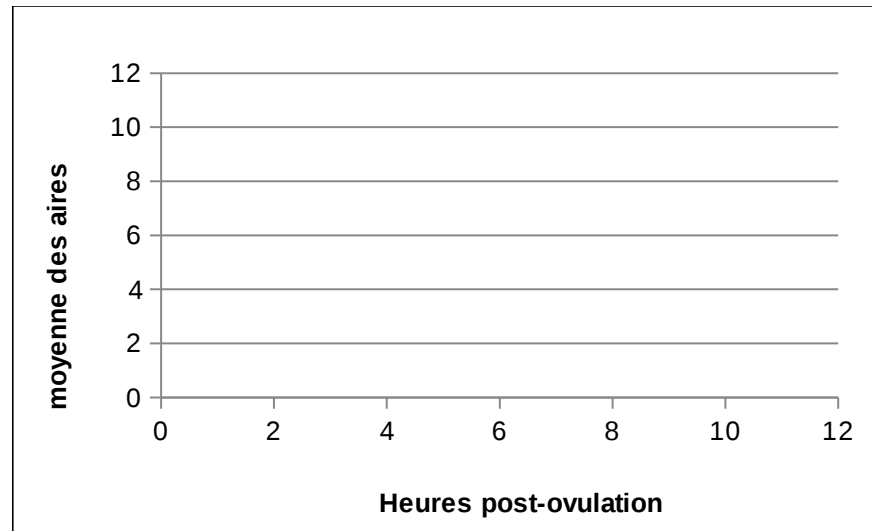
7h p.o :
cristal plus
organisé



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 $\text{Ca} + \text{CO}_3 \rightarrow \text{calcite}$

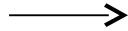
Hypothèse n°2 : passage par du carbonate de calcium amorphe (ACC) dans une phase transitoire avant d'obtenir la calcite $\text{Ca} + \text{CO}_3 \rightarrow \text{ACC} \rightarrow \text{calcite}$

□ Plus soluble, plus réactif, source temporaire de calcium

La formation de la coquille

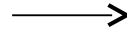
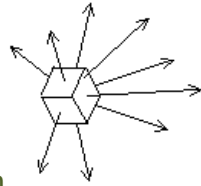
quantification du ratio CaCO_3 cristallin/ CaCO_3 total (FTIR)

Faisceau
IR
incident

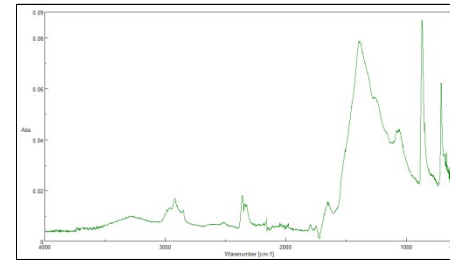


échantillon

Diffraction dans
certaines directions de l'espace



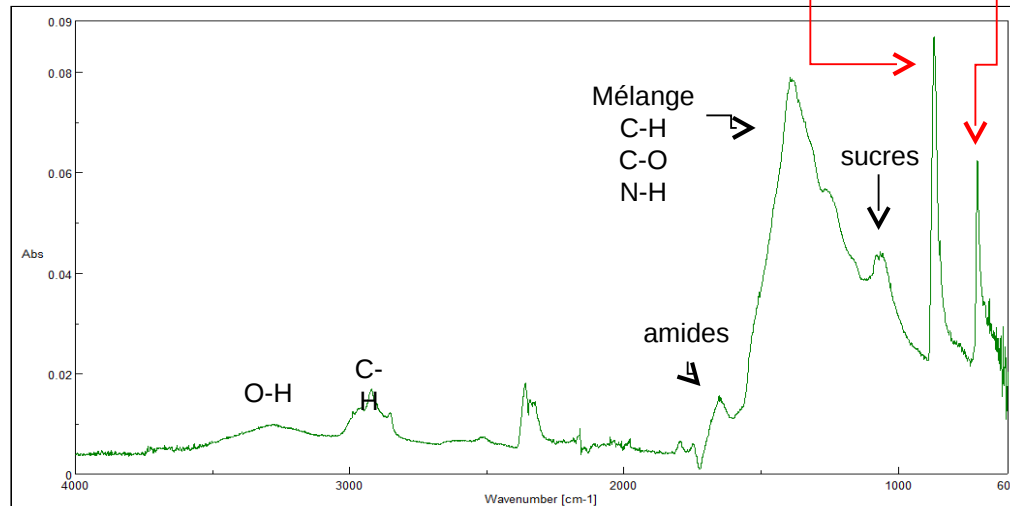
Spectre IR



Diffraction des IR
en fonction
des liaisons
chimiques présentes

carbonate de calcium total
(amorphe et cristallin)

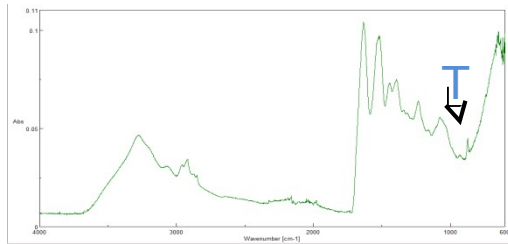
calcite **C**



La formation de la coquille

quantification du ratio CaCO_3 cristallin/ CaCO_3 total (FTIR)

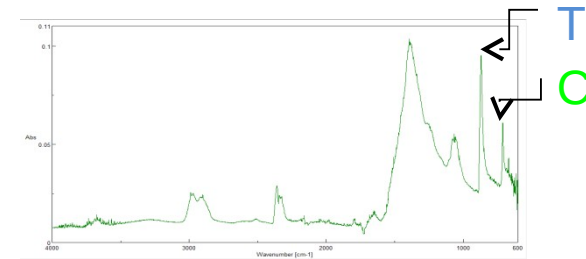
5h p.o



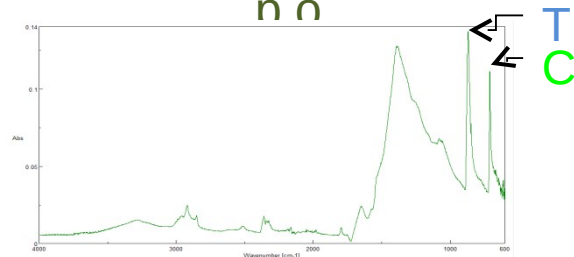
6h p.o



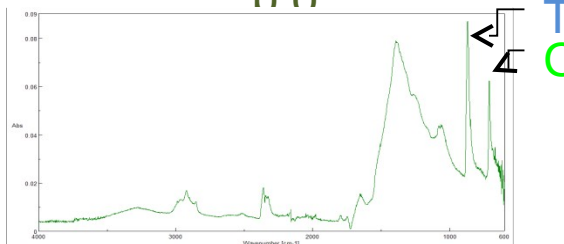
7h p.o



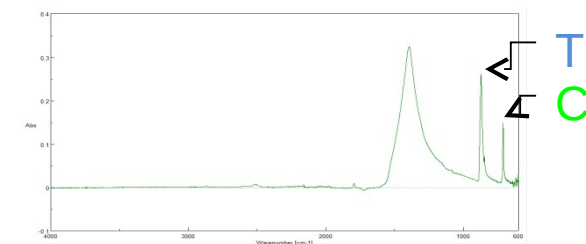
14h
n.o



16h
n.o

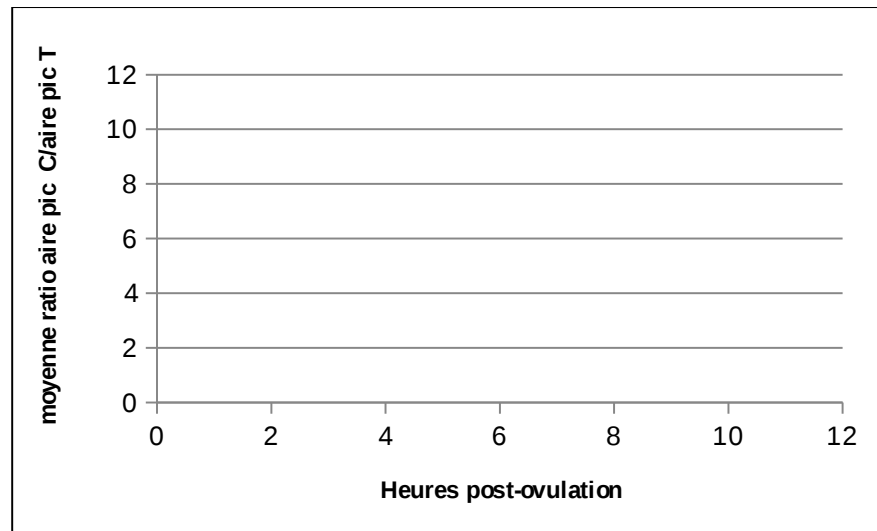


calcite pure



La formation de la coquille

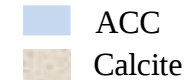
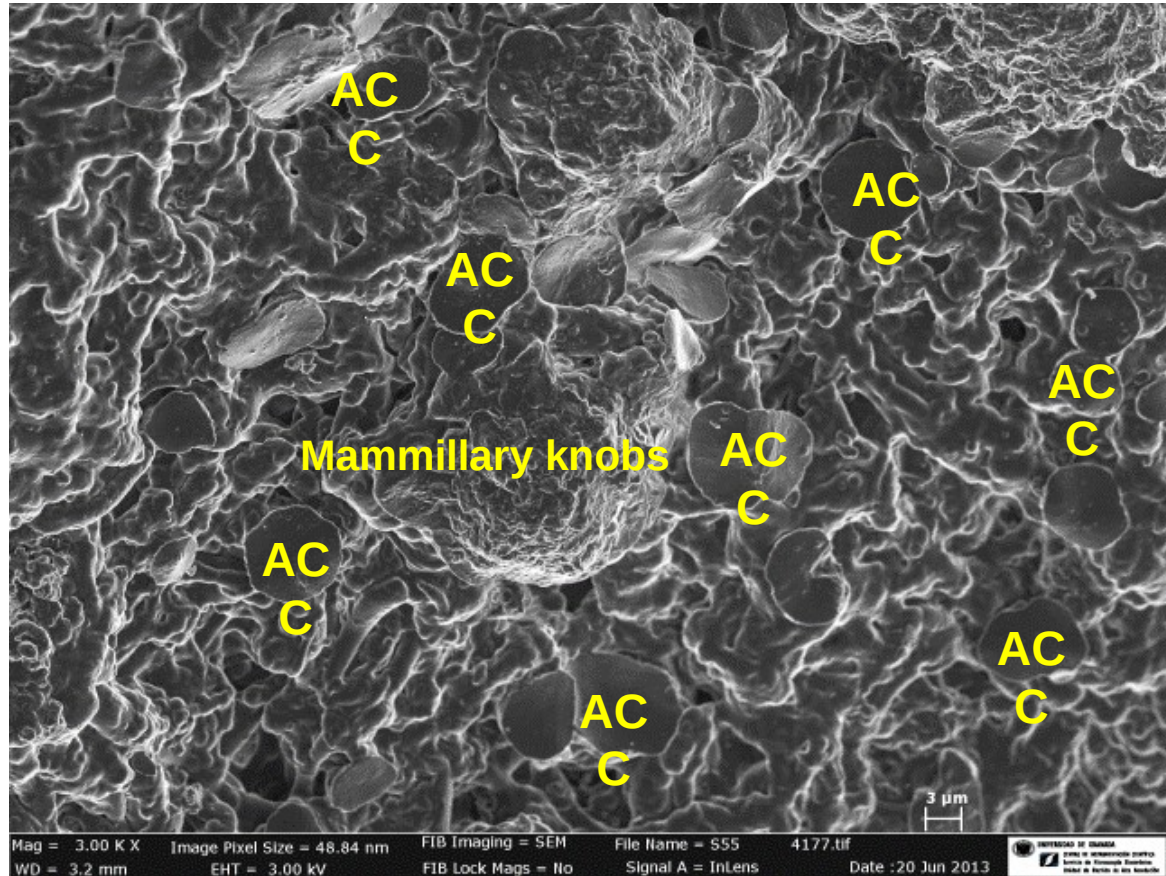
quantification du ratio CaCO_3 cristallin/ CaCO_3 total (FTIR)



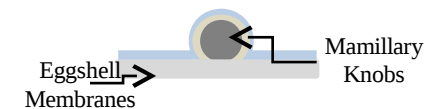
- ✓ CaCO_3 amorphe (ACC) aux stades précoces, mais une certaine orientation (proto-calcite)
- ✓ Augmentation du ratio aire pic C/aire pic T, qui traduit une transformation graduelle de l'ACC en calcite à tous les stades

La formation de la coquille

Role of amorphous calcium carbonate (ACC)



First nucleation events

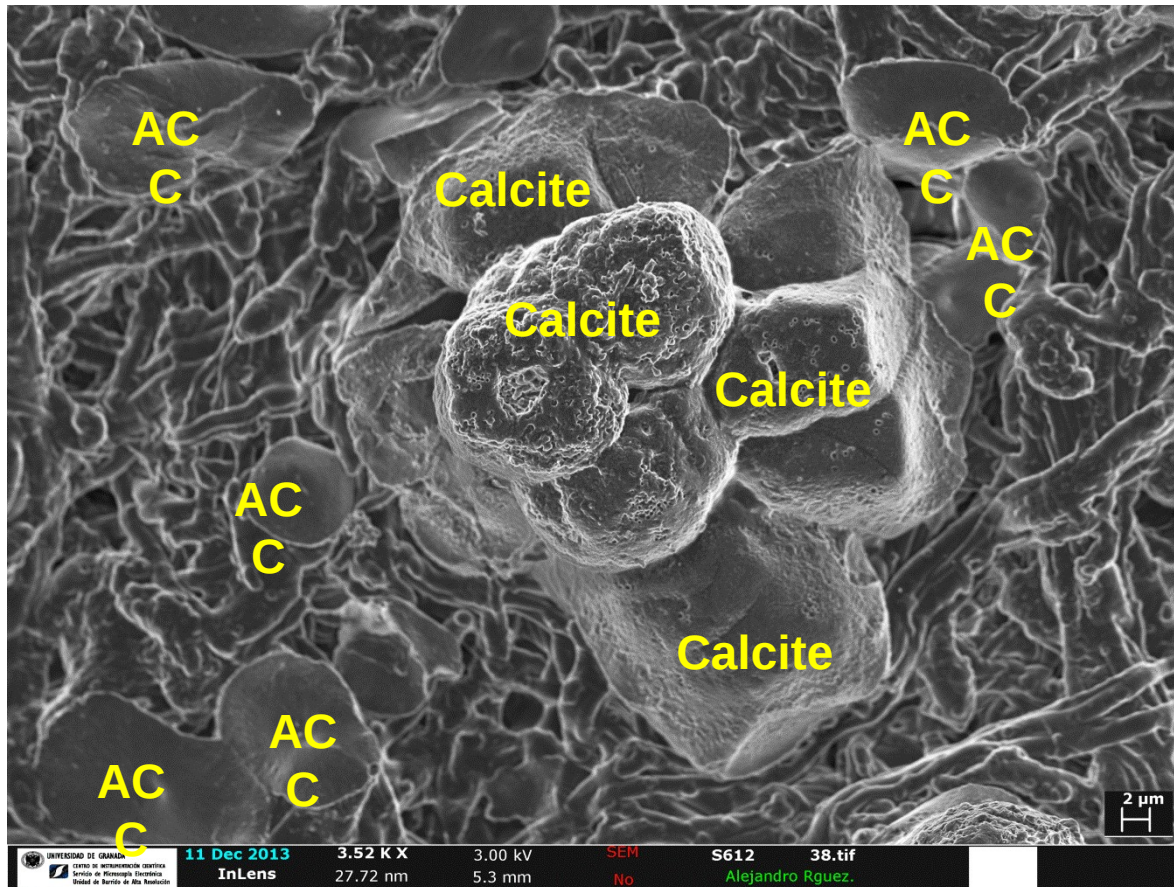


Time 1 (5-6 h Post ovulation):
ACC particles nucleate on the whole eggshell membranes.
Form massive deposits

La formation de la coquille

Role of amorphous calcium carbonate (ACC)

ACC
Calcite



Calcite formation



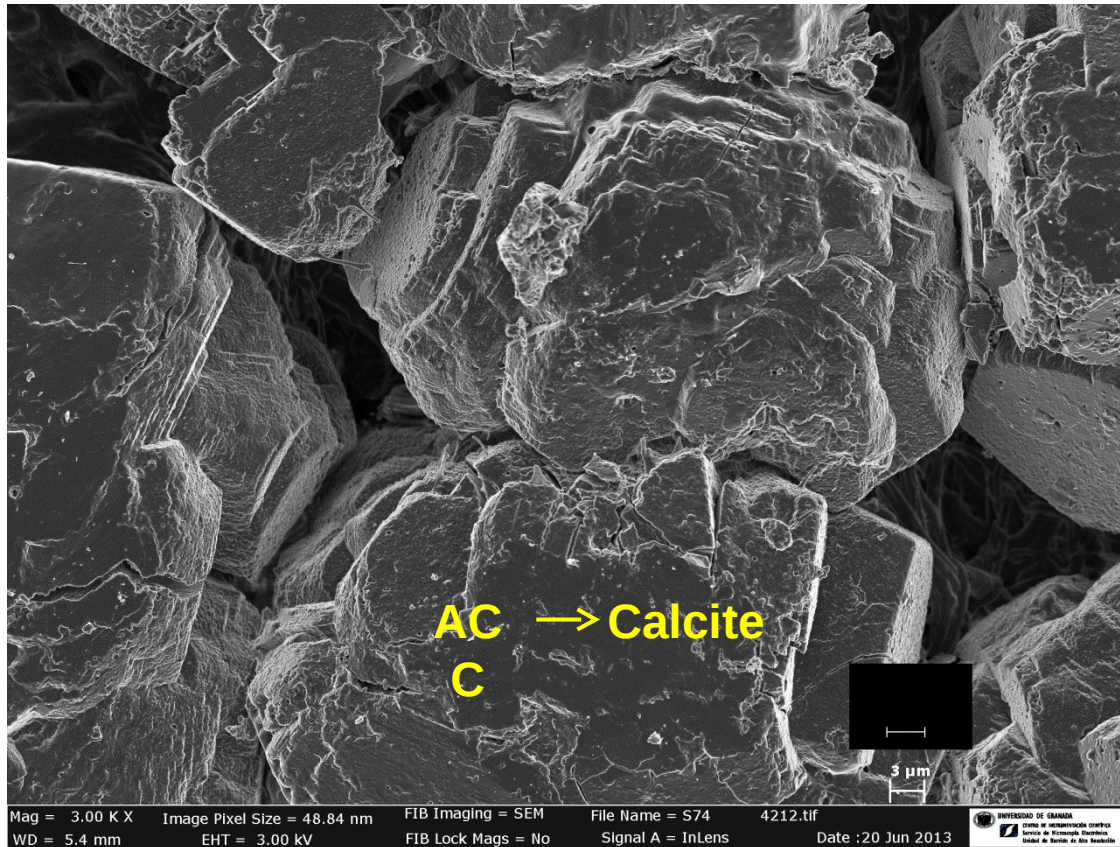
Time 2 (6-7 h post ovulation): Interface-coupled dissolution precipitation process

Direct transformation of ACC into calcite aggregates on mammillary knobs

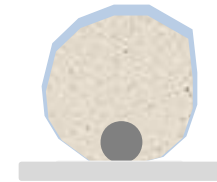
La formation de la coquille

Role of amorphous calcium carbonate (ACC)

ACC
Calcite



Large calcite crystal units deposition

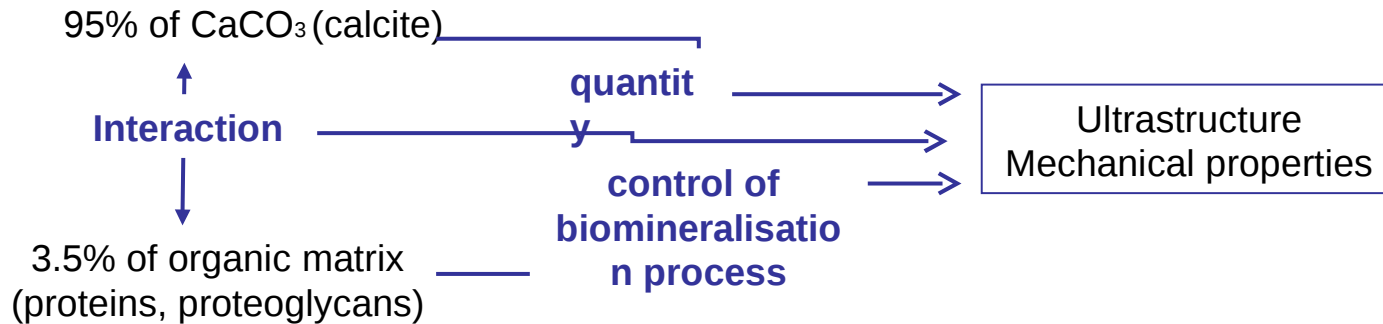


Time 3 (>7h post ovulation):
Additional cristallisation events
on calcite template

La matrice organique

✓ Organic matrix plays a key role

determine the texture of the shell and its resulting mechanical properties

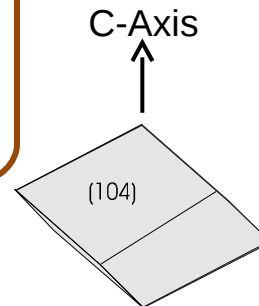


Calcium carbonate (calcite)

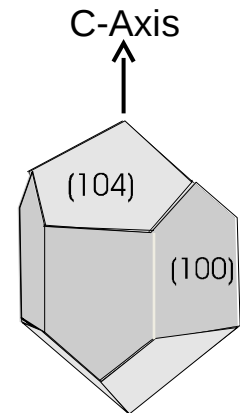


Organic matrix

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



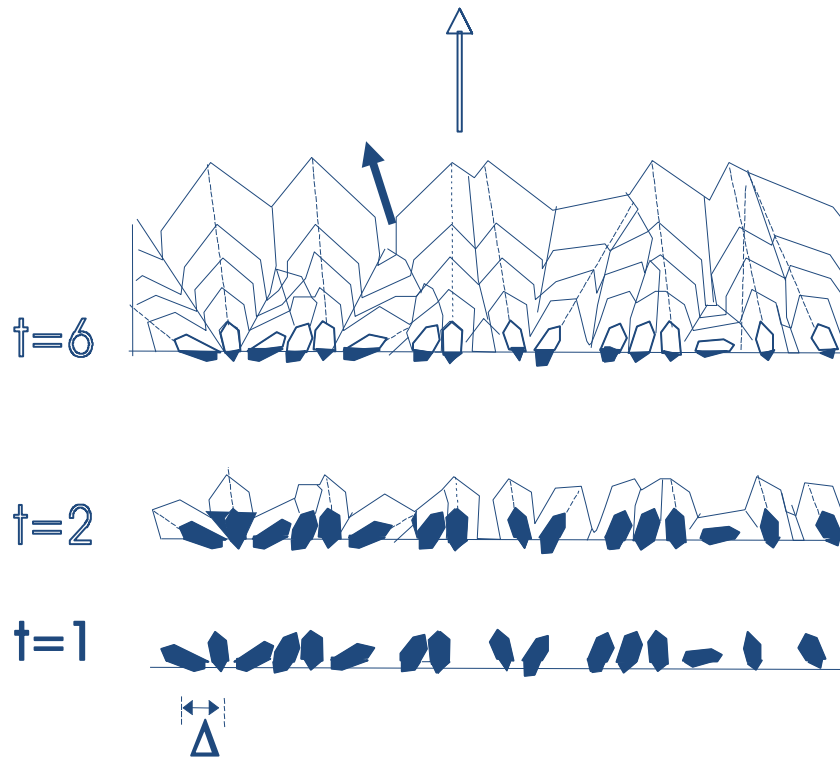
Interaction



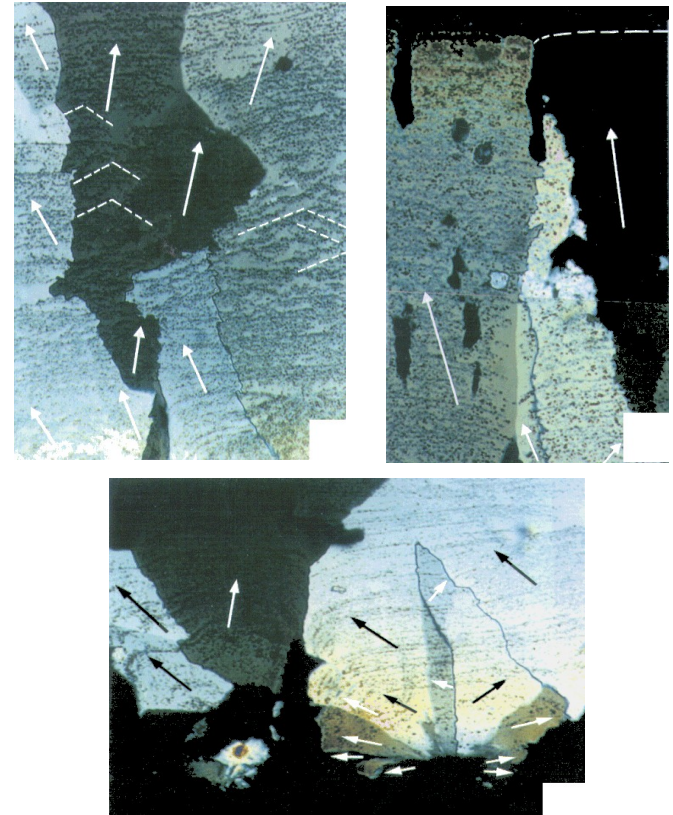
La matrice organique

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)

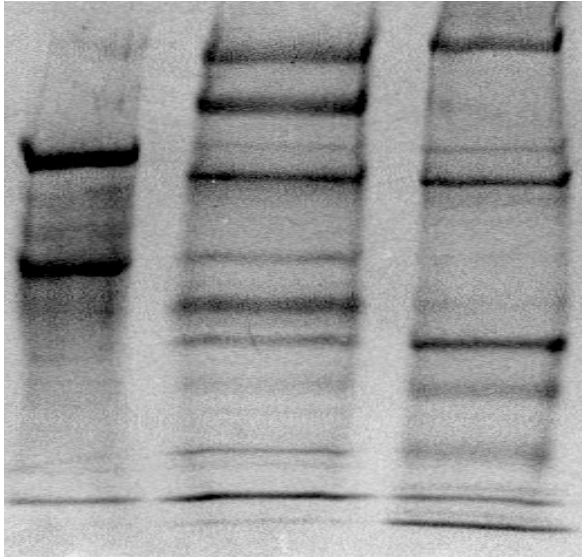


Rodriguez-Navarro et al., 2000; Nys et al., (2004)



Images: J.M. Garcia-Ruiz, Granada

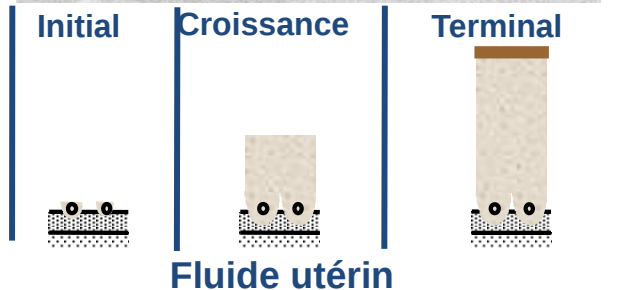
Protéines de la matrice et minéralisation de la coquille



Composition variable du fluide utérin au cours du processus de calcification



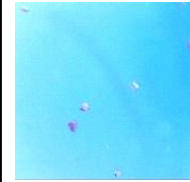
Adaptation du contenu organique selon le stade de minéralisation



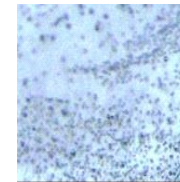
Protéines de la matrice et minéralisation de la coquille

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

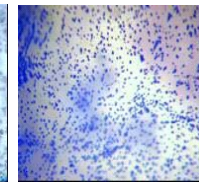
Augmente le nombre de cristaux



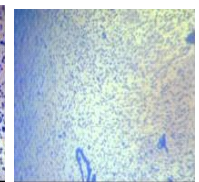
Témoins
40 cristaux



Initiale



Croissance



Terminale

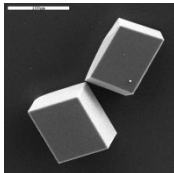
Fluide utérin >10 000 cristaux

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

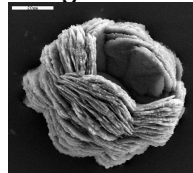
(Poultry Sci., 2000, 79, 901-907 ; J. Crystal Growth, 2008, 310, 1754-1759 ; Cryst. Growth. Des., 2008, 8, 4330-4339)

Favorise la calcite comme type polymorphique

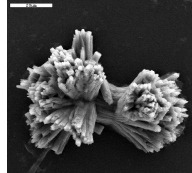
Calcite



Aragonite



Vatérite

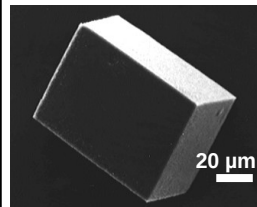


Témoins (%) 55
Fluide utérin (%) 100

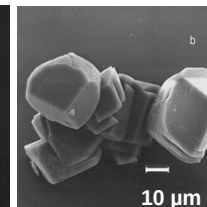
22.5
0

22.5
0

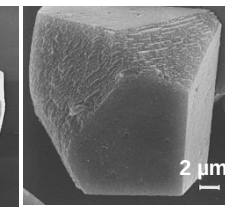
Modifie la morphologie des cristaux de calcite



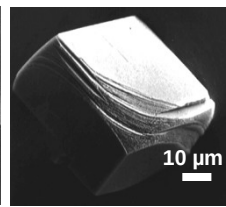
Témoin



Initiale



Croissance
Fluide utérin



Terminale

Identification des protéines de l'œuf

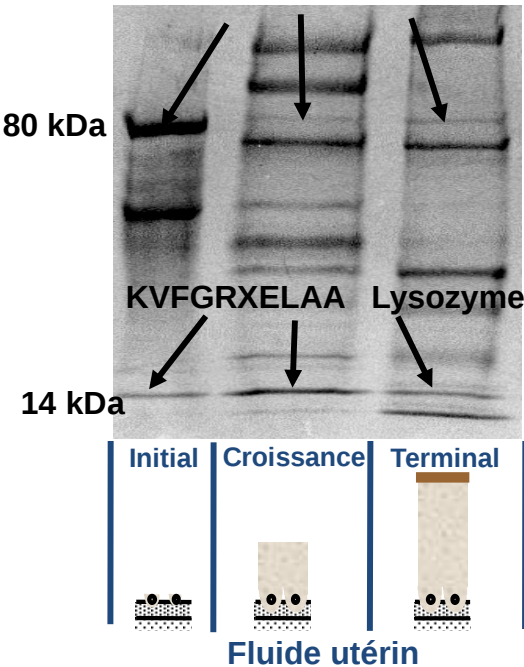
Les techniques classiques

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

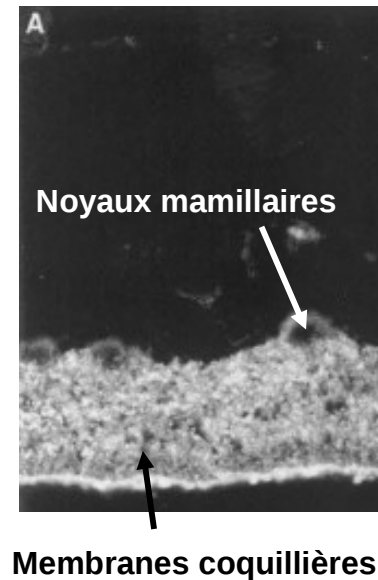
Les protéines préalablement identifiées par des techniques « classiques »

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

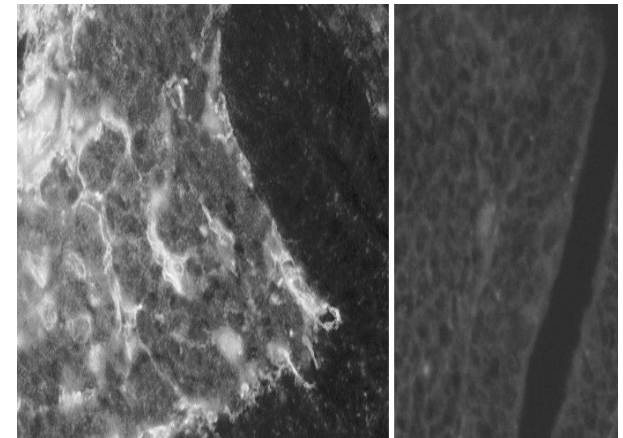
APPKSVIRXXTISS Ovotransferrine



Localisation du lysozyme dans la coquille



Origine utérine de l'ovotransferrine



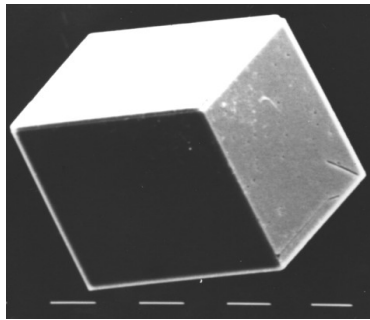
- **Présentes dans la coquille**
- **sécrétées par les tissus où se forme la coquille**

Les protéines préalablement identifiées par des techniques « classiques »

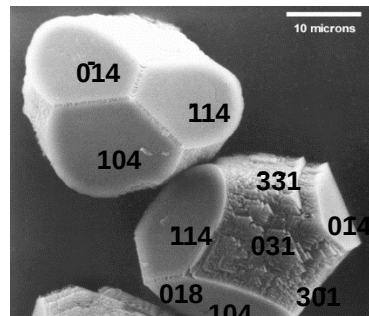
□ **lysozyme** (*Matrix Biol.*, 2000, 19, 443-453) **et ovotransferrine** (*Connect. Tissue. Res.*, 2001, 42, 225-267)

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

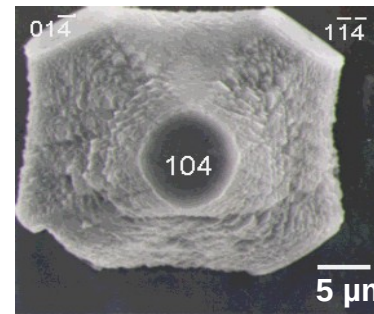
Interaction avec le carbonate de calcium



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)

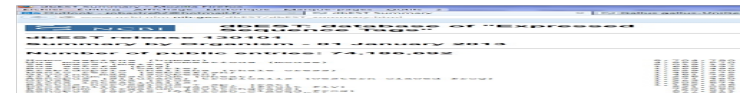
Les développements récents

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



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

- ✓ 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,
...)

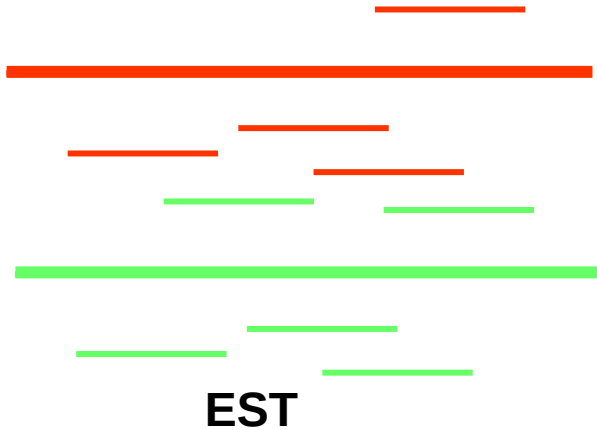
Différentes conditions :
(embryons, jeunes, adultes, males, femelles,
facteurs nutritionnels...)

→ ARNm → cDNAs

↙
Clonage
dans des
bactéries

↘
**Séquence partielle
du cDNA cloné
(EST)**

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

ERLPWPQVPGVMHPLNPKHREAV

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	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

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

ERLPWPQVPGVMHPLNPKHREAV

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	KQIQEED HR FYE(YLQ)
K7a	KQSTEHTGYLLAQVSS(V)K
K7b	QSTEHTGYLLAQVSS(V)K
K8	YLVWTLGHPIRVK
K9	FIVLLHEIPTQQLNVX(H)
K10	KPITANYIPDS(N)GNIA(HDH)

Traduction en séquences
nucléotidiques
(code dégénéré)

Recherche dans les bases de données
Banques de séquences 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

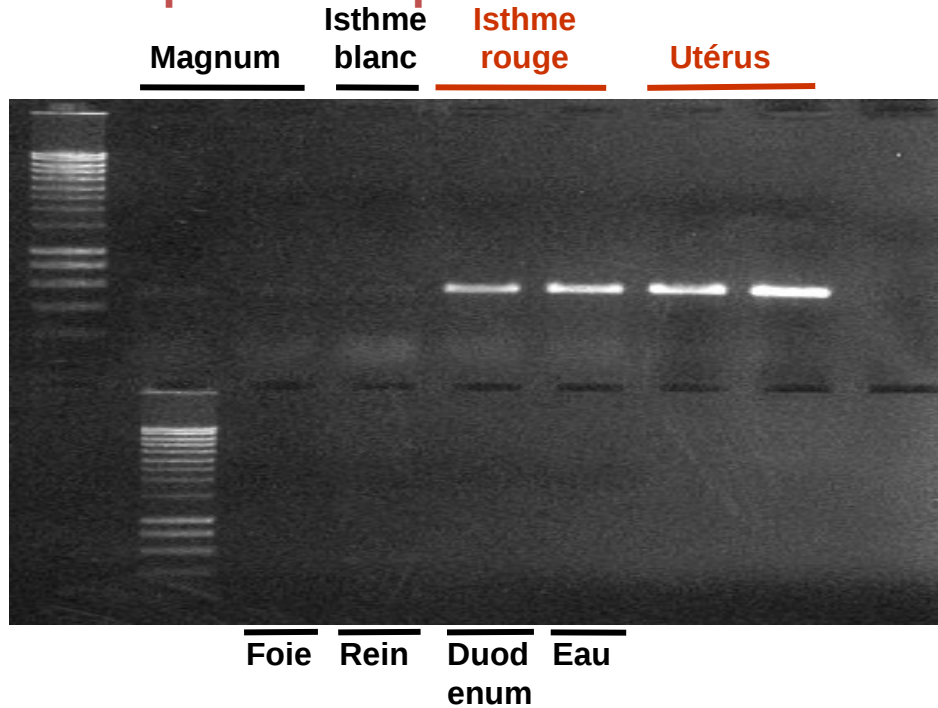
EFGTSAAERLPWPQVPGVMRPLNPSHREAVWAAWTALHYINSHEASPSRP
LALHKVVKAASKMIPRLGWKYYVHCTTEGYIHGENAGSCFATVLYLK**KSP**
P**VVHGK**CVHAQNK**KQIQEED**HRFYEYLQH**QKKPITANYIPDS**NGNIAHDH
LQLW**GLAIVGSSYIMWKQSTEHTGYLLAQVSSVKQ**IRKDNAVAFAFKFIVL
LHEIPT**QQLNVCHMYLVWTLGHPIRVKYSCAPDNHGLE**DGSGQDSGSAAG
TSHET**KGNF**

Banques cDNA et EST

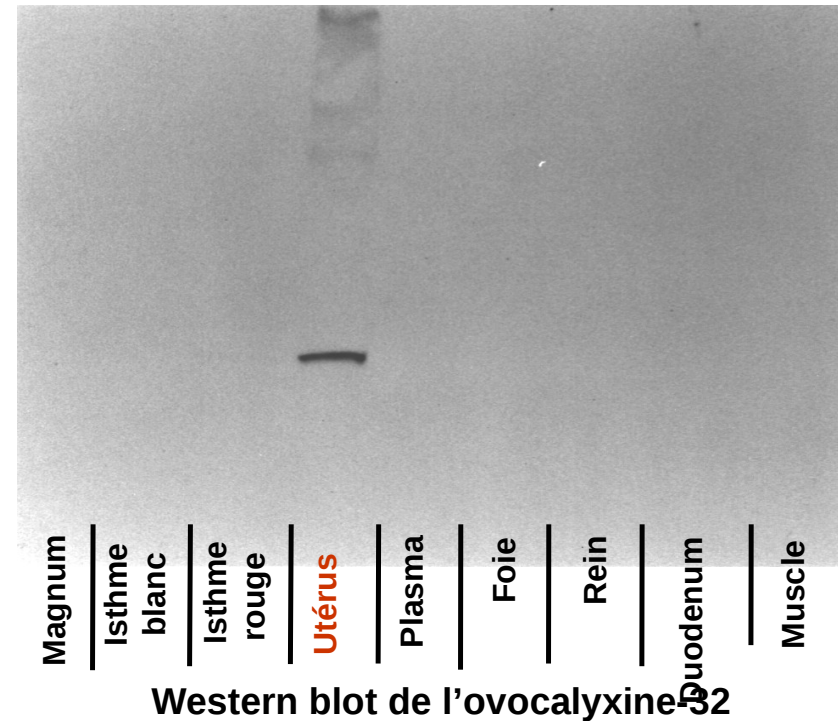
- Nouvelles séquences protéiques non identifiées au préalable (protéines spécifiques de la coquille)

□ **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

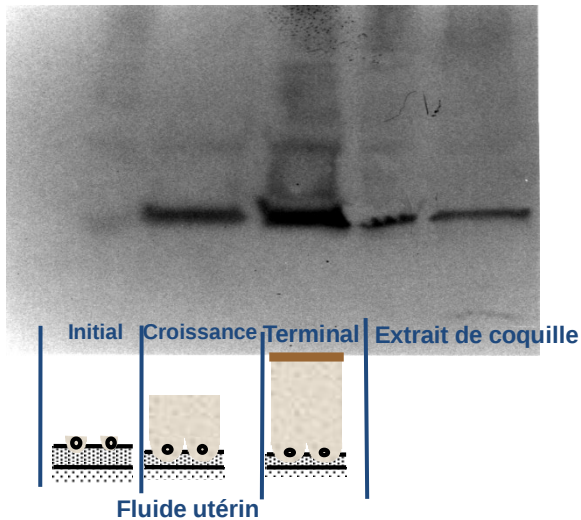
Banques cDNA et EST

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

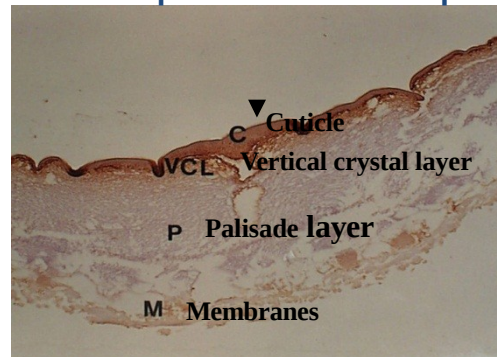
□ **Ovocalyxin -32** (*J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 39243-39252)

- Impliquée dans le processus d'arrêt de la calcification

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)

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.

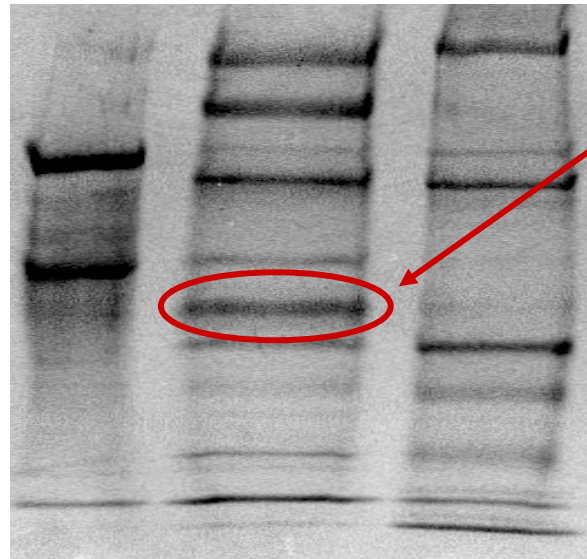
Cloning of Ovocalyxin-36, a Novel Chicken Eggshell Protein Related to Lipopolysaccharide-binding Proteins, Bactericidal Permeability-increasing Proteins, and Plunc Family Proteins*

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^{†1}, 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

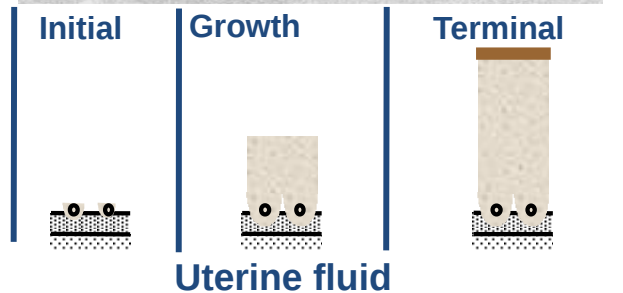


36 kDa Band

N-terminal Amino acid sequencing :
VLGSGLSCAISPRAMQQVLSDAIQTGGL

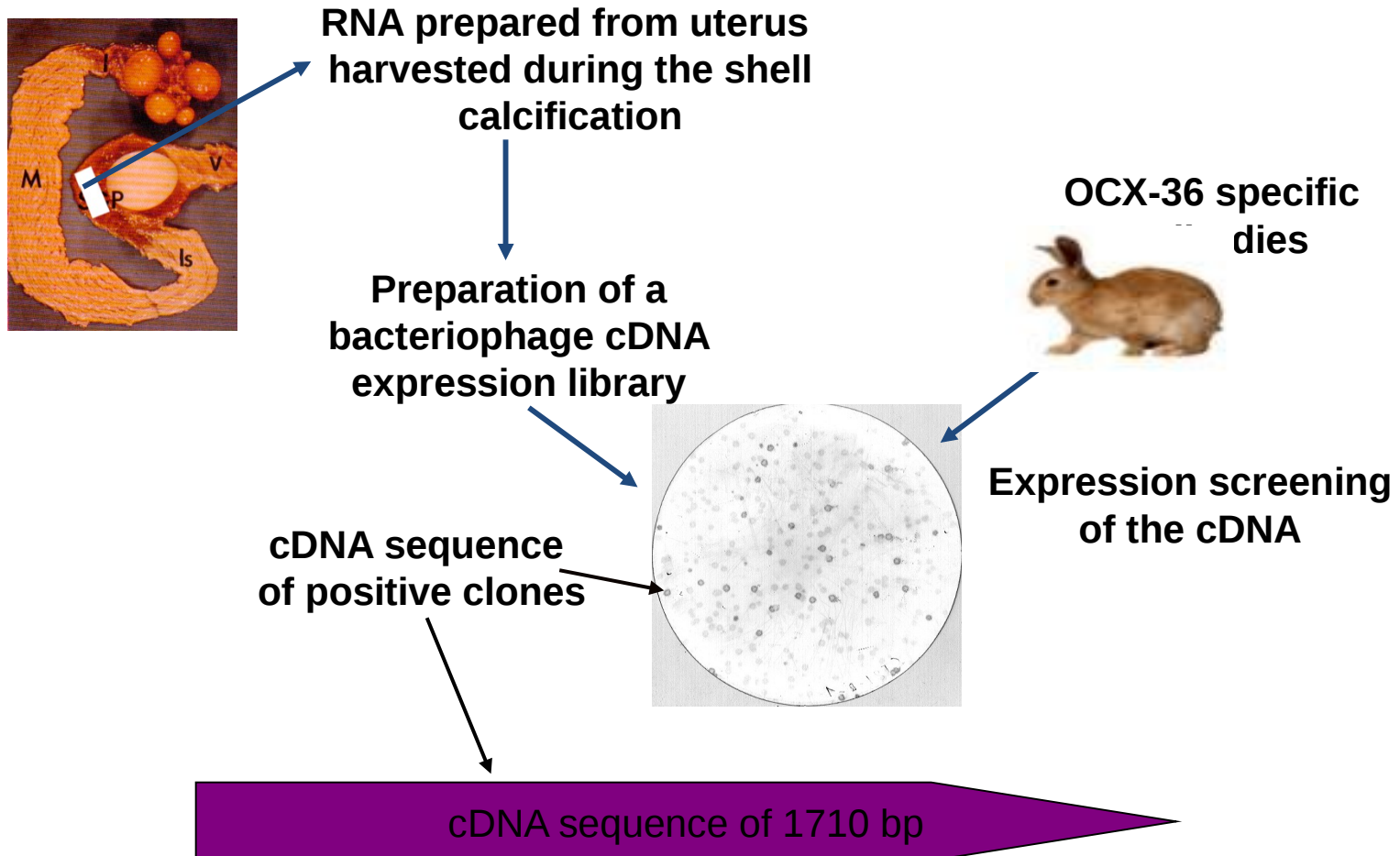
No correspondences in databases

Specific antibodies



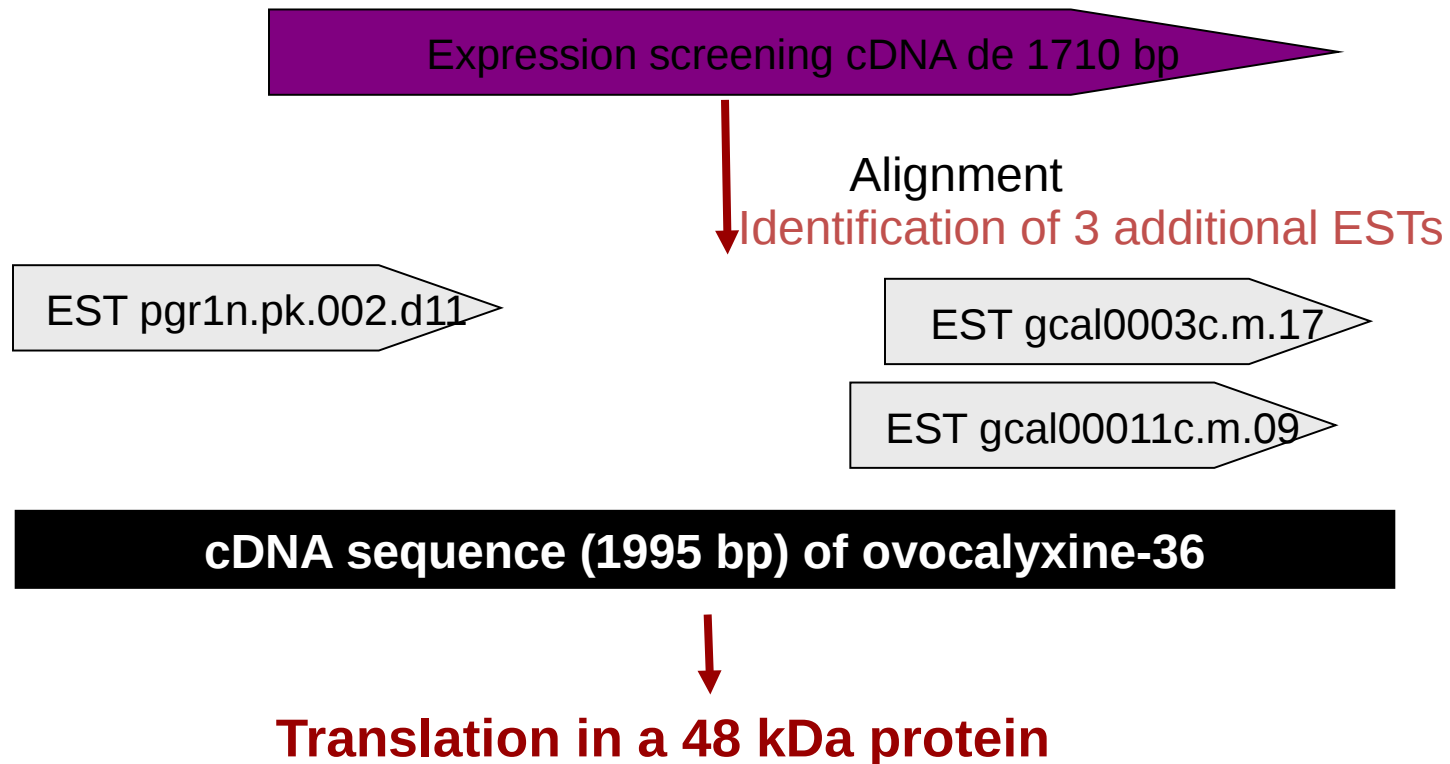
Utilisation combinée des banques cDNA, EST, génomique et outils de bioinformatique

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}

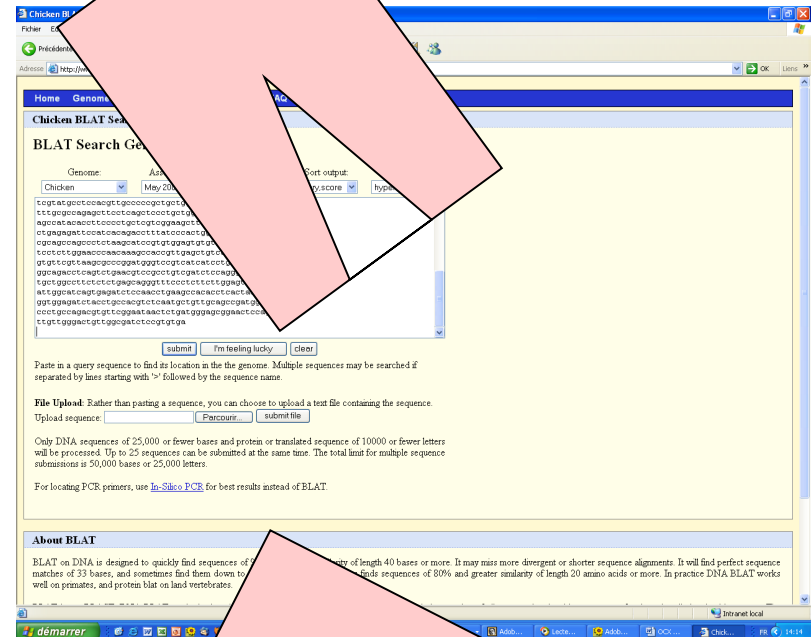
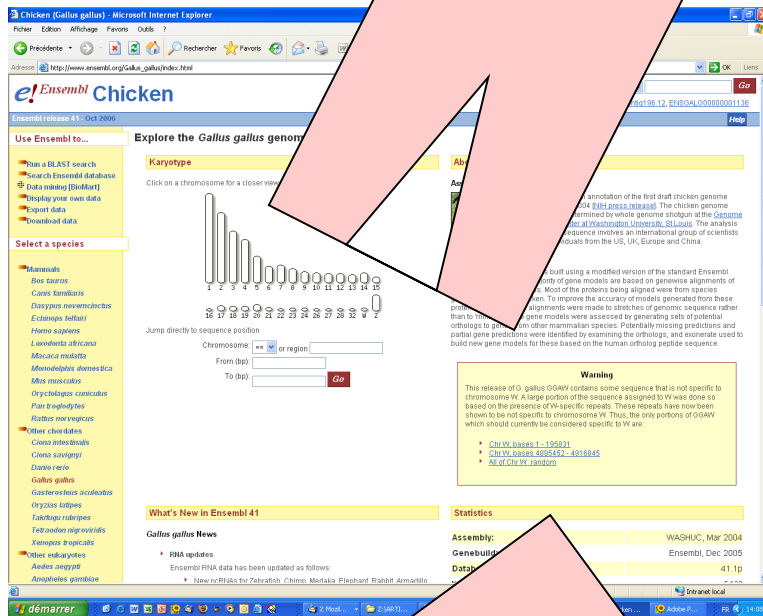
Utilisation combinée des banques cDNA, EST, génomique et outils de bioinformatique

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

5'

3'

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



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

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

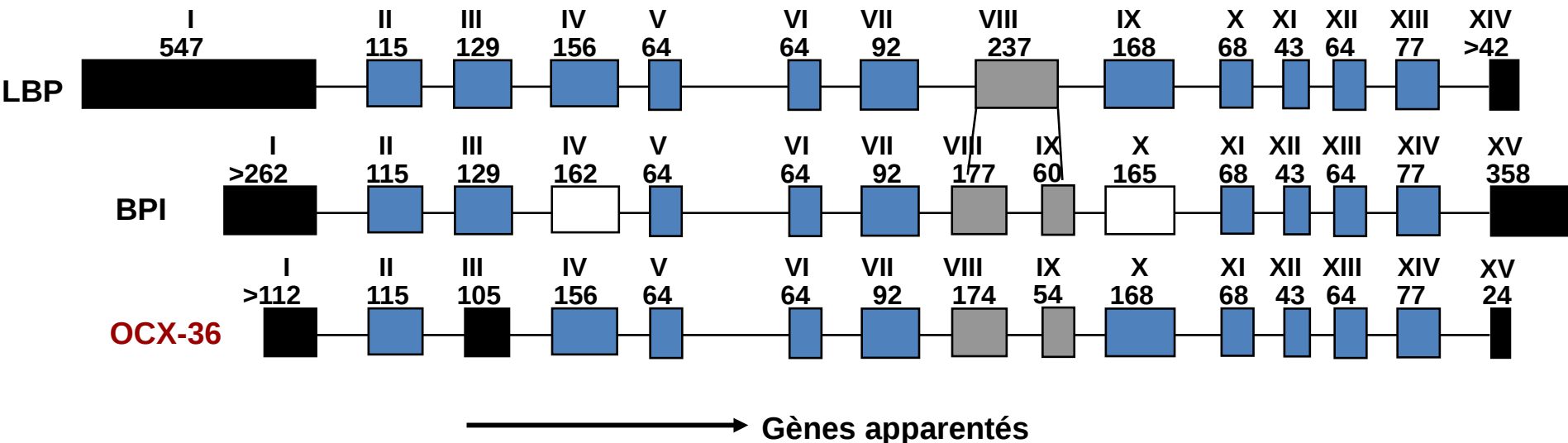
Ovocalyxin-36, une protéine spécifique de la matrice organique de la coquille

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

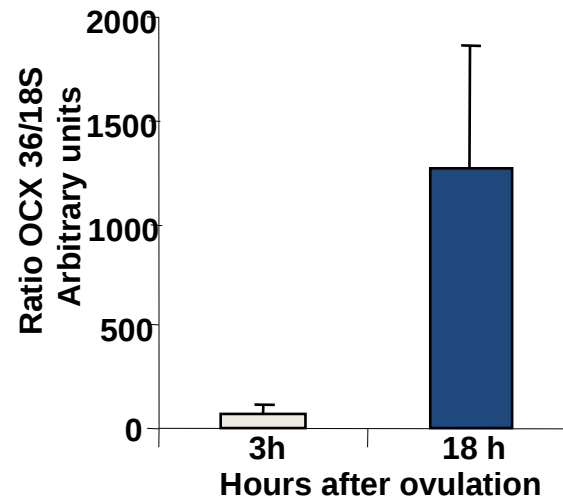
Architecture du gène



Utilisation combinée des banques cDNA, EST, génomique et 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

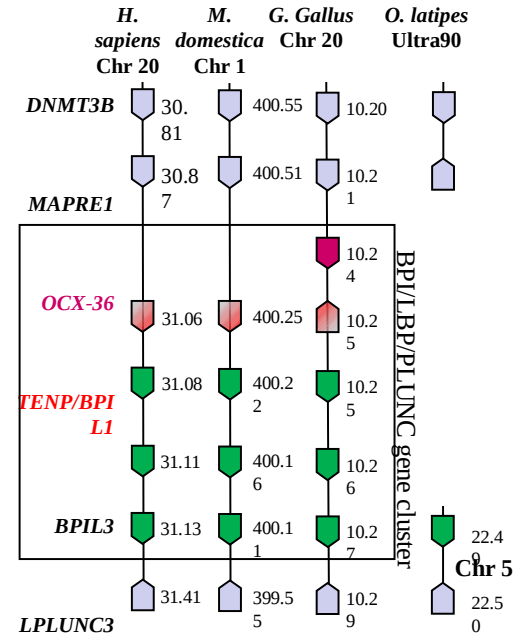
BIOLOGY OF REPRODUCTION 83, 893–900 (2010)
Published online before print 11 August 2010.
DOI 10.1095/biolreprod.110.085019

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 BPI/LBP/PLUNC-like gene repertoire in chickens reveals the absence of a LBP gene^{2*}

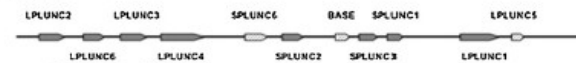
Shih-Chieh Chiang^{a,1}, Edwin J.A. Veldhuizen^b, Frances A. Barnes^a, C. Jeremy Craven^c, Henk P. Haagsman^b, Colin D. Bingle^{a,*}

^a Academic Unit of Respiratory Medicine, Department of Infection and Immunity, University of Sheffield, Sheffield S10 2JF, UK

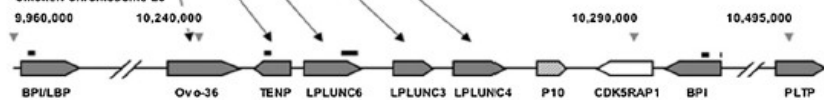
^b Department of Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, P.O. Box 80165, 3508 TD Utrecht, The Netherlands

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

Human Chromosome 20

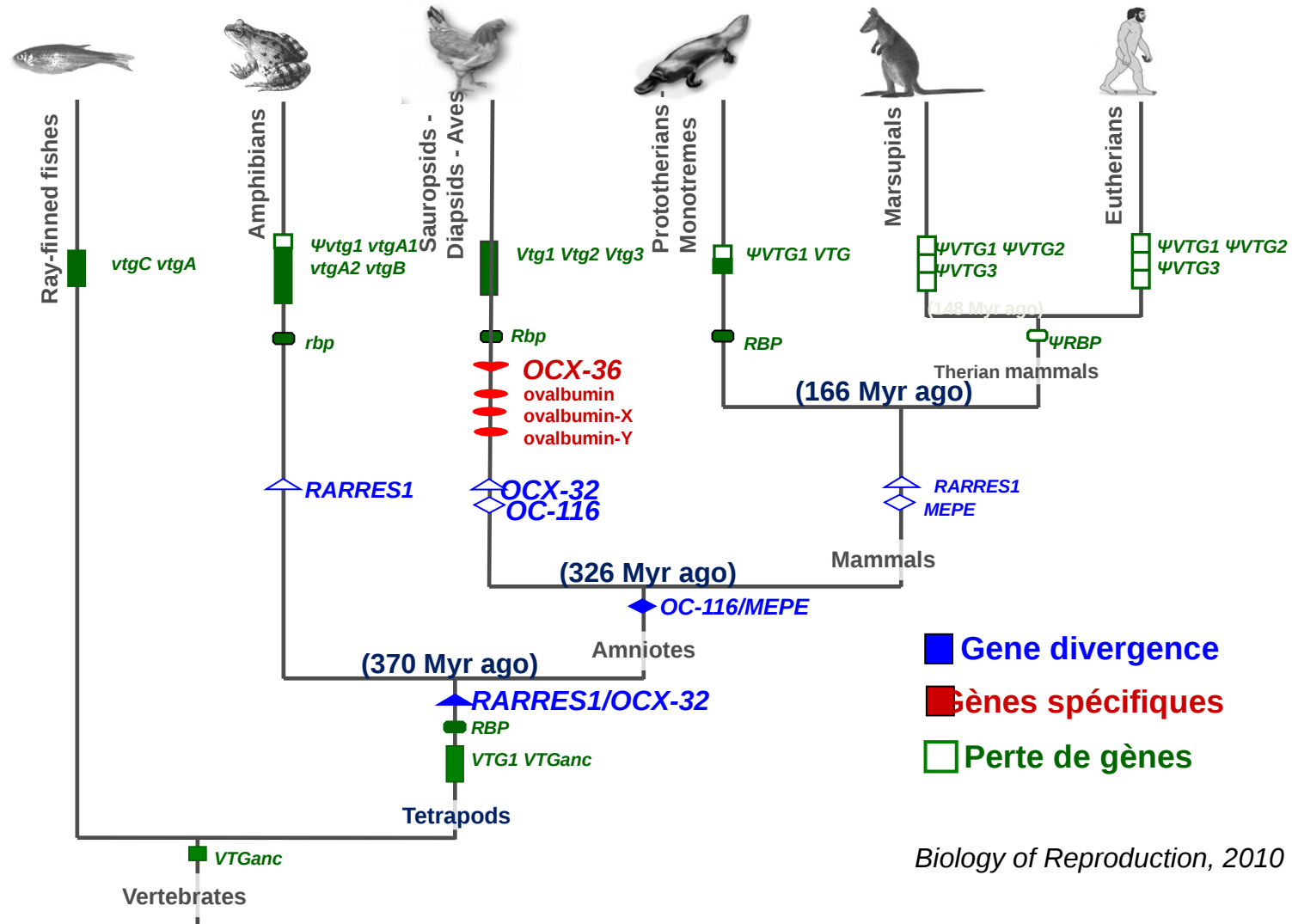


Chicken Chromosome 20



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

Ovocalycin-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

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

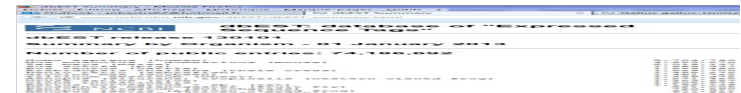
33,838	mRNAs
683	Models
0	HTC
11,088	EST, 3reads
418,700	EST, 5reads
79,390	EST, otherunknown
543,699	total sequences in clusters

UniGene Links

- Clusters
- Library Browser
- DDD
- Query Tips
- FAQ
- Finding cDNAs

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

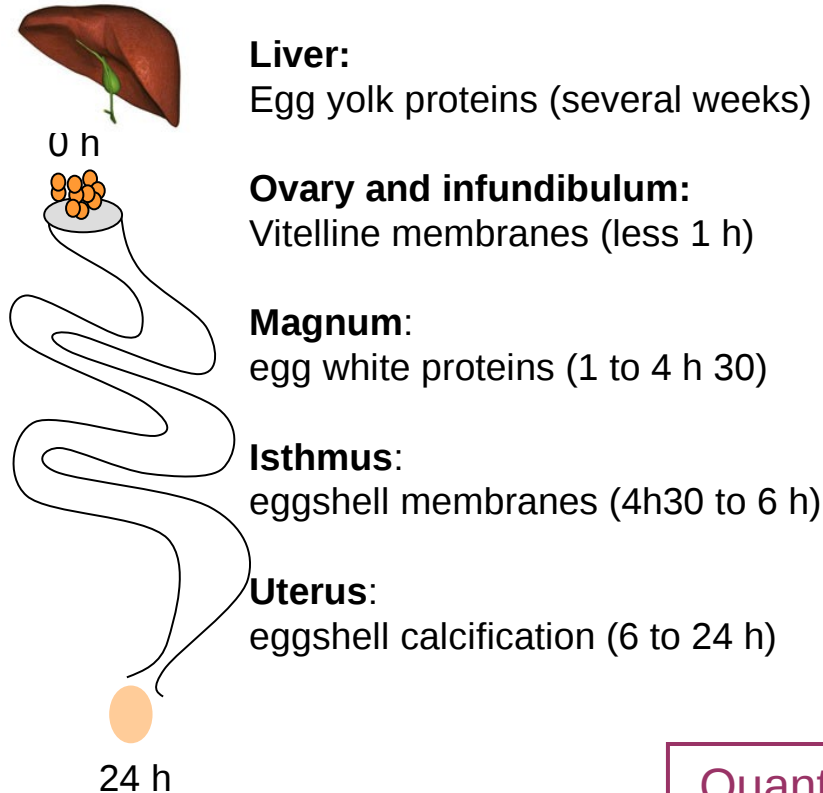
✓ cDNA and ESTs libraries
(Identification of 600 434 functional genes in chickens)



« 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*)



Liver: 582 ←
Egg yolk proteins (several weeks)

0 h



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)

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.

Jingwen 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*}

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*

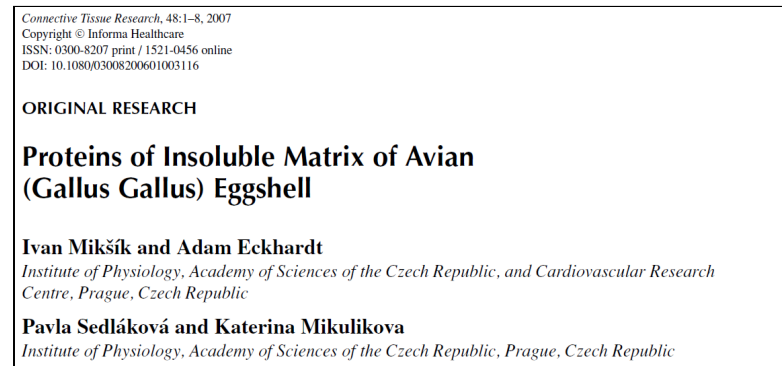
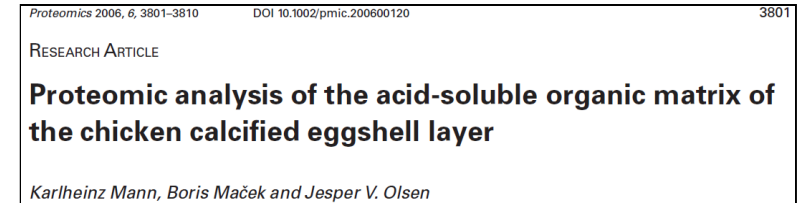
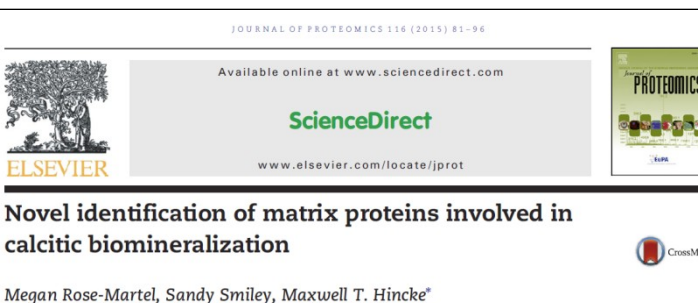
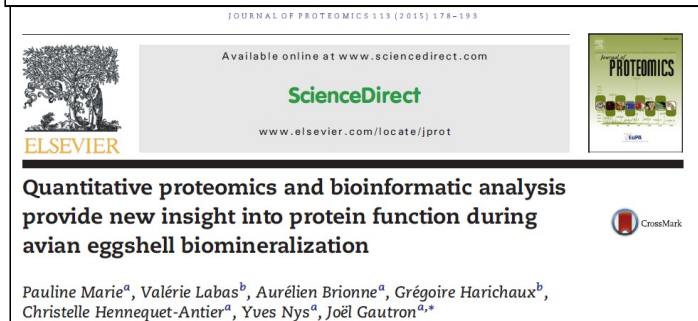
I. Analyse exhaustive des protéines

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



« 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

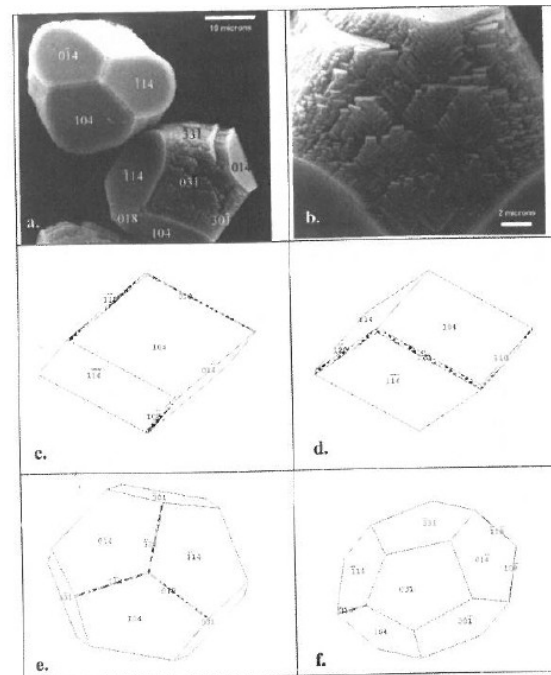
➤ calcification process

✓ 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

Angewandte
International Edition
Chemie

DOI: 10.1002/anie.201000679

Biomimneralization

Structural Control of Crystal Nuclei by an Eggshell Protein**

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

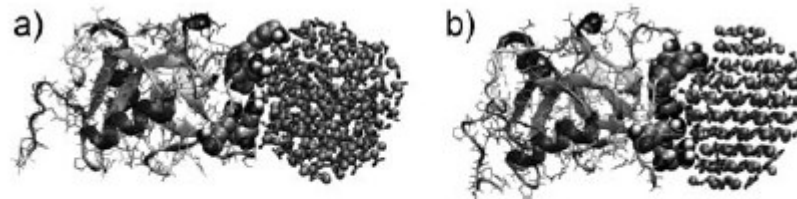


Figure 1. Ovocleidin-17 bound to an amorphous (a) and a crystallized (b) calcium carbonate nanoparticle containing 192 formula units. The

Eggshell proteins and physical defence



➤ calcification process

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

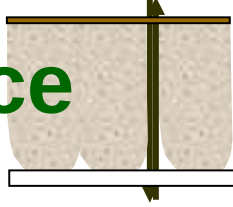
- OC-17
- OC-116
- Ovotransferrin
- OCX-32
- Osteopontin
- Lysozyme

✓ **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*

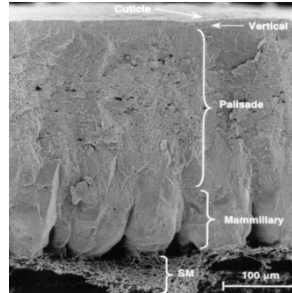
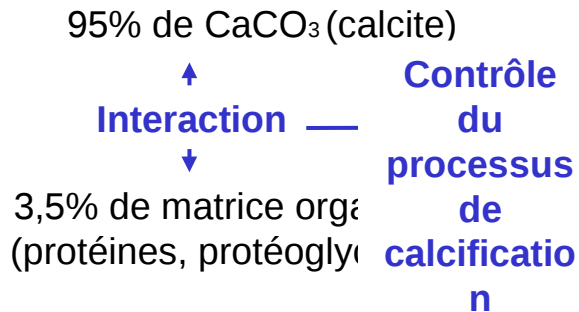
Eggshell proteins and physical defence



➤ **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)*

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

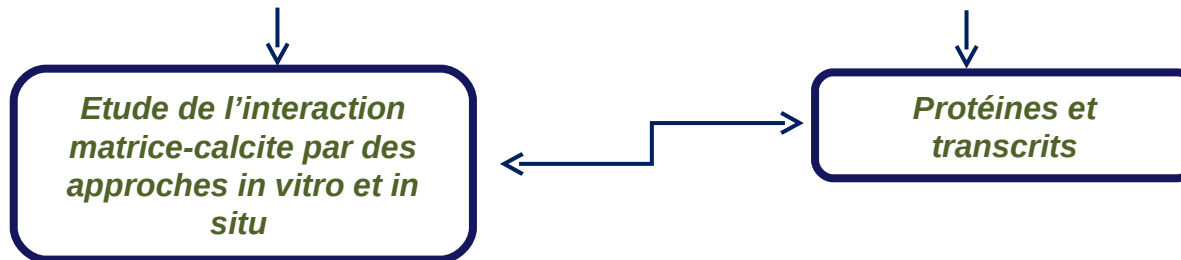


Approches globales et non hiérarchisées

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

Hiérarchiser les acteurs moléculaires prépondérants lors du processus de minéralisation

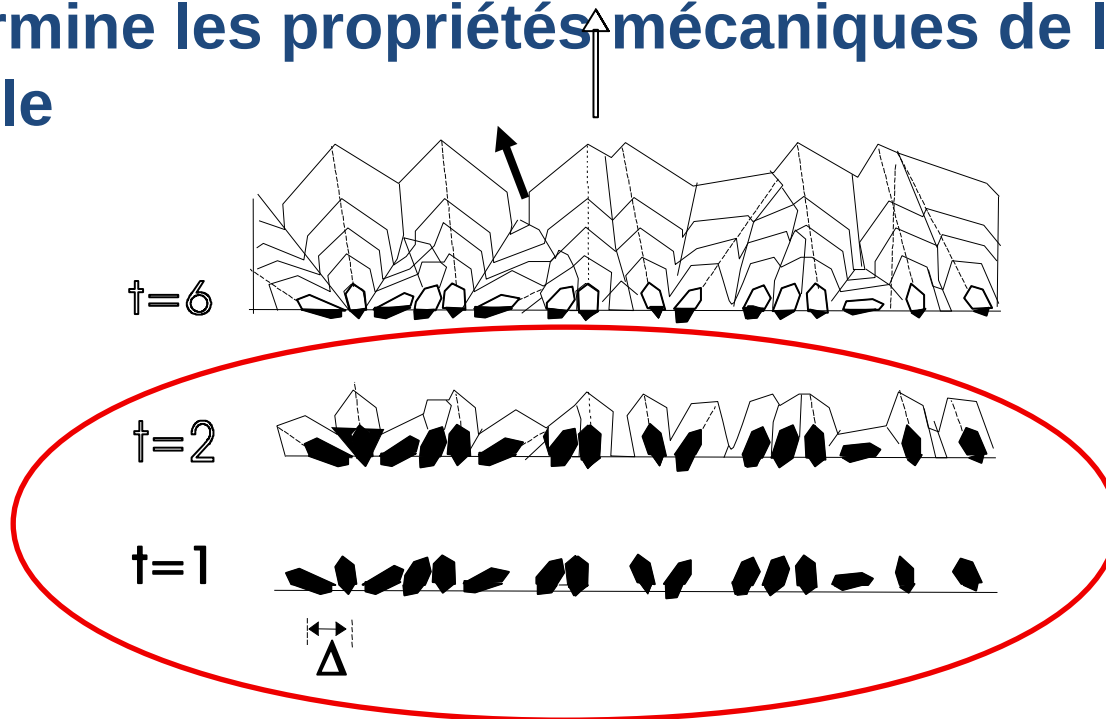
Etudes à différents stades de la minéralisation (poule et pintade)



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

□ Importance de l'initiation de la minéralisation

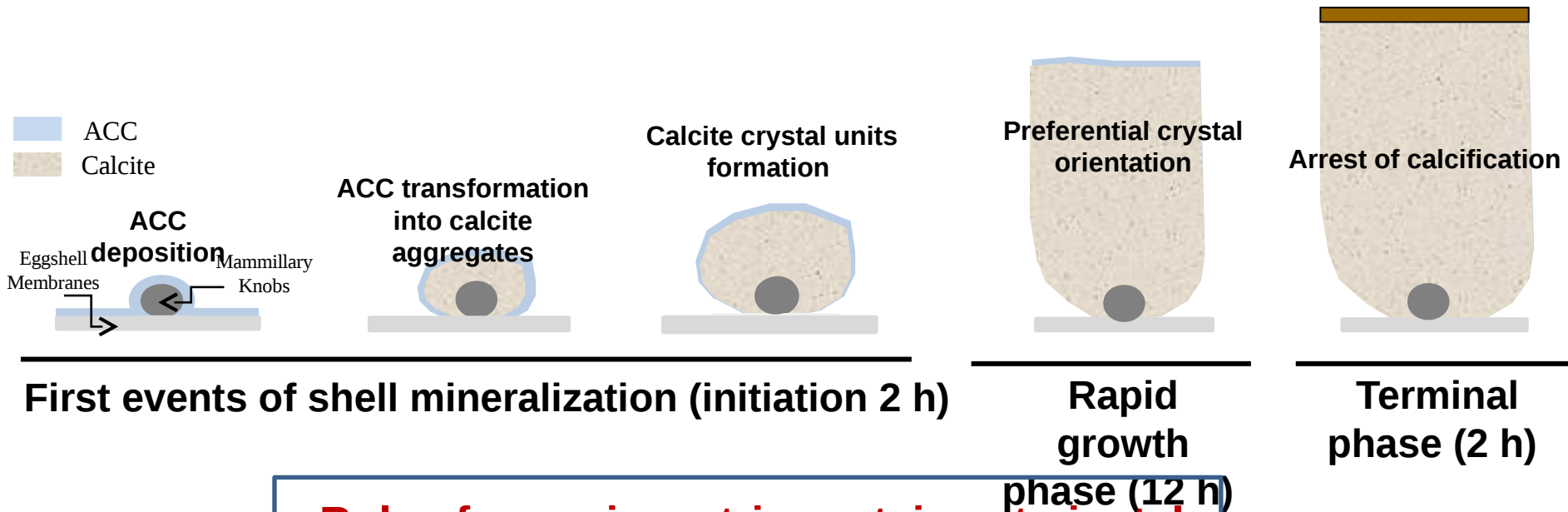
- Etape cruciale pour la suite de la biominéralisation
- Détermine les propriétés mécaniques de la coquille



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



Role of organic matrix proteins at pivotal events

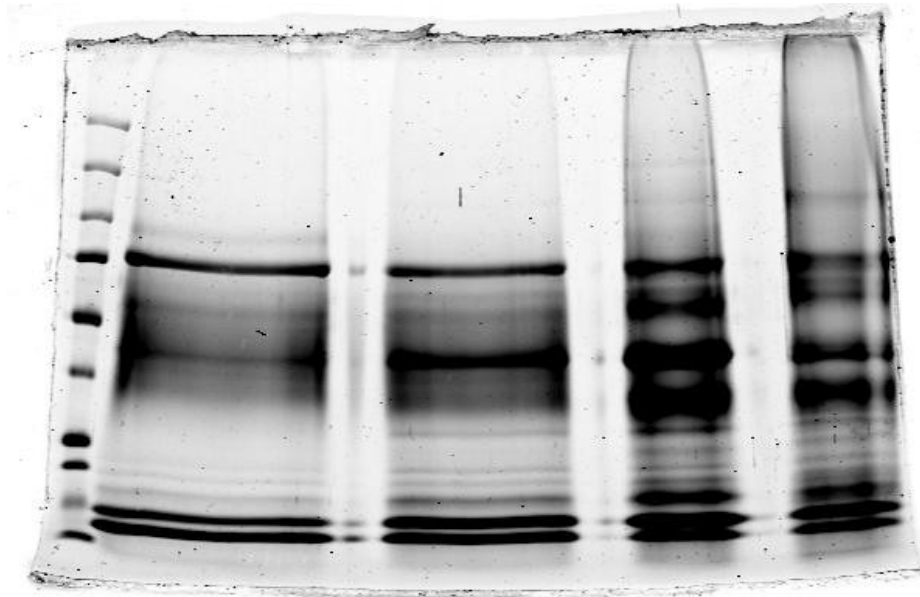
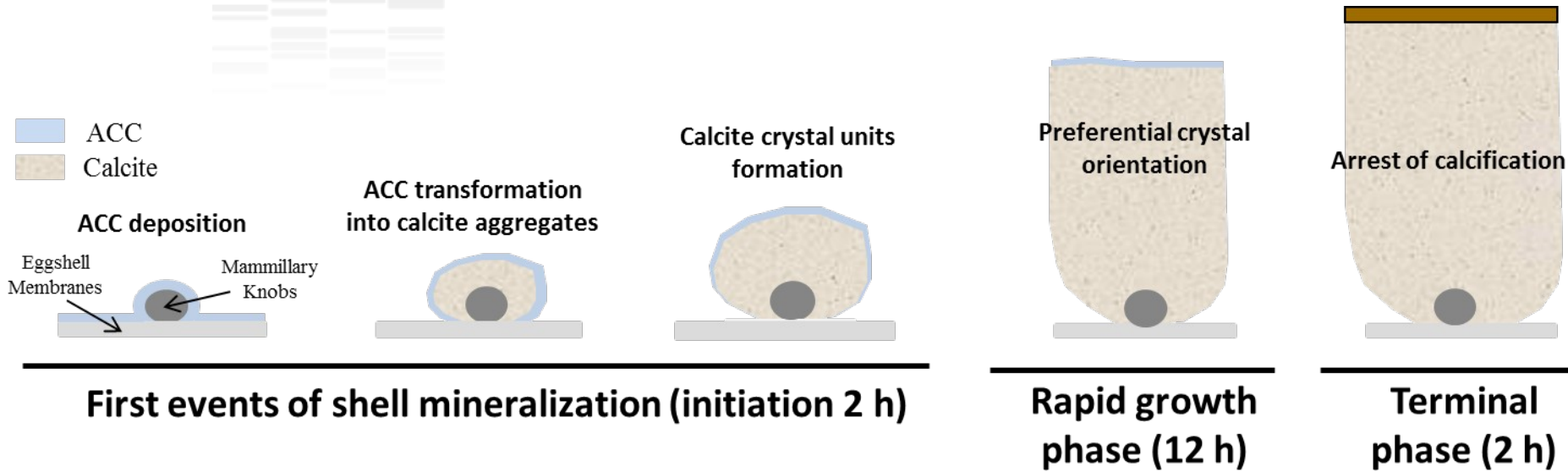
✓ *Stabilization of amorphous calcium carbonate (ACC)*

✓ *Polymorphs, morphology and size of crystals*



Impact
(2013-2017)

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



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

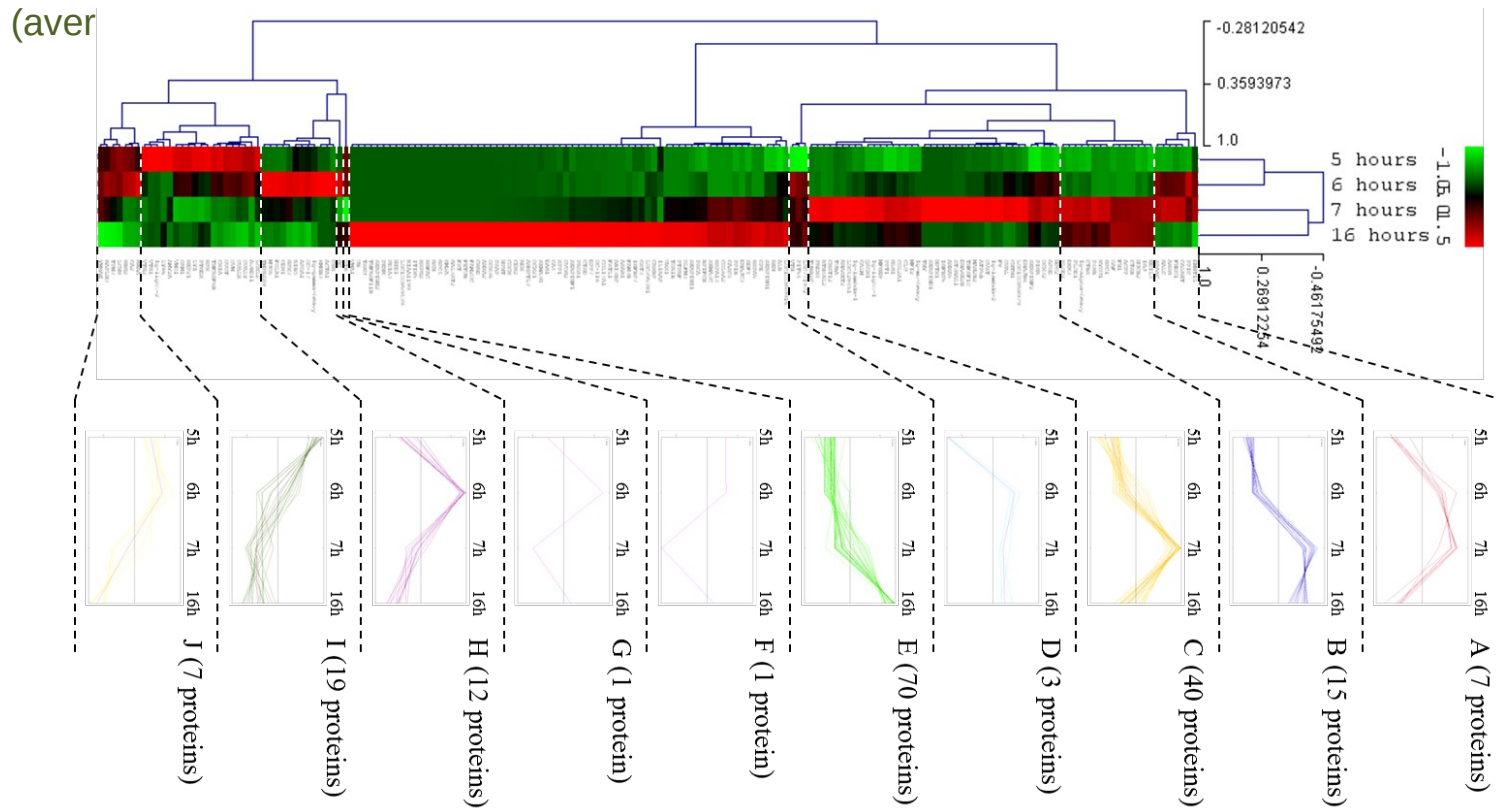
- 316 protéines quantifiées
- Détermination de l'abondance relative dans chacun des 5 stades
- **Analyses statistiques**
 - ANOVA
Protéines ont des variations d'abondance significatives selon les stades
 - Cluster hiérarchique profils d'abondance protéique

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

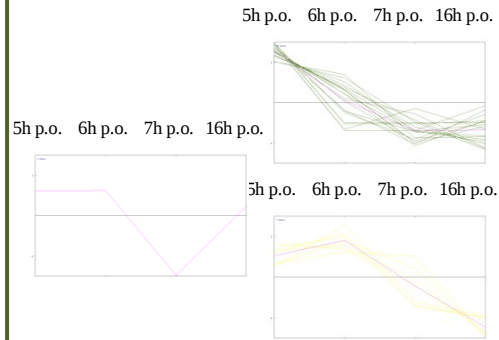
- Valeur moyenne centrée réduite pour limiter l'effet de la variance
- Calculs de distance entre individus : corrélation de Pearson
- Calculs de distance entre classe : moyenne des distances entre chaque individu de chaque classe



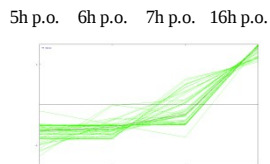
Etude spatio-temporelle des protéines impliquées dans la biominéralisation de la coquille des oiseaux

Classement des protéines selon leur profil d'abondance

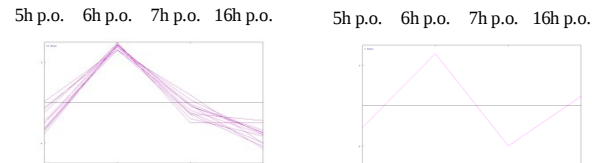
27 proteins overabundant during primary events of shell mineralization



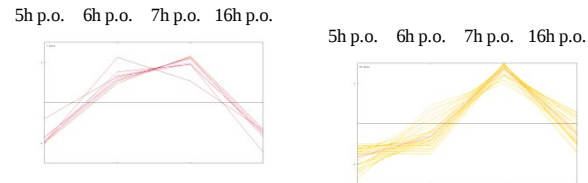
70 proteins overabundant during rapid growth phase



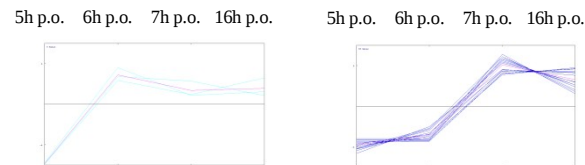
13 proteins overabundant during ACC transformation into calcite aggregates



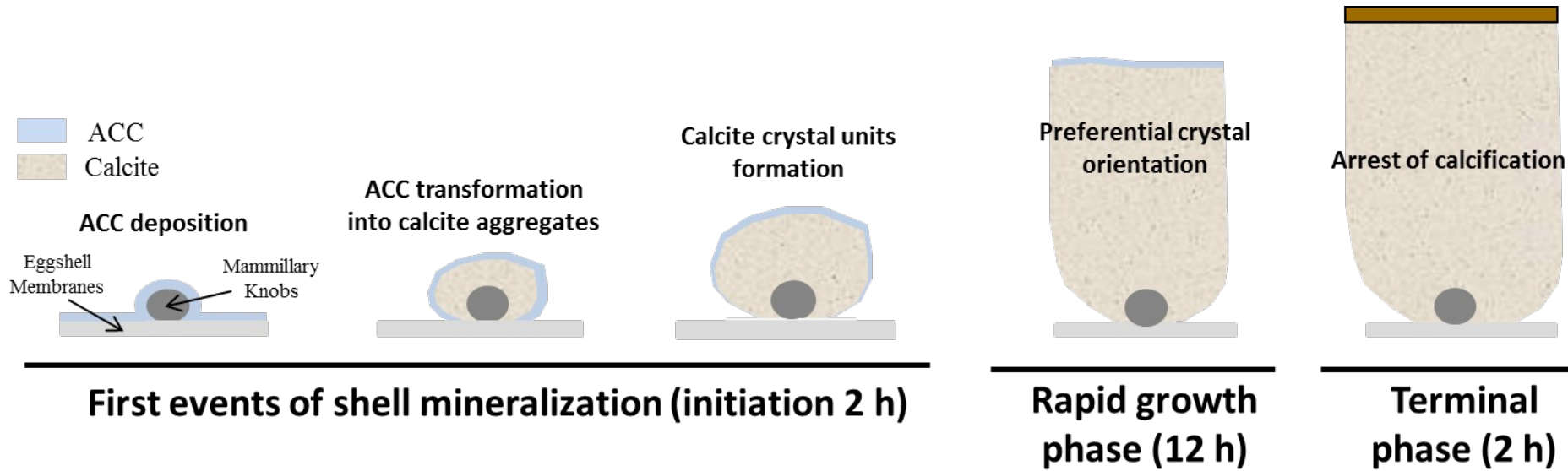
47 proteins overabundant when large calcite crystal units are formed



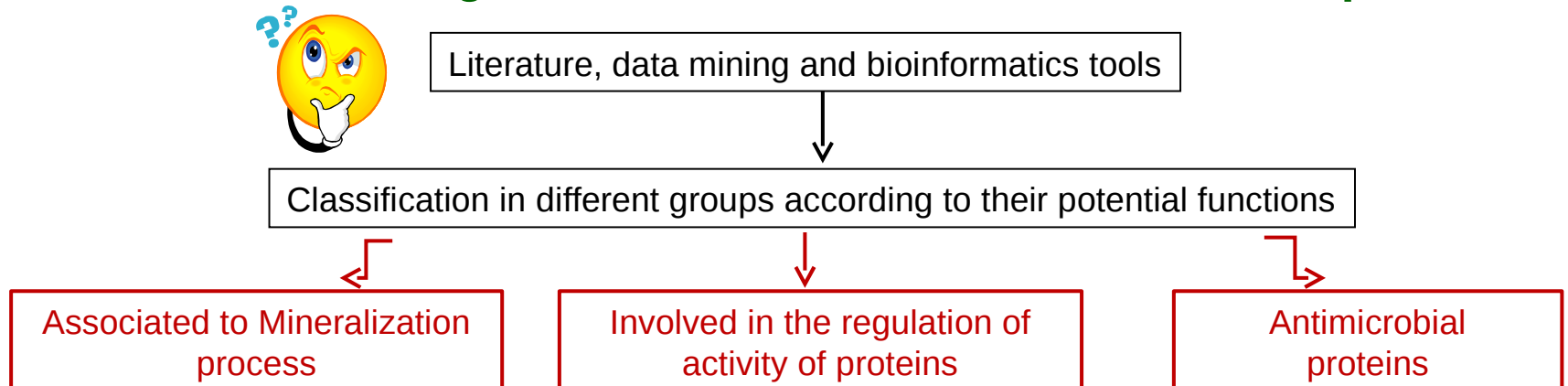
18 proteins overabundant at stages associated with the presence of calcite



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



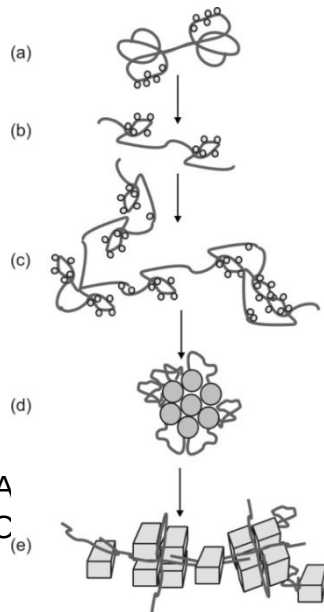
Functions and biological activities of the identified matrix proteins ?



Proteins at pivotal events

Proteins having a direct involvement in eggshell mineralization

✓ Proteins with established role in the **biomineralisation**



Binds to Calcium

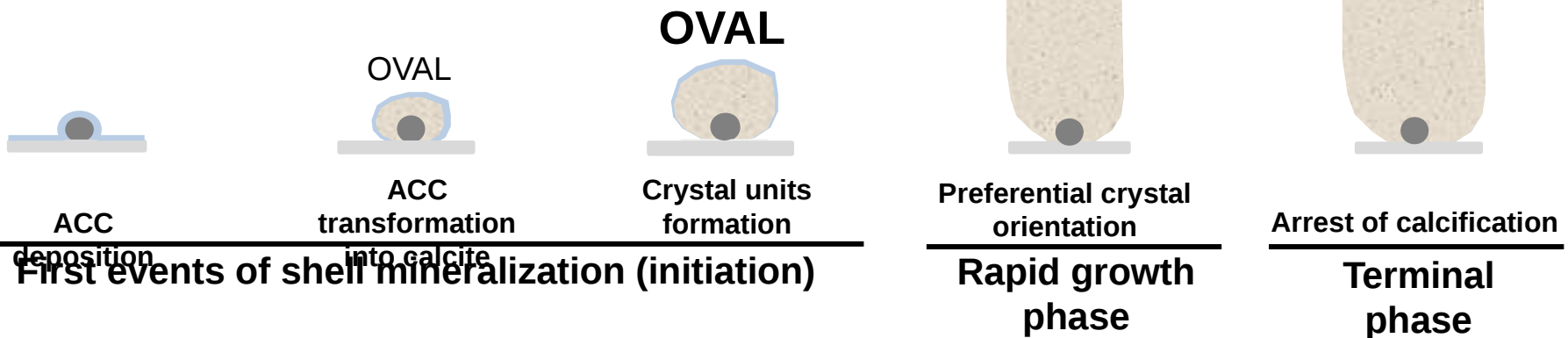
Modification of protein conformation

Protein aggregation

ACC Formation

ACC transformation in crystalline shape

In vitro study of the role of Ovalbumin on CaCO_3 crystallization (Pipitch et al., 2008, Schwahn et al., 2003)



Proteins at pivotal events

Proteins having a direct involvement in eggshell mineralization

- ✓ Proteins with established role in the **biomineralisation**

Freeman et al,
2010

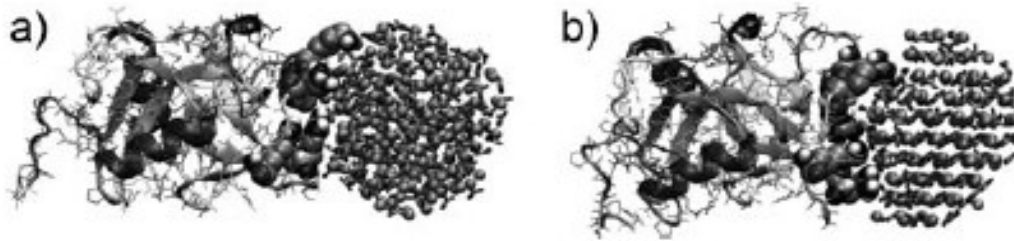
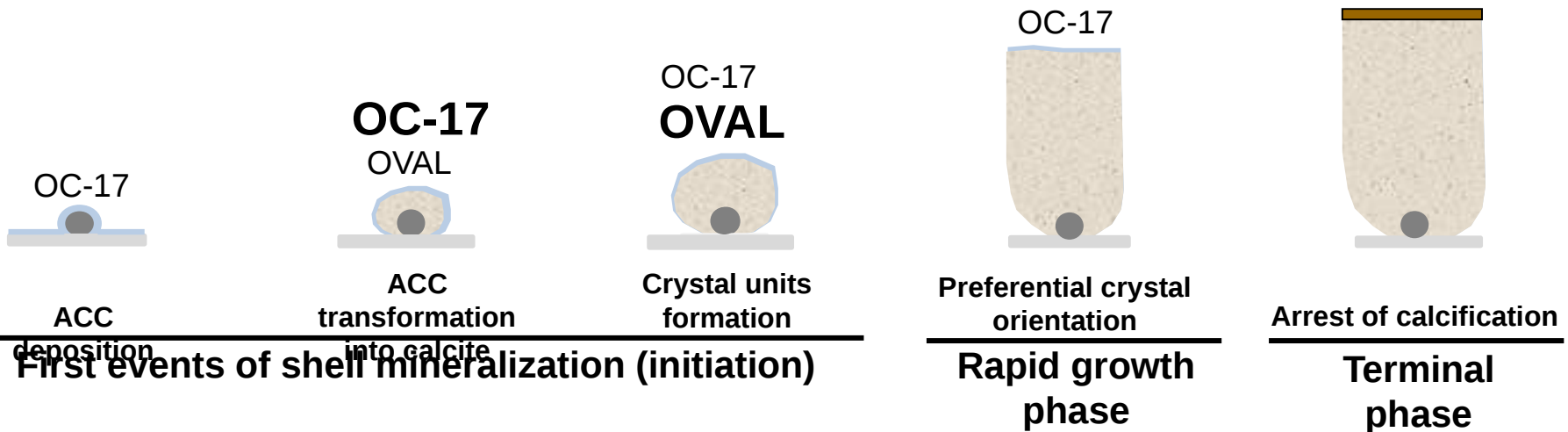


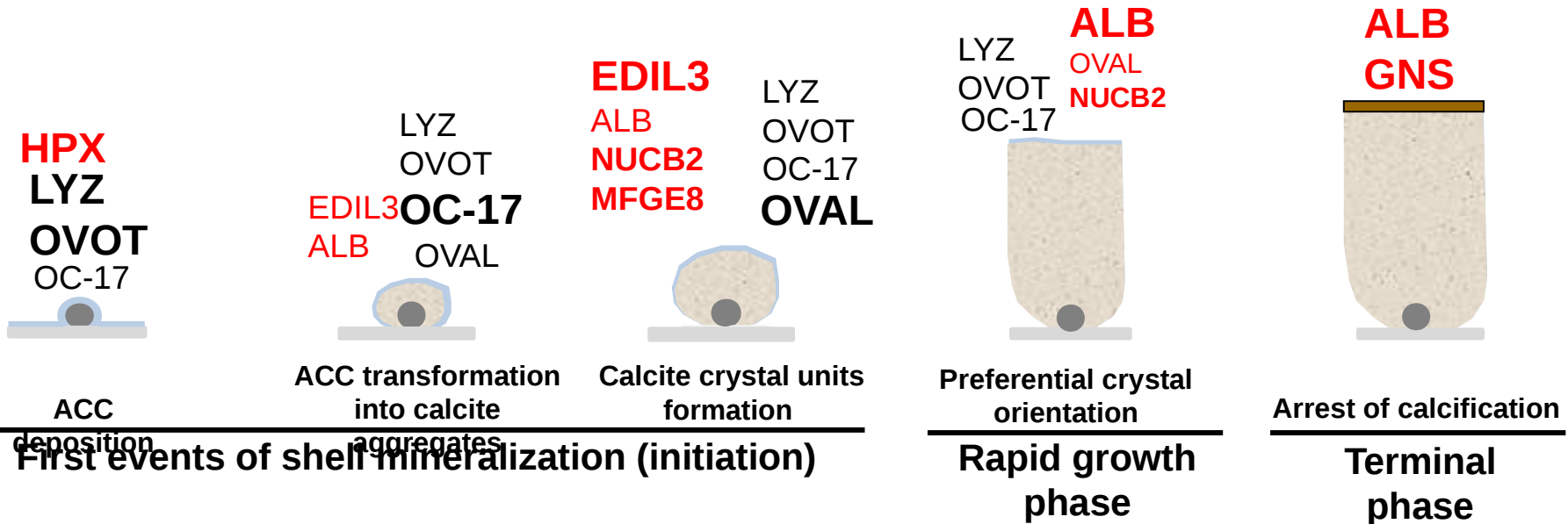
Figure 1. Ovocleidin-17 bound to an amorphous (a) and a crystallized (b) calcium carbonate nanoparticle containing 192 formula units.



Proteins at pivotal events

Proteins having a direct involvement in eggshell mineralization

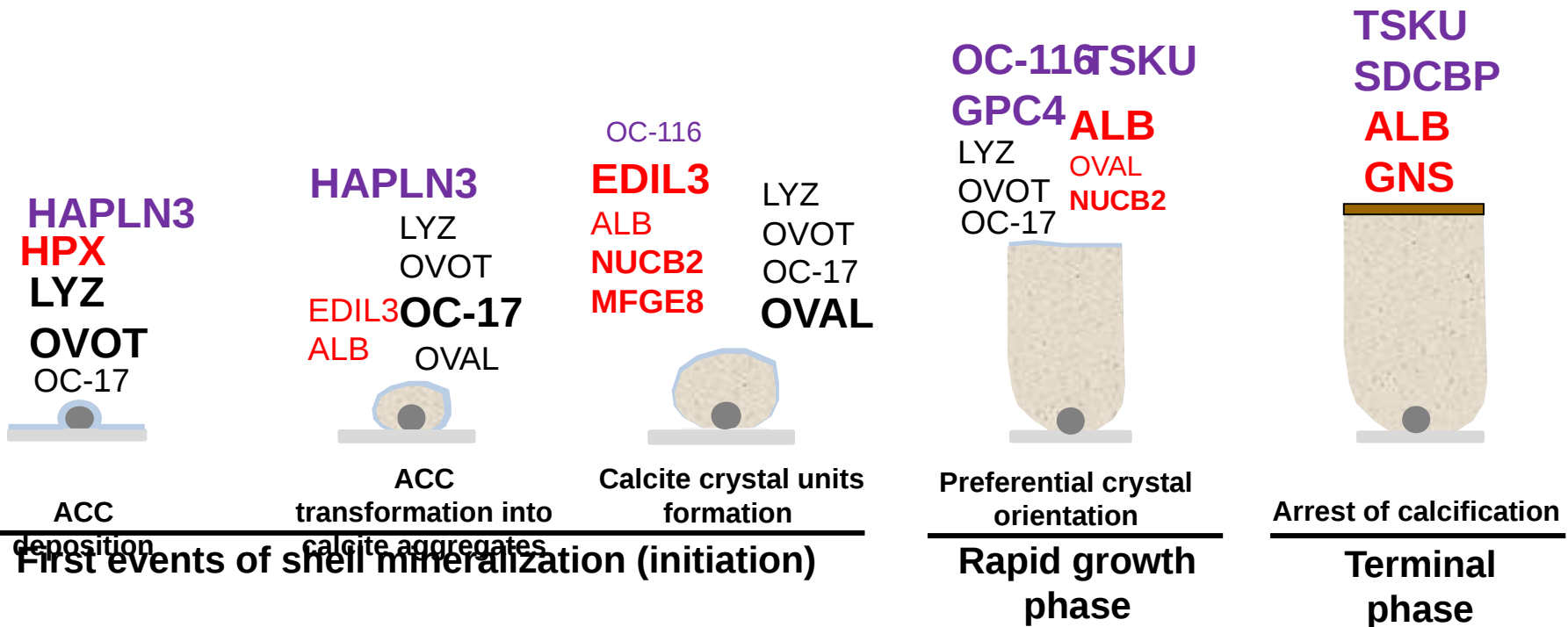
- ✓ Proteins with established role in the **biomineralisation**
- ✓ **Calcium binding proteins (CaBPs)** interacting with calcium, favoring crystal nucleation and driving the morphology of crystals
 - *Proteins with EF-hand and EGF-like calcium binding domains*



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 Ca^{2+} 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 interactions with other proteins*
 - *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*



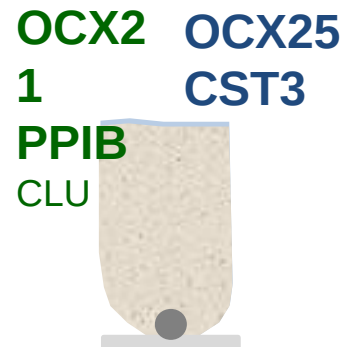
ACC
deposition



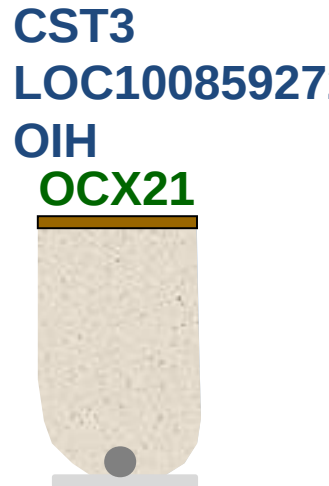
ACC transformation
into calcite
aggregates



Calcite crystal units
formation



Preferential crystal
orientation



Arrest of calcification

First events of shell mineralization (initiation)

Rapid growth
phase

Terminal
phase

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....)