



**HAL**  
open science

## Contrôle de la calcification de la coquille selon différentes sources de vitamine D3 : régulation des transferts de calcium et des protéines de la matrice organique dans l'uterus

Joël Gautron, Alice Boinet, Jean Marc Thoby, Elisa Folegatti, Valérie Labas, Daniel Tomas, Vérane Gigaud

### ► To cite this version:

Joël Gautron, Alice Boinet, Jean Marc Thoby, Elisa Folegatti, Valérie Labas, et al.. Contrôle de la calcification de la coquille selon différentes sources de vitamine D3 : régulation des transferts de calcium et des protéines de la matrice organique dans l'uterus. 14. Journées de la Recherches Avicoles et Palmipèdes à Foie Gras, Mar 2022, Tours, France. hal-04217128

**HAL Id: hal-04217128**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04217128>**

Submitted on 25 Sep 2023

**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.

**CONTROLE DE LA CALCIFICATION DE LA COQUILLE SELON DIFFERENTES  
SOURCES DE VITAMINE D3 :  
REGULATION DES TRANSFERTS DE CALCIUM ET DES PROTEINES DE LA  
MATRICE ORGANIQUE DANS L'UTERUS**

**Joël Gautron<sup>1</sup>, Alice Boinet<sup>1</sup>, Jean-Marc Thoby<sup>2</sup>, Elisa Folegatti<sup>3</sup>, Valérie Labas<sup>4-5</sup>,  
Daniel Tomas<sup>4-5</sup>, Vérane Gigaud<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> INRAE, UMR BOA, Université de Tours, 37380 NOUZILLY, France,

<sup>2</sup> DSM, DSM Nutritional Products France, 92 250 LA GARENNE-COLOMBES, FRANCE

<sup>3</sup> DSM, DSM Nutritional Products Europe AG, 4303 Kaiseraugst, Switzerland

<sup>4</sup> INRAE, CNRS, Université de Tours, IFCE, UMR PRC, 37380 NOUZILLY, France

<sup>5</sup> INRAE, Université de Tours, CHU de Tours, plate-forme PIXANIM, 37380 NOUZILLY  
[joel.gautron@inrae.fr](mailto:joel.gautron@inrae.fr)

**RÉSUMÉ**

La coquille d'œuf de poule est un biominéral complexe composé de 95 % de carbonate de calcium et de 3,5 % de matrice organique qui influence sa structure et ses propriétés mécaniques. Le calcium nécessaire à sa formation est précisément régulé et stocké par différents organes pour permettre la biominéralisation de la coquille de l'oiseau. Le rôle de la vitamine D et de ses métabolites reste peu étudié au niveau de l'utérus où se produit la calcification de l'œuf. Dans cette étude, nous avons étudié l'impact de la vitamine D3 (Cholécalciférol) et de sa forme intermédiaire hydroxylée (25-hydroxycholécalférol) sur les mécanismes de formation de la coquille dans l'utérus de poule.

Pour ce faire, nous avons nourri des poules de souche chair avec les 2 formes de vitamine D3 à des doses équivalentes, soit 3200 UI. L'analyse de l'expression des gènes dans l'utérus montrent que 34 gènes, codant pour les transporteurs d'ions qui permettent l'apport des minéraux nécessaires à la formation de la coquille, et 13 gènes codant les protéines de la matrice organique, sont significativement surexprimés, lorsque les oiseaux étaient nourris avec la 25-OH-D3. Les protéines de la matrice organique de la coquille ont été quantifiées par protéomique quantitative et l'utilisation de la forme hydroxylée a montré des différences significatives dans l'abondance de 55 protéines de la matrice organique associées à la biominéralisation.

En conclusion, la vitamine D3 est un acteur important de la biominéralisation de la coquille d'œuf aviaire et sa forme d'apport va influencer directement la structure et les propriétés mécanistiques de ce biomatériau.

**ABSTRACT**

**Control of shell calcification with different sources of vitamin D3 supply: Regulation of calcium and organic matrix protein transfers in the uterus**

The hen's eggshell is a complex biomineral composed of 95% calcium carbonate and 3.5% organic matrix that influences its structure and mechanical properties. The calcium required for its formation is precisely regulated and stored by different organs to allow the biomineralisation of the bird's shell. The role of vitamin D and its metabolites in the uterus, where egg calcification occurs, remains poorly studied. In this study, we investigated the impact of vitamin D3 (cholecalciferol) and its hydroxylated intermediate form (25-hydroxycholecalciferol) on the mechanisms of shell formation in the hen uterus.

To do this, we fed broiler hens with both forms of vitamin D3 at equivalent doses of 3200 UI. Analysis of gene expression in the uterus showed that 34 genes encoding ion transporters that provide the minerals required for shell formation and 13 genes encoding organic matrix proteins were significantly overexpressed. The shell organic matrix proteins were quantified by quantitative proteomics and the use of hydroxylated form showed significant differences in the abundance of 55 organic matrix proteins associated with biomineralisation.

In conclusion, vitamin D3 is an important player in the biomineralisation of the avian eggshell and its form of delivery will directly influence the structure and mechanistic properties of this biomaterial.

## INTRODUCTION

La coquille d'œuf de poule est un biominéral complexe composé de 95 % de carbonate de calcium sous forme de calcite et de 3,5 % de matrice organique qui influence sa structure et ses propriétés mécaniques. Il s'agit de l'un des processus de biominéralisation les plus rapides sur terre, avec environ 6 g de biominéraux déposés en l'espace de 20 heures. Le calcium nécessaire à sa formation provient de l'alimentation, mais il existe une désynchronisation entre l'apport alimentaire (le jour) et la minéralisation de la coquille (la nuit) qui se produit lorsque la poule ne peut pas s'alimenter. Le calcium est donc précisément régulé et stocké par différents organes pour permettre la biominéralisation de la coquille de l'oiseau. Si le rôle de la vitamine D est bien connu pour permettre les apports de calcium au niveau intestinal et osseux, le rôle de la vitamine D et de ses métabolites reste peu étudié au niveau de l'utérus où se produit la calcification de l'œuf. Dans cette étude, nous avons étudié l'impact de la vitamine D3 (Cholécalciférol) et de sa forme intermédiaire hydroxylée (25-hydroxycholécalférol) sur les mécanismes de formation de la coquille dans l'utérus de poule.

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Elevage des animaux et recueil des échantillons biologiques

Deux lots de 100 poules de type chair Ross 308 ont été nourries avec le même régime alimentaire depuis le jour de la naissance. Seule la forme de vitamine D ajoutée dans l'aliment était différente. Le groupe témoin (T) contenait 3200 UI de vitamine D3, alors que la forme hydroxylée de la vitamine D3 (HyD, 25-OH-D<sub>3</sub>) a été donnée aux animaux du second groupe (H) pendant 2 mois. Un total de 60 œufs a été recueilli entre 32 et 34 semaines dans chacun des groupes expérimentaux. A 35 semaines environ, 12 poules de chacun des groupes (T ou H) ont été sacrifiées afin de recueillir le tissu utérin où se produit la calcification de la coquille.

### 1.2. Extraction des protéines et des ARN

Après avoir éliminé le contenu interne de l'œuf, les coquilles ont été lavées pour enlever toutes traces de blanc. Une fois sèches, les coquilles sont broyées et regroupées en 12 pools de 5 coquilles par groupe (T et H). Les protéines de la matrice organique ont été extraites comme décrits précédemment (Gautron et al., 2001). Après extraction des ARN totaux et contrôle de leurs qualités, les ARNs ont été transcrits en ADNc.

### 1.3. Expression des gènes dans l'utérus et quantification des protéines dans la coquille

Les ADNc ont été utilisées pour mesurer l'expression d'un total de 91 gènes par RT-PCR quantitative à l'aide d'un thermocycleur en temps réel ROCHE LC 480 et par technologie Benchmark Fluigdim. Après vérification des duplicats et des Tm, l'expression des gènes a été normalisée à l'aide du logiciel GeNORM en utilisant 4 gènes de référence.

Les protéines de la coquille ont été séparées en bande unique et les protéines digérées par la trypsine. Les peptides ont été séparés par nanoLC avant d'être analysés par spectrométrie de masse en tandem (ou MS/MS) sur un LTQ Velos Orbitrap. Les protéines ont ensuite été identifiées et validées par les logiciels Mascot et Scaffold 3 par comparaison des peptides obtenus expérimentalement à ceux issus des banques de données. Les protéines ont été également quantifiées afin de déterminer l'abondance de chacune des protéines dans la coquille selon la forme de vitamine D.

L'analyse statistique des valeurs quantitatives de l'expression des gènes et de l'abondance des protéines a été réalisée par un test t à 2 échantillons à l'aide du logiciel minitab.

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

Si le calcium contenu dans la coquille des œufs provient entièrement de l'aliment, il existe une désynchronisation entre le besoin en calcium pour la formation de la coquille durant la nuit et l'apport alimentaire de ce calcium durant la journée. Pour ce faire, la poule possède une structure osseuse particulière, l'os médullaire qui sera mobilisé durant la période nocturne pour fournir une partie du calcium nécessaire à la calcification de la coquille. Au cours de la journée, lorsque la poule a accès à son aliment, la partie médullaire de l'os sera de nouveau minéralisée (Nys et al., 2021). La régulation du métabolisme calcique lors de la formation de la coquille chez la poule implique de nombreux organes. Tout d'abord l'intestin, qui permettra le transfert du calcium vers l'os et l'utérus, via la circulation sanguine. Il implique également l'utérus, qui devra transférer au niveau du site de calcification (fluide utérin), de grandes quantités de calcium nécessaire à la formation de la coquille tout en maintenant l'homéostasie cellulaire. La vitamine D et notamment son métabolite actif (1.25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), va jouer un rôle crucial dans la régulation des transferts de calcium au niveau intestinal et osseux. Son rôle au niveau utérin a été peu exploré, mais pourrait également être impliqué au niveau des mécanismes de transferts du calcium, mais également dans la régulation des protéines de la matrice organique qui donnent à la coquille son ultrastructure déterminant ses propriétés mécaniques (Gautron et al., 2021). La vitamine D est tout d'abord hydroxylée en 25-hydroxycholécalférol (25-OH-D<sub>3</sub>) au niveau du foie avant d'être hydroxylée en 1.25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> au niveau rénal (Christakos. et al, 2010). L'utilisation de la forme hydroxylée (25-OH-D<sub>3</sub>) dans

l'aliment présente un avantage métabolique en évitant l'étape hépatique initiale et permettrait une meilleure disponibilité du métabolite intermédiaire de la vitamine D. Dans cette étude, nous avons nourris les animaux avec la vitamine D3 et cette forme hydroxylée afin de répondre à deux questions : 1) Est-ce que l'utérus et la minéralisation de la coquille sont dépendant de la vitamine D ? 2) Est-ce que la forme d'apport régule les apports de calcium utérin et la biominéralisation de la coquille ?

Le niveau d'expression dans l'utérus a été analysé pour 91 gènes. Parmi ceux-ci 17 gènes codent des protéines de la matrice organique connues pour jouer un rôle prépondérant lors de la minéralisation de la coquille et 65 codent pour des transporteurs de calcium de bicarbonates et autres ions nécessaires à la minéralisation. Parmi ces derniers, 21 codent pour des protéines de transport paracellulaire et 44 permettent les transferts transcellulaires. Les tableaux 1 et 2 présentent les 48 gènes présentant une variation d'expression significative dans l'utérus des poules nourries avec les deux formes de vitamine D. Il est particulièrement notable d'observer que la totalité de ces gènes est stimulée par le 25-OH-D3.

Parmi les gènes impliqués dans le transfert des ions, on retrouve 22 gènes impliqués dans les transferts actifs transcellulaires au travers les pôles basal et apical et via le cytosol de la cellule utérine. Les gènes permettant, soit la fixation sur la membrane du calcium pour permettre son transfert actif, soit son stockage et/ou son transport cytosolique sont les plus représentées (18/22). Les 4 autres gènes de la voie transcellulaire sont impliqués dans la synthèse ou le transport des bicarbonates qui donneront des carbonates formant avec le calcium, le carbonate de calcium de la coquille. Il est également à noter que 5 de ces gènes présentent des séquences régulatrices de la vitamine D au niveau des promoteurs, en cohérence avec une surexpression de VDR ( $p=0.052$ ) dans l'utérus de la poule.

La voie paracellulaire de transports des ions dans l'utérus a fait l'objet de controverses (Nys et al., 2021). Une étude récente semble confirmer une implication de la voie paracellulaire lors de la calcification, pour maintenir l'homéostasie cellulaire (Stapane et al., 2020). Dans ce contexte l'observation d'une surexpression de 12 gènes de la voie paracellulaire en présence de 25-OH-D3 semble conforter l'hypothèse d'un rôle de cette voie lors de la minéralisation de l'œuf.

Les mesures d'expression mettent aussi en évidence une surexpression de 13 gènes codant des protéines de la matrice organique impliqués dans le processus de

minéralisation et la détermination des propriétés mécaniques de la coquille. Parmi celle-ci, on notera une surexpression du gène codant OC-17 qui est la première protéine spécifique de la coquille à avoir été identifiée et séquencée (Hincke et al., 1995). Cette protéine abondante (40 $\mu$ g/g de coquille) est concentrée et surabondante dans les couches où la coquille est initiée (Hincke et al., 1995, Marie et al., 2015). L'interaction d'OC-17 avec le carbonate de calcium de la coquille a été démontrée *in vivo* et *in vitro* (Freeman et al., 2011, 2012, 2015 ; Reyes - Grajeda et al., 2004).

Parmi ces protéines, on observe également une surexpression de l'OCX-32, une protéine abondante dans les couches internes et externes de la coquille (Gautron et al., 2001) et dont les polymorphismes sont associés à la solidité de la coquille (Gautron et al., 2021). On observe aussi une surexpression du gène codant EDIL3, pour laquelle un rôle dans le transfert vésiculaire du carbonate de calcium amorphe vers le site de minéralisation a été récemment décrit (Stapane et al., 2019, 2020). L'ensemble des autres protéines dont le gène est surexprimé en présence de 25-OH-D3 présentent aussi un rôle démontré ou prédit lors des différentes étapes de calcification de la coquille (Gautron et al., 2021).

L'analyse par protéomique quantitative a également permis d'identifier et caractériser 125 protéines de la coquille, dont 52 présentent des surabondances et des sous abondances dans la coquille lorsque les poules sont nourries avec du 25-OH-D3. Un travail bio-informatique est en cours pour caractériser leurs rôles potentiels dans les déterminants de la solidité de la coquille et leur régulation par la vitamine D.

## CONCLUSION

Cette étude met clairement en évidence que la vitamine D joue un rôle important dans la régulation des transferts du calcium et des minéraux dans l'utérus de la poule. Ce rôle n'étant donc pas limité aux transferts du calcium dans l'intestin et l'os comme décrit auparavant. Par ailleurs, cette étude montre que l'utilisation de la forme hydroxylée de la vitamine D3 sous la forme de 25-OH-D3 permet une surexpression de nombreux gènes impliqués dans les voies paracellulaires, vésiculaires et paracellulaires de transfert du calcium, ainsi qu'une surexpression des gènes codant les protéines de la matrice organique.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Christakos S, Dare V. Ajibade, B.A., Puneet D., Adam J. F, Leila J. Mady, B.A. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010 June ; 39(2): 243–253.
- Freeman CL, Harding JH, Quigley D, Rodger PM., 2011. *J Phys Chem*, 115.
- Freeman CL, Harding JH, Quigley D, Rodger PM., 2012. *Phys Chem Chem Phys*, 14.
- Freeman CL, Harding JH, Quigley D, Rodger PM., 2015. *Phys Chem Chem Phys* 2015, 17.
- Gautron J, Hincke MT, Mann K, Panhéleux M, Bain M, McKee MD, Solomon SE, Nys Y, 2001 *J Biol Chem*, 276(42):39243-39252.
- Gautron, J., Stapane, L., Le Roy, N., Nys, Y., Rodriguez-Navarro, A.B., Hincke, M.T., 2021 *BMC Molecular and Cell Biology*, BioMed Central, 2021, 22 (1)
- Hincke MT, Tsang CP, Courtney M, Hill V, Narbaitz R., 1995. *Calcif Tissue Int*, 56(6):578-583.
- Marie P, Labas V, Brionne A, Harichaux G, Hennequet-Antier C, Rodriguez-Navarro AB, Nys Y, Gautron J, *J Proteomics*, 126:140-154.
- Nys, Y., Gautron, J., Rodriguez-Navarro, A.B., Hincke, M.T., 2021. In: *Sturkie's Avian Physiology*. 7th Edition, 2021, 9780128197707; 9780323853514
- Reyes-Grajeda JP, Moreno A, Romero A., 2004. *J Biol Chem*, 279(39):40876-40881.
- Stapane L, Le Roy N, Hincke MT, Gautron J., 2019. *J Biol Chem*, 294(40):14526-14545.
- Stapane L, Le Roy N, Ezagal J, Rodriguez-Navarro AB, Labas V, Combes-Soia L, Hincke MT, Gautron J., 2020. *J Biol Chem*, 295(47): 15853–15869.

**Tableau 1.** Variation d'expression des gènes impliqués dans la biominéralisation de la coquille

Symbole de gènes	ID du gène	Rôle	Niveau expression			
			Vitamine D3	25-OH-D3	P-Value	
Gènes codant des protéines de la matrice organique (Minéralisation coquille)	CST3	396497	Régule les protéines guidant la minéralisation (inh protéases)	2.25	4.42	<b>0,003</b>
	EDIL3	427326	Fixation du calcium	1.83	3.77	<b>0,001</b>
	HAPLN3	415495	Protéoglycanes et protéines de liaison aux protéoglycanes	1.55	3.76	<b>0,013</b>
	HPX	419076	Fixation calcium	2.63	7.76	<b>0,005</b>
	ITGB1	374058	Formation de nodules osseux minéralisés	1.43	3.08	<b>0,002</b>
	ACCP	428451	Minéralisation dépend du degré de phosphorylation	1.50	3.49	<b>0,000</b>
	MFGE8	415494	Fixation calcium	1.24	3.71	<b>0,000</b>
	NUCB2	423071	Fixation calcium	1.39	2.96	<b>0,000</b>
	OC17	100313508	Processus de minéralisation (rôle direct)	1.60	2.82	<b>0,042</b>
	OCX21	419515	Régule les protéines guidant la minéralisation (molécule chaperonne)	1.34	4.66	<b>0,002</b>
	OCX25	771972	Régule les protéines guidant la minéralisation (inh protéases)	1.23	2.44	<b>0,000</b>
	OCX32	395209	Régule les protéines guidant la minéralisation (inh protéases)	1.28	2.70	<b>0,000</b>
	PPIB	396447	Régule les protéines guidant la minéralisation (molécule chaperonne)	2.42	6.00	<b>0,000</b>

**Tableau 2.** Variation d'expression des gènes impliqués dans le transfert des ions lors de la formation de la coquille

	Symbole de gènes	ID du gène	Rôle	Niveau expression		
				Vitamine D3	25-OH-D3	P-Value
transfert Ca paracellulaire	<b>CACNA2D1</b>	768444	Régulation du transport transmembranaire des ions calcium	1.76	3.22	<b>0,002</b>
	<b>CLDN1</b>	424910	Adhésion cellule-cellule indépendante du calcium	2.08	5.01	<b>0,016</b>
	<b>CLDN2</b>	422292	Adhésion cellule-cellule indépendante du calcium	3.62	9.04	<b>0,003</b>
	<b>CLDN12</b>	771872	Adhésion cellule-cellule indépendante du calcium	1.98	4.16	<b>0,000</b>
	<b>F2R</b>	427212	Régulation du calcium	1.95	3.48	<b>0,001</b>
	<b>GRIN2A</b>	427678	Canal ionique calcique	3.99	7.98	<b>0,023</b>
	<b>JAM2</b>	418476	Molécule d'adhésion jonctionnelle	1.52	2.77	<b>0,000</b>
	<b>P2RX7</b>	771952	Transfert calcium paracellulaire	1.70	4.83	<b>0,001</b>
	<b>ATP6V1B2</b>	395497	Transport transmembranaire de protons	1.38	3.20	<b>0,000</b>
	<b>ZO1 (TJP1)</b>	415388	Protéine à jonction étroite	1.56	4.24	<b>0,002</b>
	<b>ZO2 (TJP2)</b>	395751	Protéine à jonction étroite	1.05	3.87	<b>0,000</b>
	<b>ZO3 (TJP3)</b>	420070	Protéine à jonction étroite	1.48	4.84	<b>0,000</b>
	<b>Vit D</b>	<b>VDR</b>	395988	Récepteur vitamine D3		
transfert Ca transcellulaire	<b>ANXA5</b>	428767	Fixation/transport du calcium/canal calcique	2.14	4.35	<b>0,003</b>
	<b>ATP2A2</b>	396446	Transfert calcium par le RE	1.32	3.14	<b>0,000</b>
	<b>ATP2B4</b>	419934	Transfert calcium <b>VDR response element</b>	1.18	3.3	<b>0,000</b>
	<b>CA2</b>	396257	Carbonate déshydratase <b>VDR responsive element</b>	1.80	3.76	<b>0,008</b>
	<b>CA9</b>	770004	Carbonate déshydratase/régulation intracellulaire du calcium/ <b>VDR responsive element</b>	0.95	3.4	<b>0,000</b>
	<b>CALM1</b>	396523	Stockage ion calcium	1.78	3.47	<b>0,009</b>
	<b>ITPR1</b>	395412	Canal calcique (RE)	1.99	6.20	<b>0,018</b>
	<b>ITPR2</b>	418212	Canal calcique (RE)	1.64	3.61	<b>0,001</b>
	<b>ITPR3</b>	419910	Canal calcique (RE) <b>VDR response element</b>	1.37	3.22	<b>0,024</b>
	<b>MAPK3</b>	373953	Canal calcique (RE)	1.57	3.19	<b>0,000</b>
	<b>PDIA3</b>	373899	Fixation du calcium	1.28	3.38	<b>0,000</b>
	<b>PLCG1</b>	419175	Fixation du calcium	2.47	8.66	<b>0,008</b>
	<b>PLN</b>	396378	Canal calcique (RE)	2.50	6.41	<b>0,006</b>
	<b>RYR1</b>	396112	Canal calcique (RE)	1.52	3.29	<b>0,000</b>
	<b>RYR2</b>	421508	Canal calcique (RE)	3.69	14.08	<b>0,036</b>
	<b>SLC4A4</b>	422649	Transport de bicarbonate <b>VDR responsive element</b>	1.14	3.17	<b>0,008</b>
	<b>SLC4A7</b>	420658	Transport de bicarbonate	1.44	2.49	<b>0,000</b>
	<b>CRACR2B</b>	423106	Fixation calcium	0.96	2.97	<b>0,000</b>
	<b>TRPC1</b>	424776	Canal calcique/régulation de la concentration en ions calcium cytosolique	1.55	2.78	<b>0,000</b>
	<b>TRPC4</b>	418895	Importation et transport transmembranaire des ions calcium	0.97	2.27	<b>0,005</b>
<b>TRPM7</b>	427502	Canal calcique	1.32	2.58	<b>0,000</b>	
<b>TRPV2</b>	417603	Canal calcique/régulation positive de l'importation d'ions calcium	1.16	3.11	<b>0,003</b>	