



# Apport des techniques à haut débit pour l'identification des gènes et des protéines impliqués dans un processus physiologique

Joël Gautron

## ► To cite this version:

Joël Gautron. Apport des techniques à haut débit pour l'identification des gènes et des protéines impliqués dans un processus physiologique. Master. M2R physiopathologies. Analyse des génomes: aspects fondamentaux et approches méthodologiques, France. 2020. hal-04217864

HAL Id: hal-04217864

<https://hal.inrae.fr/hal-04217864>

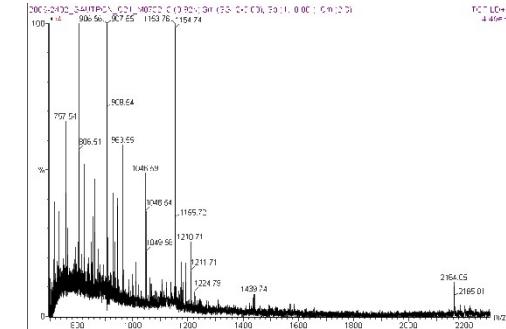
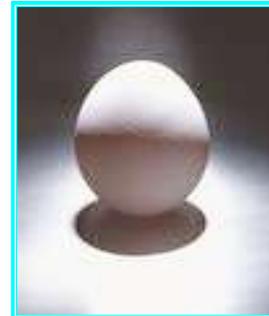
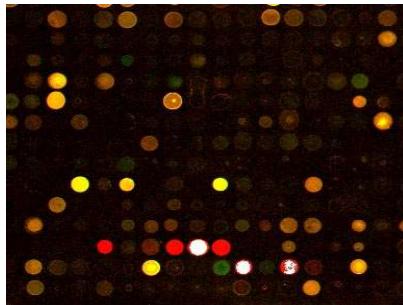
Submitted on 26 Sep 2023

**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.

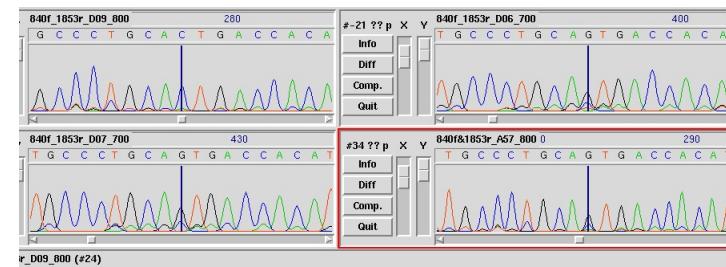
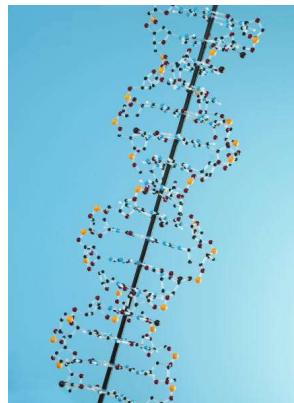


Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



# Apport des techniques à haut débit pour l'identification des gènes et des protéines impliqués dans un processus physiologique

**Joël GAUTRON, UR 083 Unité de Recherches Avicoles,  
INRA, 37380 Nouzilly, France**



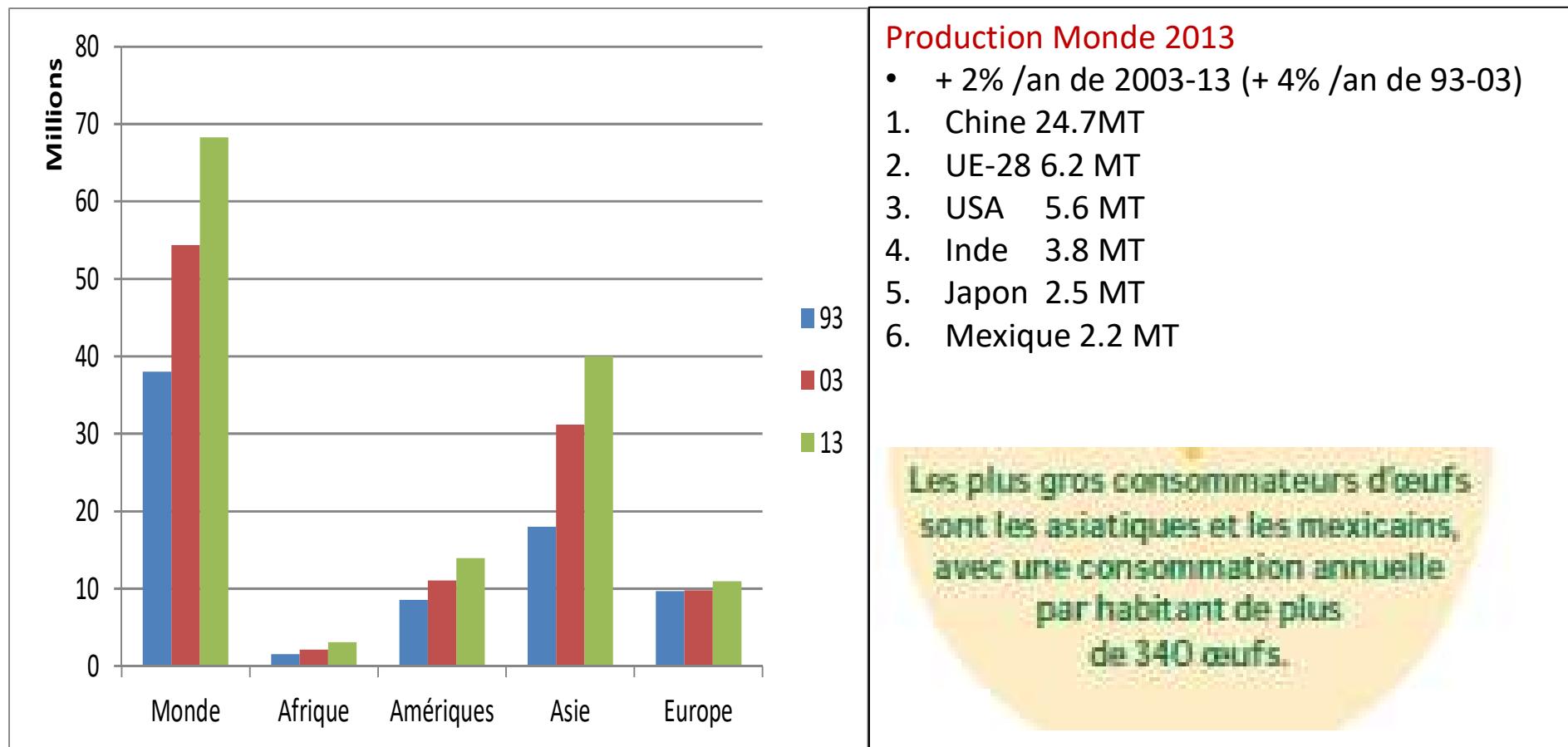
# Plan

- I. Introduction
- II. Approches à haut débit pour identifier les protéines déposées dans l'œuf d'oiseau
  - 1. Généralité – stratégie expérimentale
  - 2. Utilisation combinée des banques et outils
  - 3. Transcriptome de l'œuf
  - 4. Protéome de l'œuf
- III. Mieux comprendre les défenses de l'œuf grâce aux approches à haut débit  
Défense physique (coquille)
  - a) Protéines de la matrice organique et biominéralisation
  - b) Caractérisation fonctionnelle des protéines de la matrice
  - c) Avancées récentes en génomique pour améliorer la solidité de la coquille
- IV. Conclusion



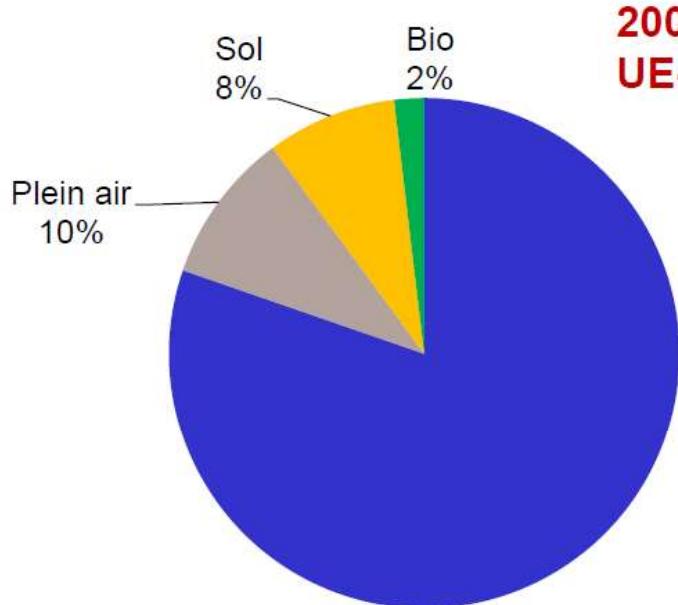
# 68.2 MT d'œufs produites dans le Monde en 2013

## > 1200 Milliards d'œufs chaque année

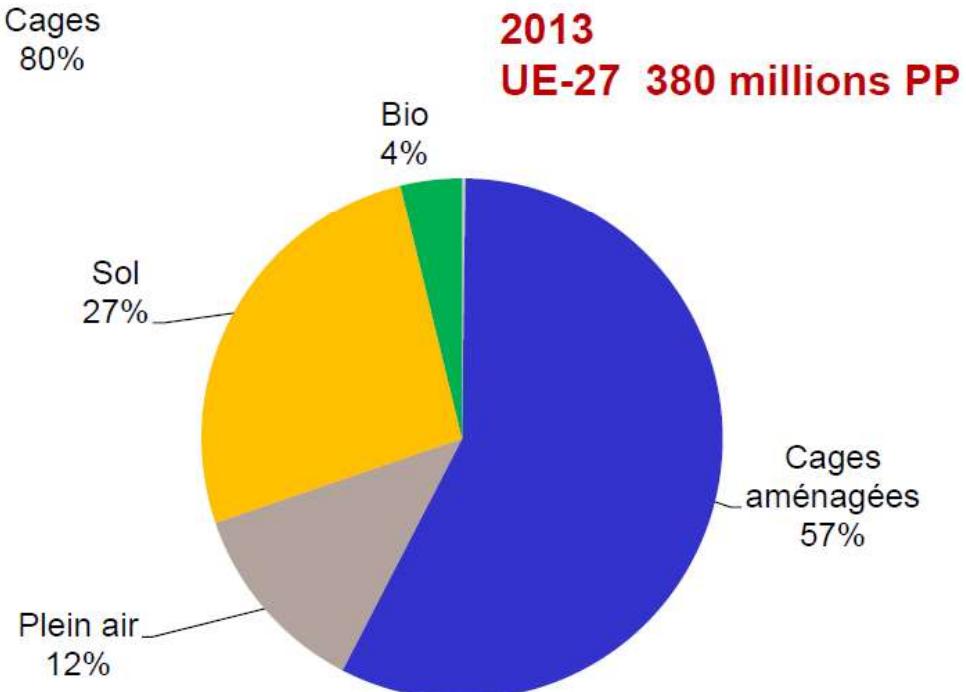


Itavi d'après FAO, Commission et FranceAgriMer

# Evolution des systèmes de production dans l'UE



2003  
UE-15 244 millions PP



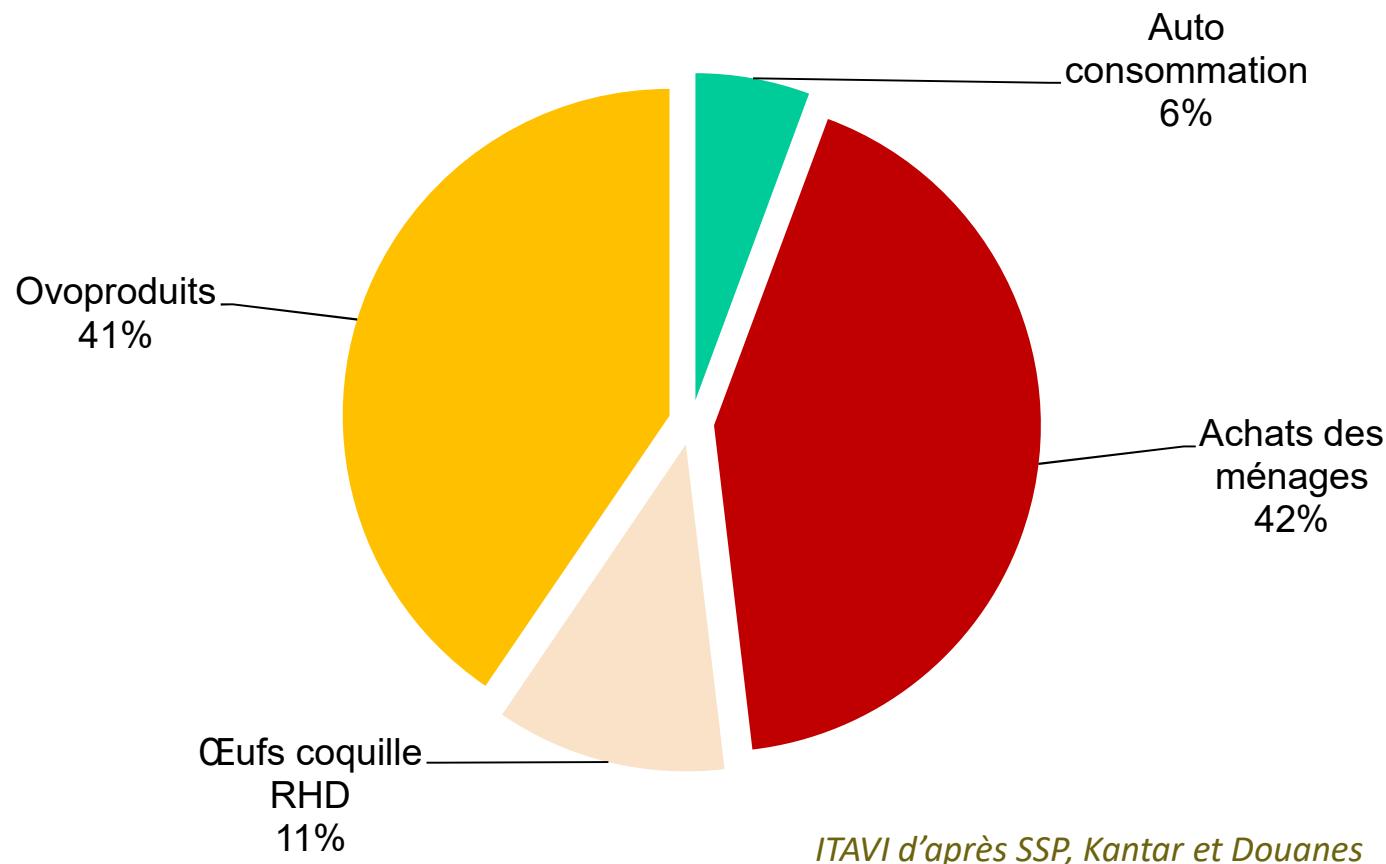
2013  
UE-27 380 millions PP



Source Commission européenne



# Répartition de la consommation globale française en 2013



# Microbiologie de l'œuf et des ovoproducts

- Au moment de la ponte, le contenu des œufs est généralement stérile
- Le pourcentage d'œufs frais contaminés reste souvent inférieur à 1 %
- Contamination verticale est rare
  
- La contamination horizontale est beaucoup plus fréquente
- Se produit après la ponte par contact avec les microorganismes
  - \* fientes
  - \* environnement élevage
  - \* centre de conditionnement
  - \* circuit de commercialisation
  - \* consommateur...
  
- Les œufs et produits d'œufs sont consommés crus (mayonnaise...)
- Impliqués dans 45% des salmonelloses (62 % pour *Salmonella enteritidis*)

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



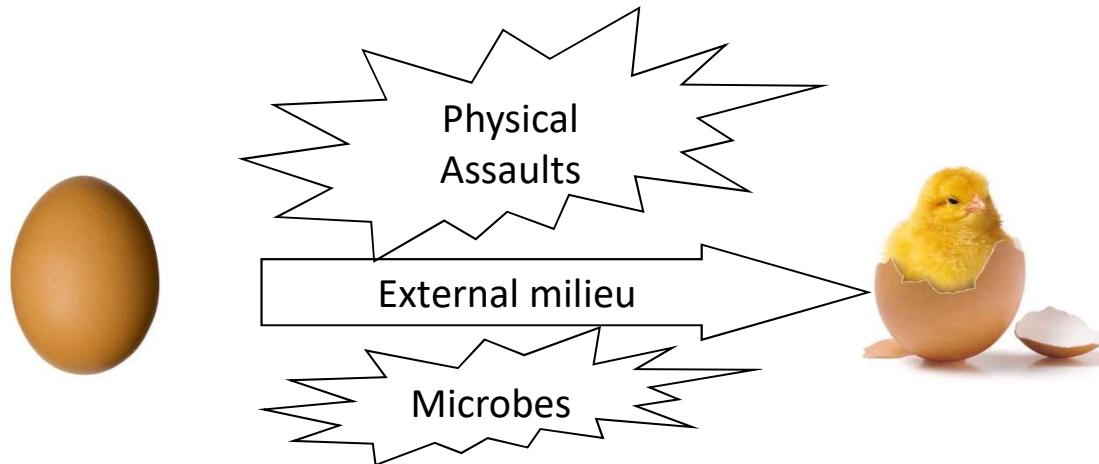
# L'œuf de poule

- ✓ Ingrédient de base pour la consommation humaine  
(Éléments nutritionnels parfaitement équilibrés)

**Chambre isolée pour permettre le développement de l'embryon**

Doit contenir la totalité des composants nécessaires au développement embryonnaire

→ Systèmes de protection (défenses naturelles de l'œuf)



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

**Valorisation alimentaire et non alimentaire de l'œuf et des produits d'œufs**

# L'œuf de poule

- ✓ Ingrédient de base pour la consommation humaine  
(Éléments nutritionnels parfaitement équilibrés)

**Chambre isolée pour permettre le développement de l'embryon**

→ **Rôle central des protéines déposées dans l'œuf**

→ **Identification et caractérisation des protéines de l'œuf**

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

**Valorisation alimentaire et non alimentaire de l'œuf et des produits d'oeufs**



# Plan

- I. Introduction
- II. Approches à haut débit pour identifier les protéines déposées dans l'œuf d'oiseaux
  - 1. Généralité – stratégie expérimentale
  - 2. Utilisation combinée des banques et outils
  - 3. Transcriptome de l'œuf
  - 4. Protéome de l'œuf
- III. Mieux comprendre les défenses de l'œuf grâce aux approches à haut débit  
Défense physique (coquille)
  - a) Protéines de la matrice organique et biominéralisation
  - b) Caractérisation fonctionnelle des protéines de la matrice
  - c) Avancées récentes en génomique pour améliorer la solidité de la coquille
- IV. Conclusion



# 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, 3'reads
418,700	EST, 5'reads
79,390	EST, other/unknown
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)

NCBI

dbEST: database of "Expressed Sequence Tags"

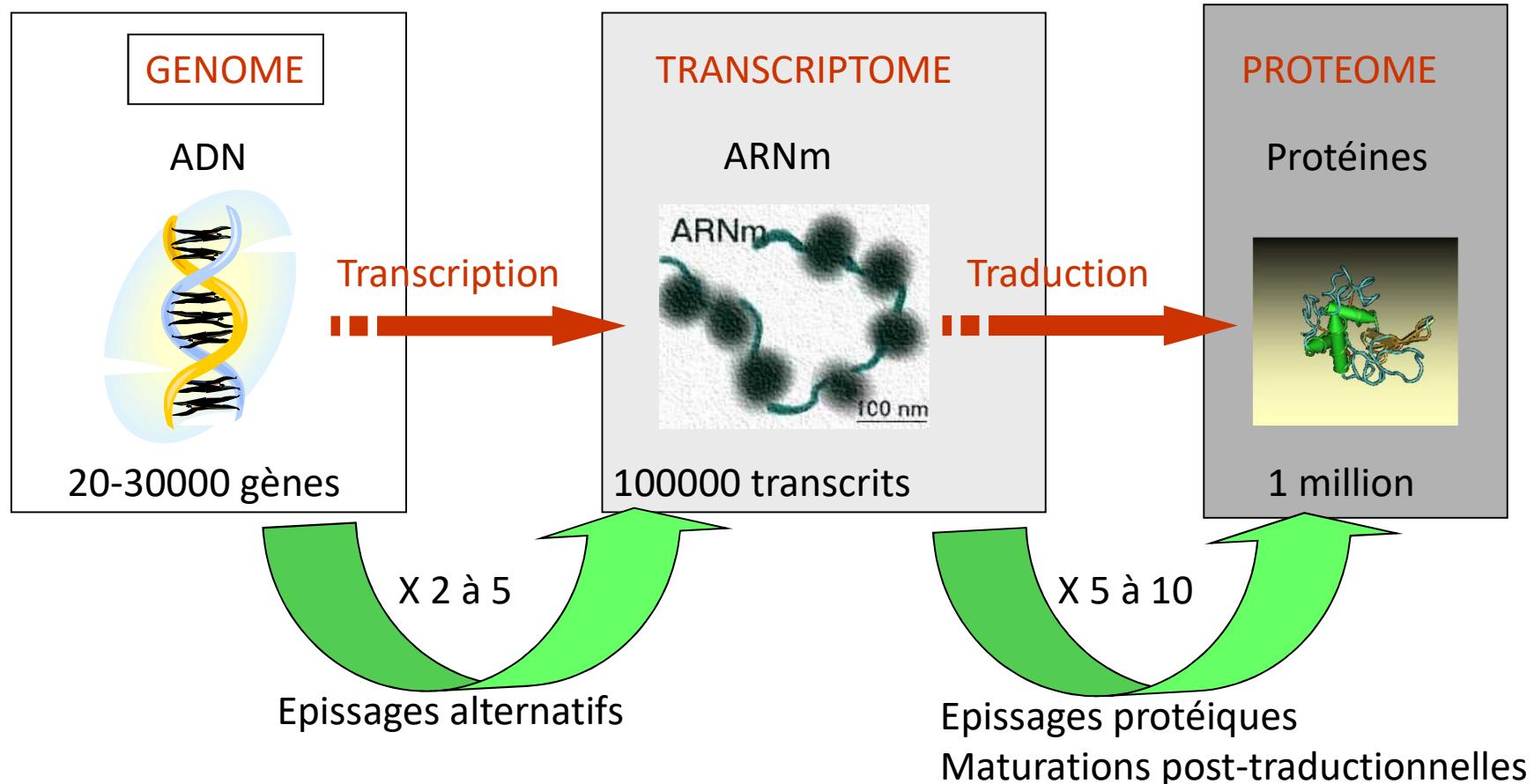
dbEST release 130101



# Les banques cDNA et EST

## Le but

\* Identifier les gènes fonctionnels



# Les 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

Recueil des tissus:

Nombreuses fonctions biologiques :

(Tissus reproducteurs, système digestif, Système nerveux central, foie, intestin, rate, ...)

Différentes conditions :

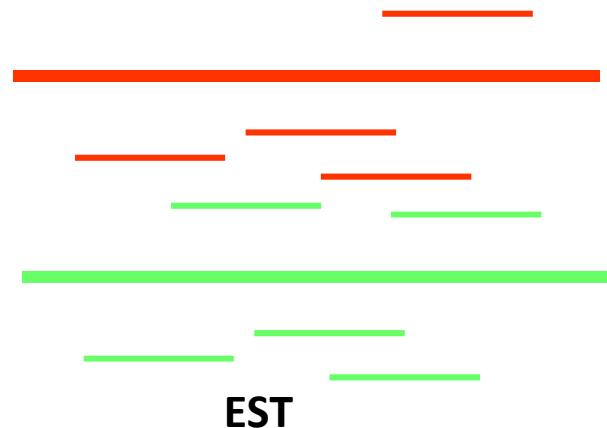
(embryons, jeunes, adultes, males, femelles, facteurs nutritionnels...)

→ ARNm → cDNAs

Clonage dans  
des bactéries

Séquence partielle du  
cDNA cloné (EST)

# Les 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>)



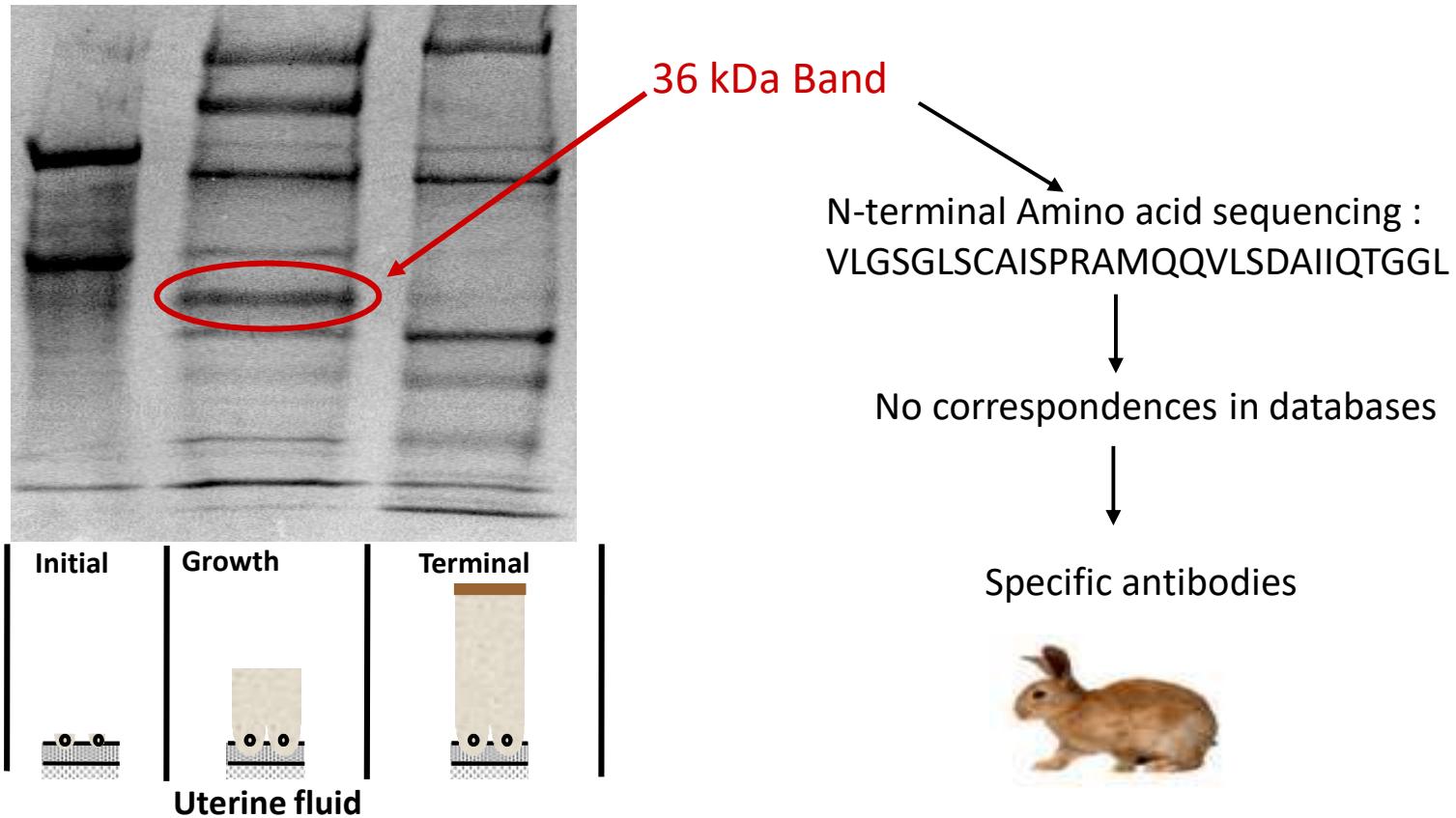
dbEST: database of "Expressed  
Sequence Tags"

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))

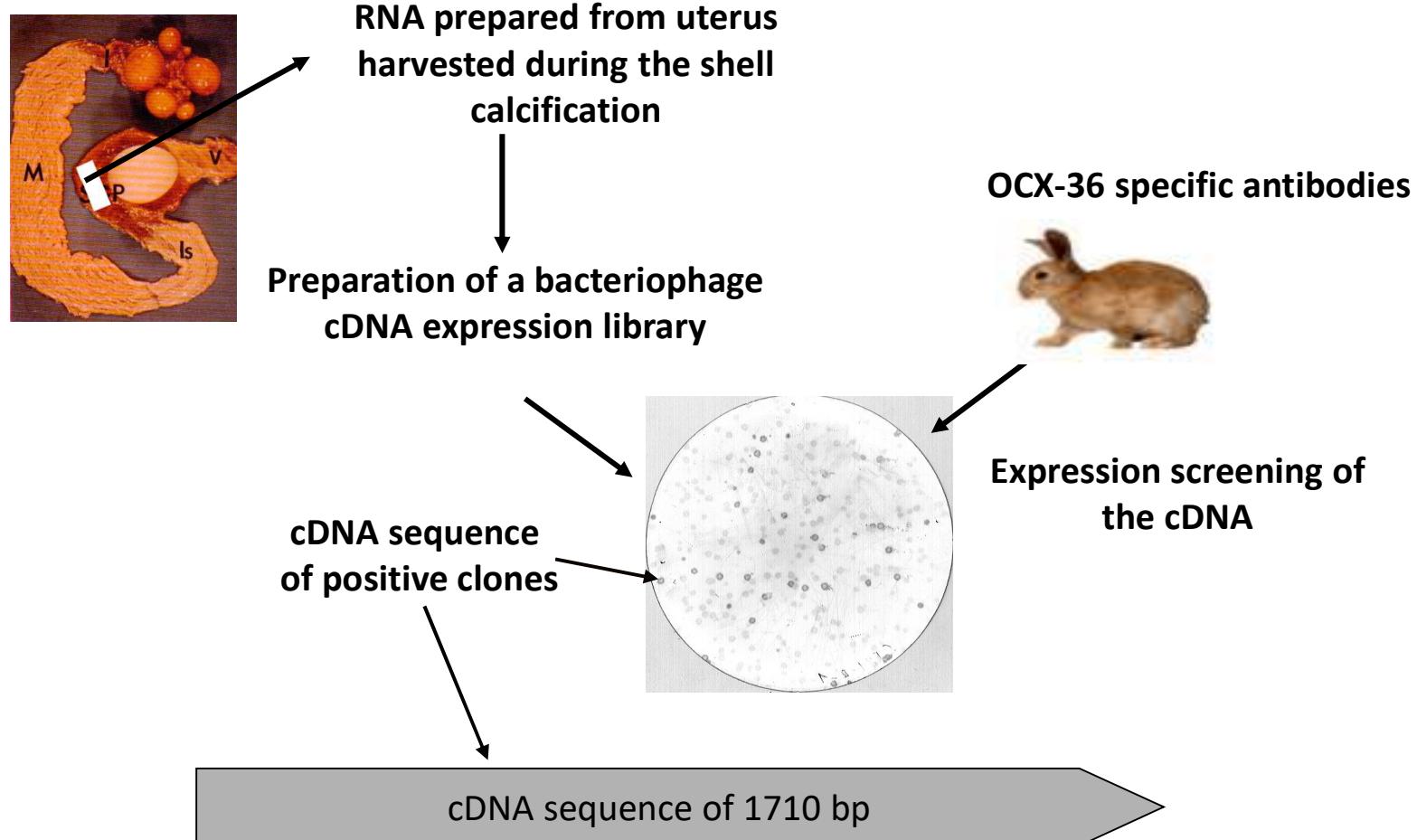
# Utilisation combinée des banques cDNA, EST, génomique et des outils de bioinformatique

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



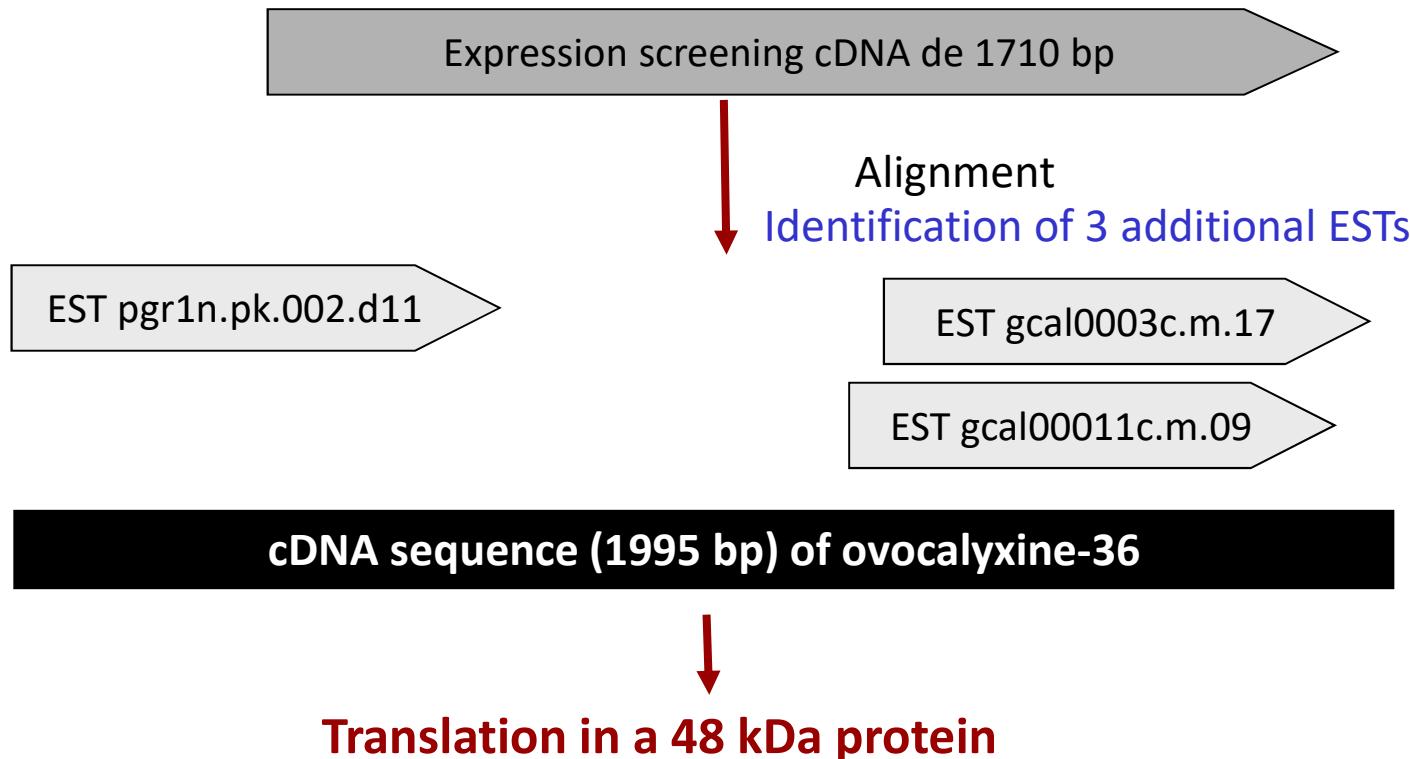
# Utilisation combinée des banques cDNA, EST, génomique et des outils de bioinformatique

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



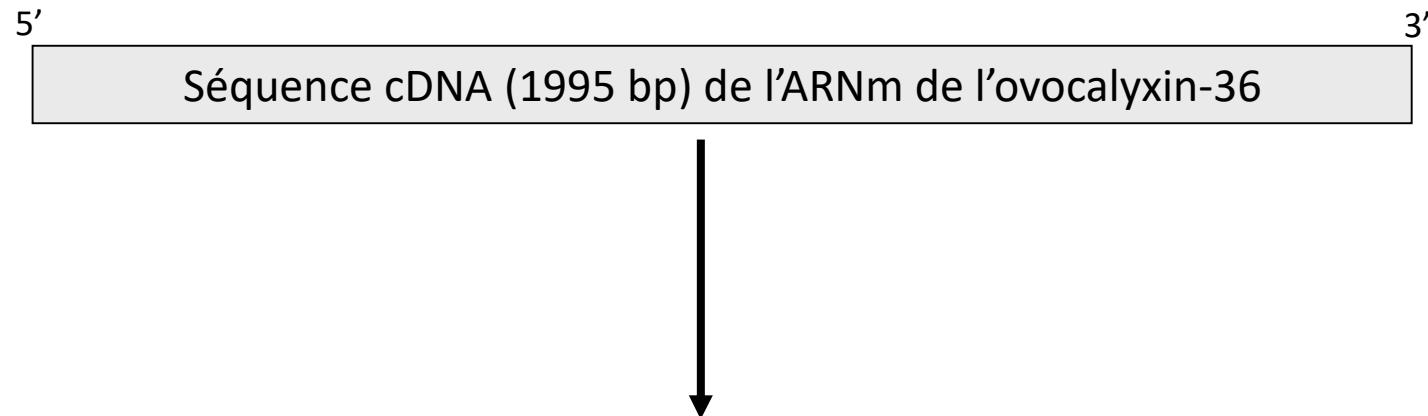
# Utilisation combinée des banques cDNA, EST, génomique et des outils de bioinformatique

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



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

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



Identification de la séquence génomique de l'ovocalyxine-36

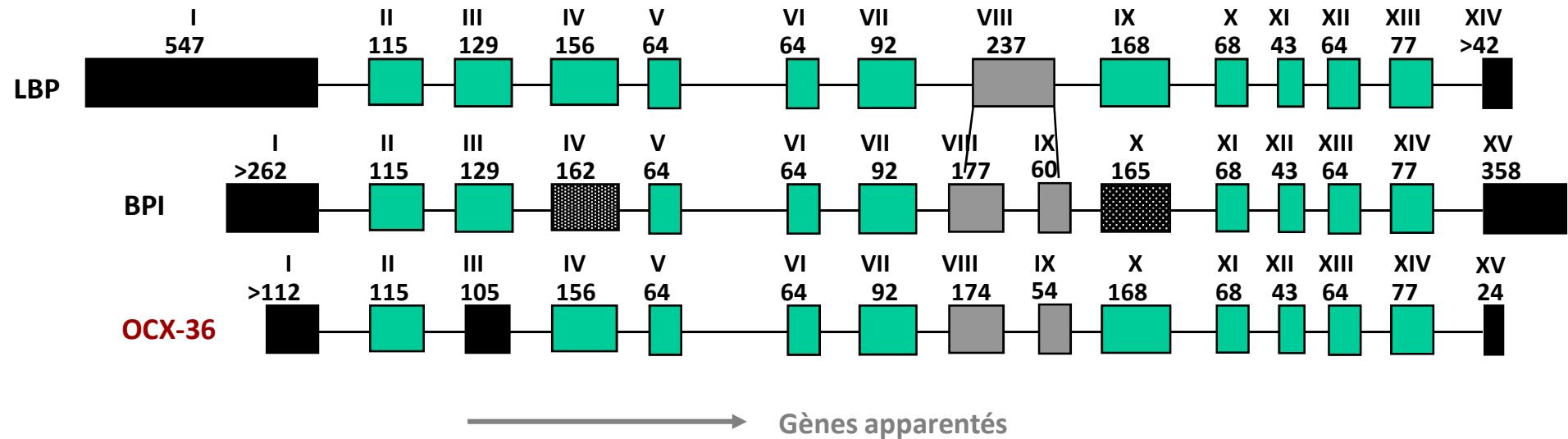
Chromosome 20

Position 9834141 et 9842177

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

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

Architecture du gène



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

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

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

# Ovocalyxin-36

BIOLOGY OF REPRODUCTION 83, 893–900 (2010)  
Published online before print 11 August 2010.  
DOI 10.1093/biolreprod.110.085019

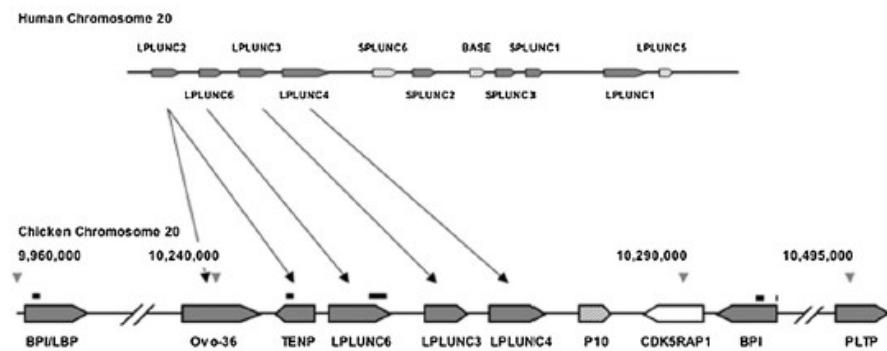
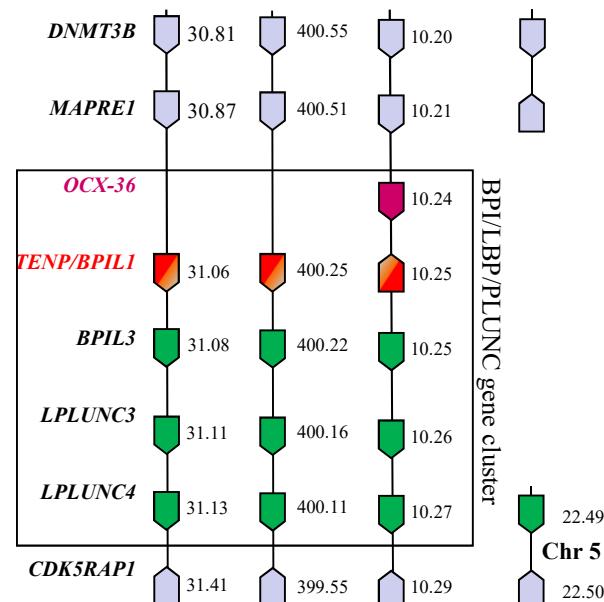
## Minireview

### 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

*H. sapiens* M. domestica G. Gallus O. latipes  
Chr 20 Chr 1 Chr 20 Ultra90



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

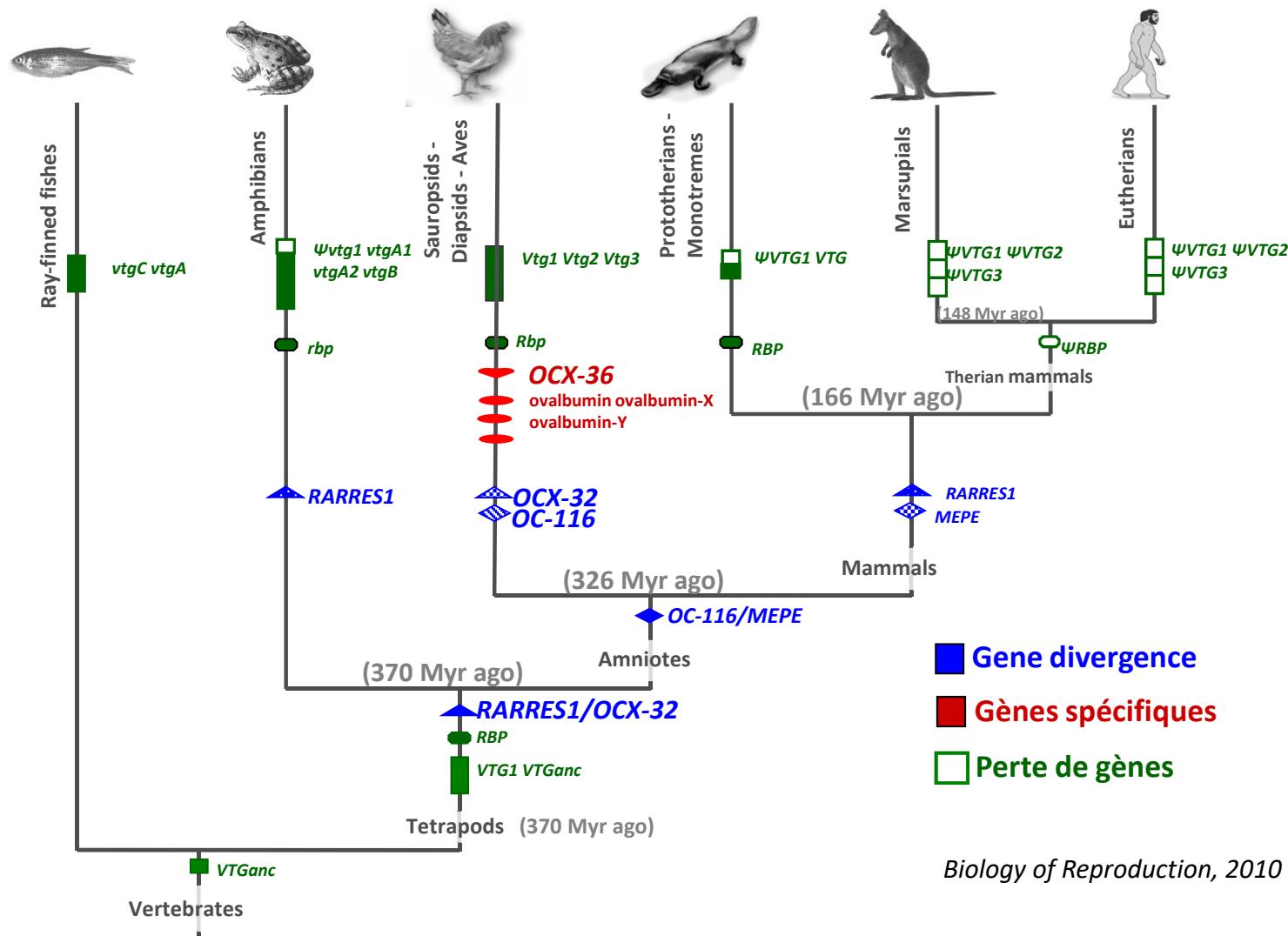
<sup>a</sup> Academic Unit of Respiratory Medicine, Department of Infection and Immunity, University of Sheffield, Sheffield S10 2JF, UK

<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



# Evolution des gènes

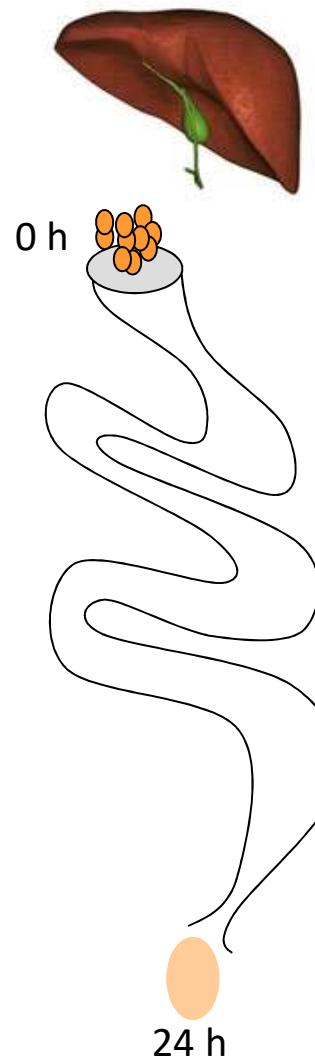


# Plan

- I. Introduction
- II. Approches à haut débit pour identifier les protéines déposées dans l'œuf d'oiseaux
  - 1. Généralité – stratégie expérimentale
  - 2. Utilisation combinée des banques et outils
  - 3. Transcriptome de l'œuf
  - 4. Protéome de l'œuf
- III. Mieux comprendre les défenses de l'œuf grâce aux approches à haut débit  
Défense physique (coquille)
  - a) Protéines de la matrice organique et biominéralisation
  - b) Caractérisation fonctionnelle des protéines de la matrice
  - c) Avancées récentes en génomique pour améliorer la solidité de la coquille
- IV. Conclusion



# La formation de l'œuf



## Foie

Protéines du jaune  
(maturité sexuelle)

## Ovaire

## infundibulum

Membranes vitellines  
(< 1 h)

## Magnum

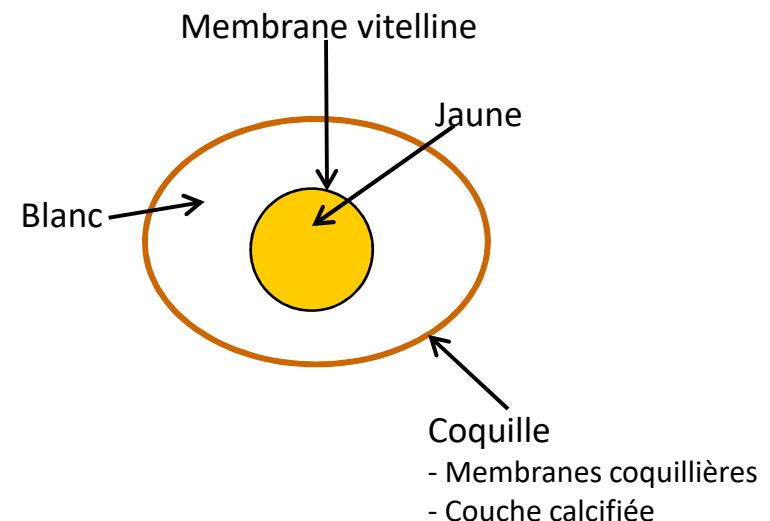
Protéines du blanc  
(1h – 4h30)

## Isthme

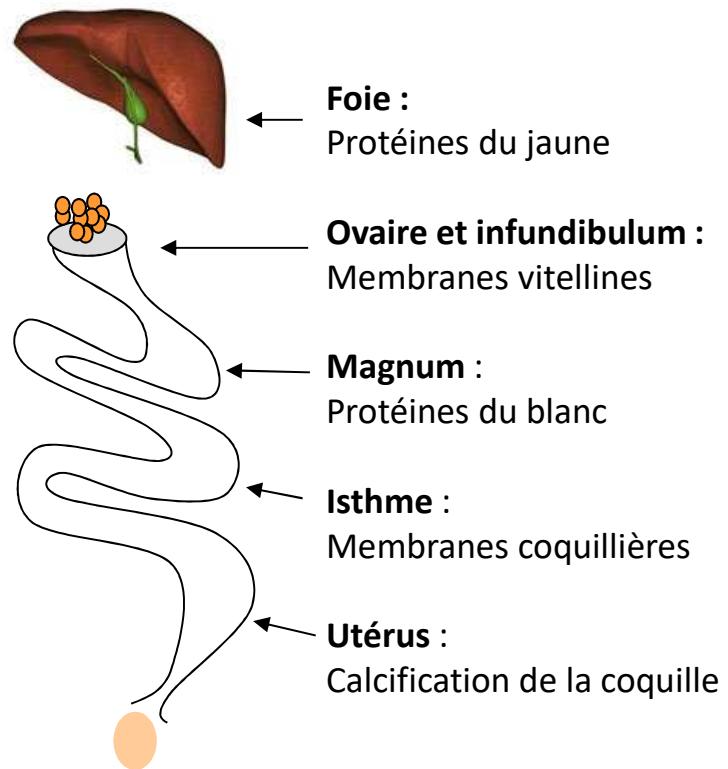
Membranes coquillières  
(4h30-6h)

## Utérus

Calcification de la coquille  
(6h – 24 h)



# La transcriptomique



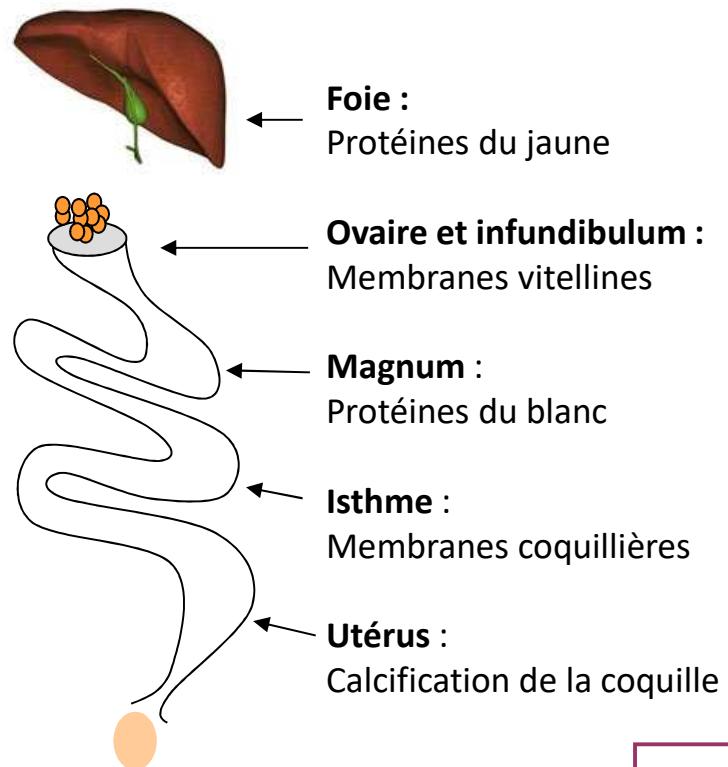
L'appareil reproducteur de la poule est un modèle parfaitement adapté à une approche transcriptomique

Formation dans le temps et l'espace des constituants de l'œuf

Spécialisation des tissus ou organes

Différents stades physiologiques

# La transcriptomique



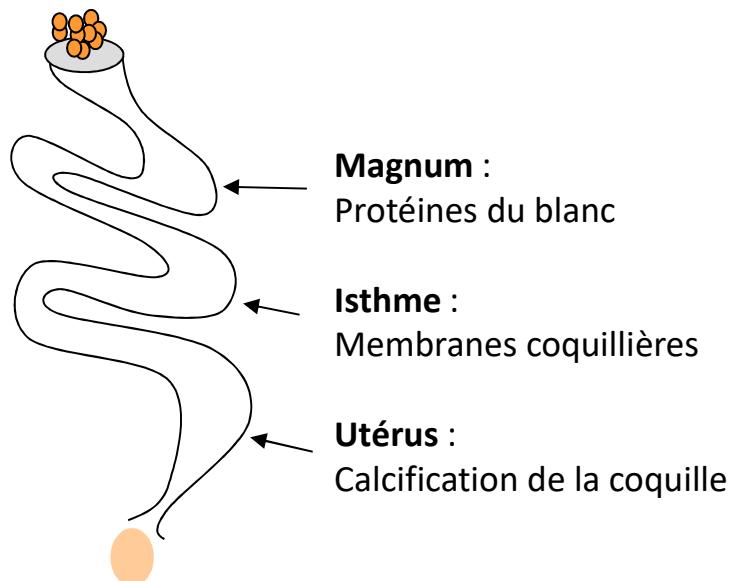
Utilisation de puces à ADN ou RNA-Seq

Comparaison de l'expression des gènes entre les différents tissus

Quantification des gènes spécifiquement exprimés en relation avec la formation du jaune, des membranes vitellines, du blanc d'oeuf, des membranes coquillères et de la calcification de la coquille

# La transcriptomique

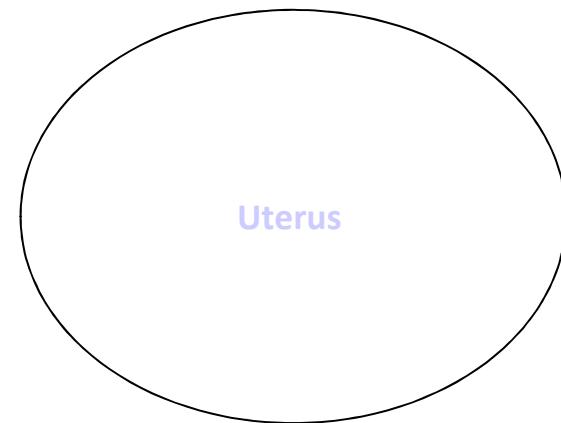
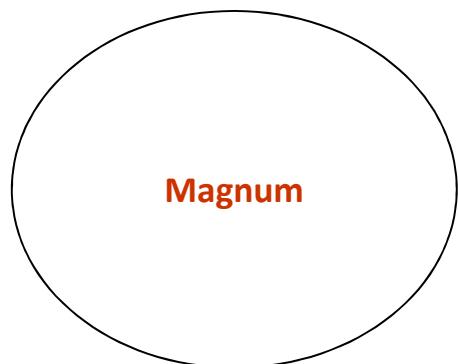
Identification des gènes spécifiquement impliqués dans la synthèse du blanc, des membranes coquillières et la calcification de la coquille



Utilisation de puces à ADN  
↓  
Comparaison de l'expression des gènes  
entre les différents tissus

# La transcriptomique

Several differentially expressed genes  
(Fold difference range from 1.98 to 174.1)

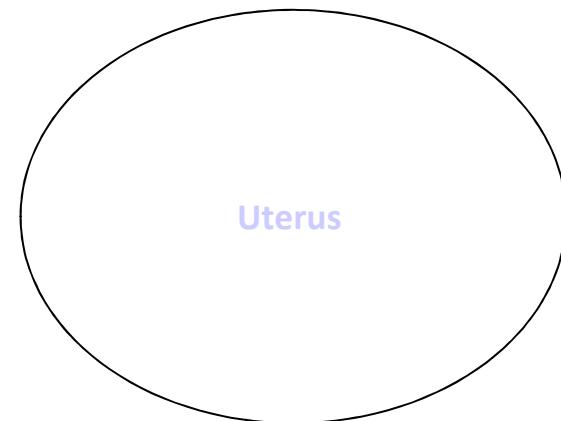
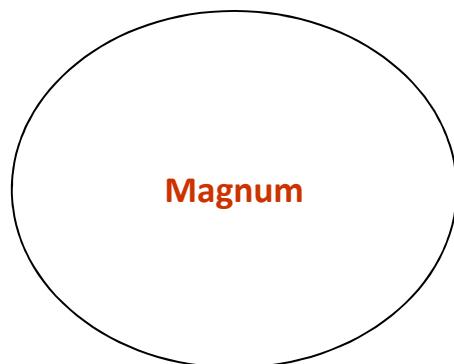


Tissue specific genes ?



# La transcriptomique

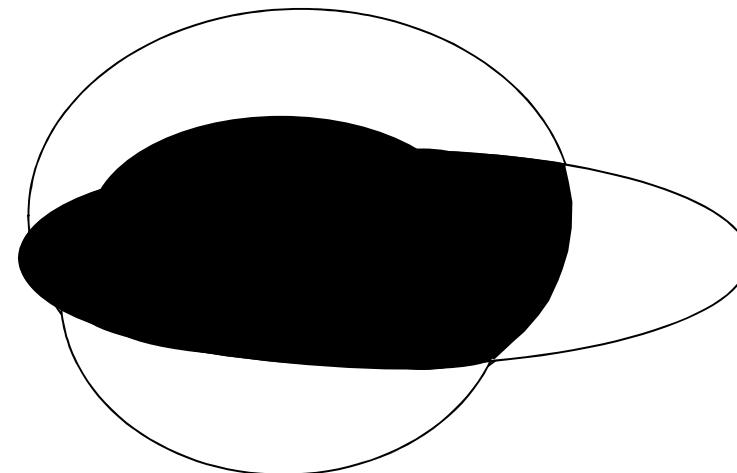
Several differentially expressed genes  
(Fold difference range from 1.98 to 174.1)



# La transcriptomique

Several differentially expressed genes  
(Fold difference range from 1.98 to 174.1)

Magnum (egg white deposition)



White isthmus (eggshell  
membranes)

Uterus (eggshell calcification)

# La transcriptomique

✓ Transcriptomics (microarrays, RNA seq)



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



Ovary and infundibulum:  
Vitelline membranes (less 1 h)

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



Open Access

RESEARCH ARTICLE

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

Nombreuses Etudes de RNA SEQ en cours

Milliers de nouvelles séquences géniques

Brionne et al.  
<http://www.>

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\*

RESEARCH ARTICLE

Open Access

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

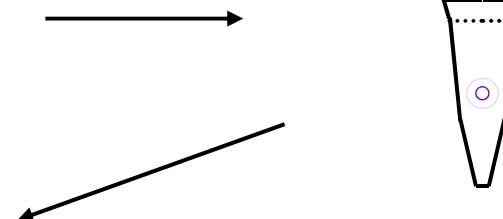
Vincent Jonchère<sup>1</sup>, Sophie Réhault-Godbert<sup>1</sup>, Christelle Hennequet-Antier<sup>1</sup>, Cédric Cabau<sup>1</sup>, Vonick Sibut<sup>1,3</sup>, Larry A Cogburn<sup>2</sup>, Yves Nys<sup>1</sup>, Joël Gautron<sup>1\*</sup>

# La protéomique

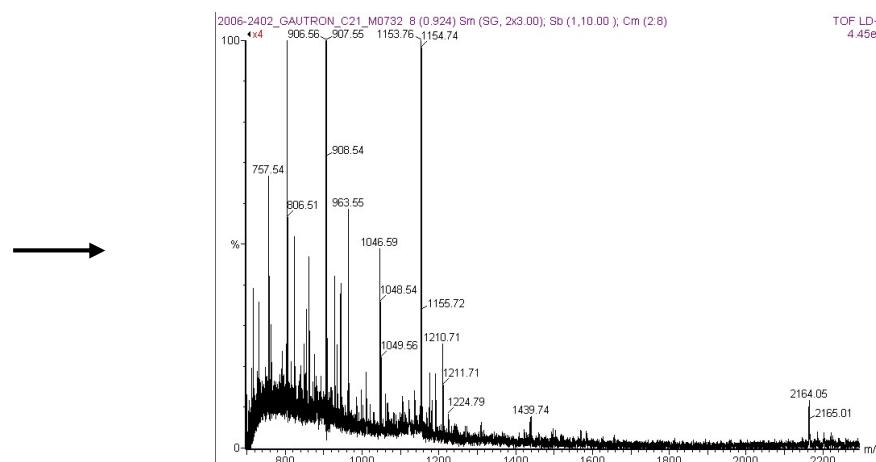
(Mass spectrometry-based methods for protein identification)

Digestion protéique (trypsine)

Séparation des protéines  
(Chromatographie 2D, Electrophorèse 2D)

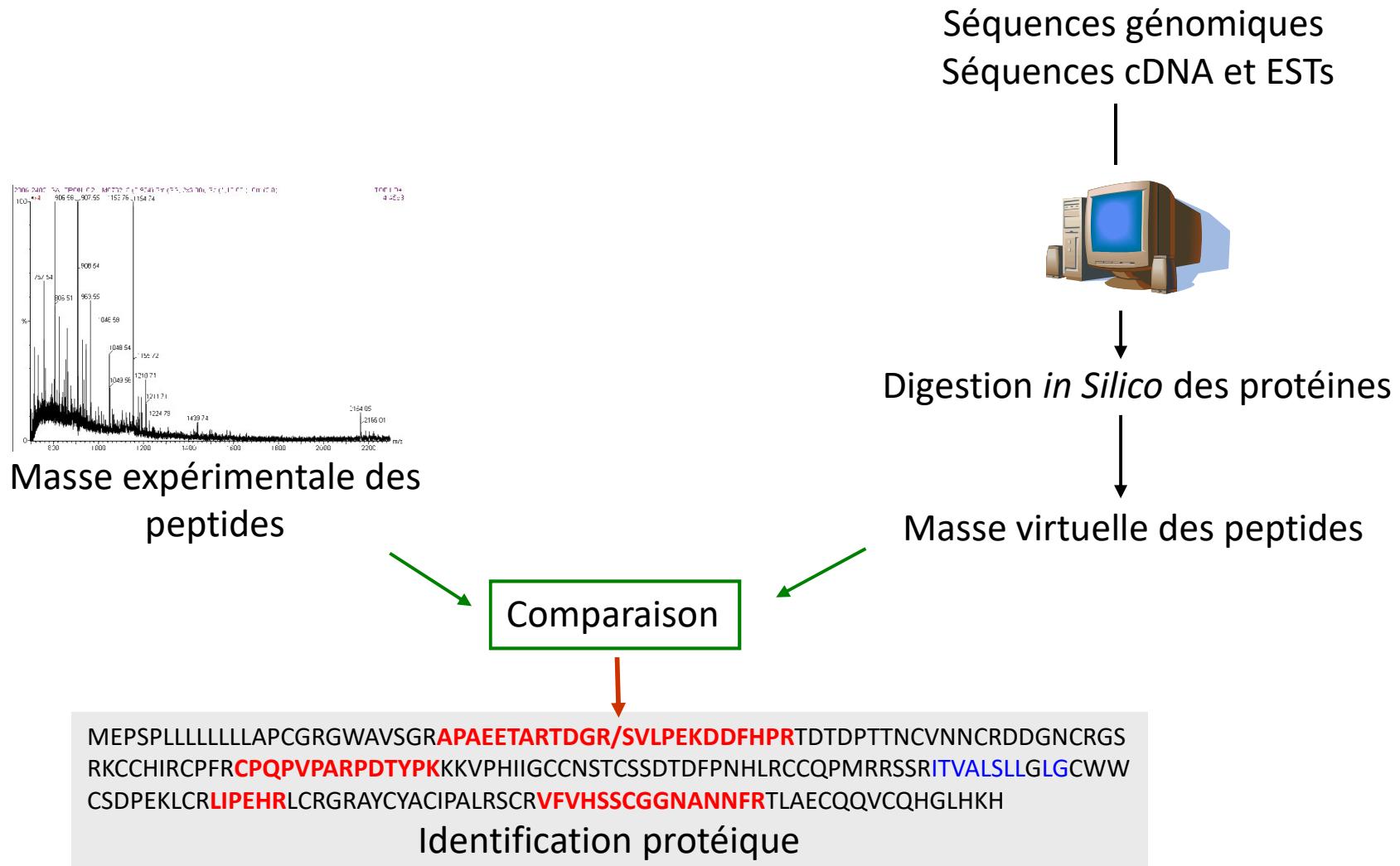


Fragments peptidiques des protéines



Détermination de la masse Réelle des peptides

# La protéomique



# La protéomique

L'analyse protéomique se base sur la protéine (unité fonctionnelle)

Toutefois elle est limitée aux protéines dont la séquence est disponible

L'analyse transcriptomique est basée sur les ARNm

Elle permet donc l'analyse des gènes et des protéines non identifiées dans les bases



# La protéomique

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

178  
RESEARCH ARTICLE

DOI 10.1002/pmic.200700790

Proteomics 2008, 8, 178–191

## The chicken egg yolk plasma and granule proteomes

Karlheinz Mann and Matthias Mann

Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Proteomics und Signaltransduktion, Martinsried, Germany



Chicken egg yolk cytoplasmic proteome, mined via combinatorial peptide ligand libraries

Alessia Farinazzo<sup>a</sup>, Umberto Restuccia<sup>b</sup>, Angela Bach<sup>b</sup>, Luc Guerrier<sup>c</sup>, Frederic Fortis<sup>c</sup>, Egisto Boschetto<sup>c</sup>, Elisa Fasoli<sup>a</sup>, Attilio Citterio<sup>a</sup>, Pier Giorgio Righetti<sup>a,\*</sup>

3558  
RESEARCH ARTICLE

DOI 10.1002/pmic.200700397

Proteomics 2007, 7, 3558–3568

## The chicken egg white proteome

Karlheinz Mann  
Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Proteomics und Signaltransduktion, Martinsried, Germany



Exploring the Chicken Egg White Proteome with Combinatorial Peptide Ligand Libraries

Chiara D'Ambrosio,<sup>1</sup> Simona Arena,<sup>1</sup> Andrea Scaloni,<sup>1</sup> Luc Guerrier,<sup>1</sup> Egisto Boschetto,<sup>1</sup> Martha Elena Mendieta,<sup>2</sup> Attilio Citterio,<sup>2</sup> and Pier Giorgio Righetti<sup>1,\*</sup>



Gautron J. / Eggshell formation

2322

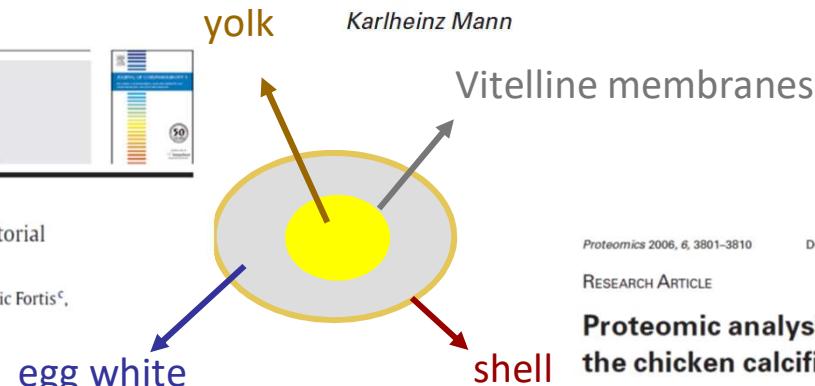
DOI 10.1002/pmic.200800032

Proteomics 2008, 8, 2322–2332

RESEARCH ARTICLE

## Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane

Karlheinz Mann



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



Quantitative proteomics provides new insights into chicken eggshell matrix protein functions during the primary events of mineralisation and the active calcification phase

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>, Alejandro E

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



proteins

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>

<sup>a</sup>INRA, UR83 Recherches Avicoles, Fonction et Régulation des Protéines de l'œuf, F-37380 Nouzilly, France

<sup>b</sup>INRA, UMR INRA85, UMR CNRS 7247, Université de Tours, IFCE, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomolécules, Laboratoire de Spectrométrie de Masse, F-37380 Nouzilly, France



# « omics » to identify novel egg proteins



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

>4000 different 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



**How many in each compartments ?  
What is common, what is compartment specific ?  
Functions in the egg ?**



Data mining and bioinformatics tools



Loading of the sequences, multi alignment to eliminate redundancies

Repartition in individual egg compartments

Update of functional annotations

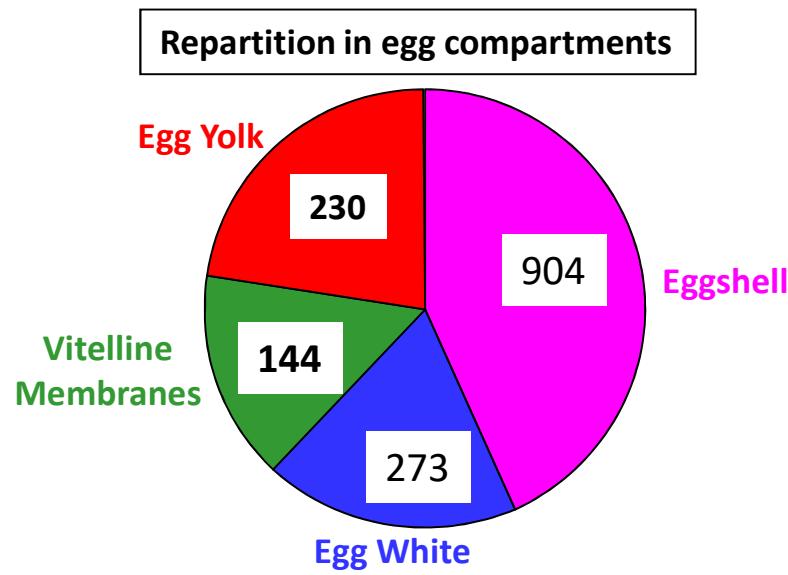
# Novel egg proteins



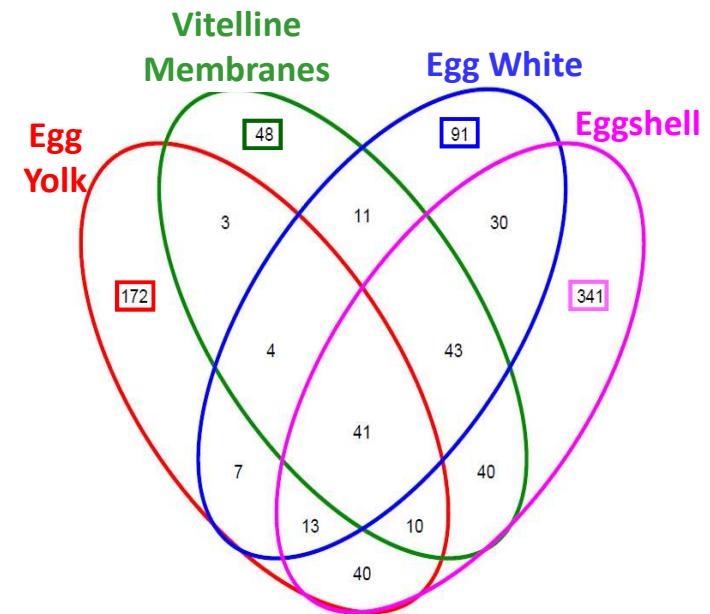
894 genes encode egg proteins

Protein variants  
and isoforms

1261 non redundant proteins in the egg



Common, shared and specific proteins

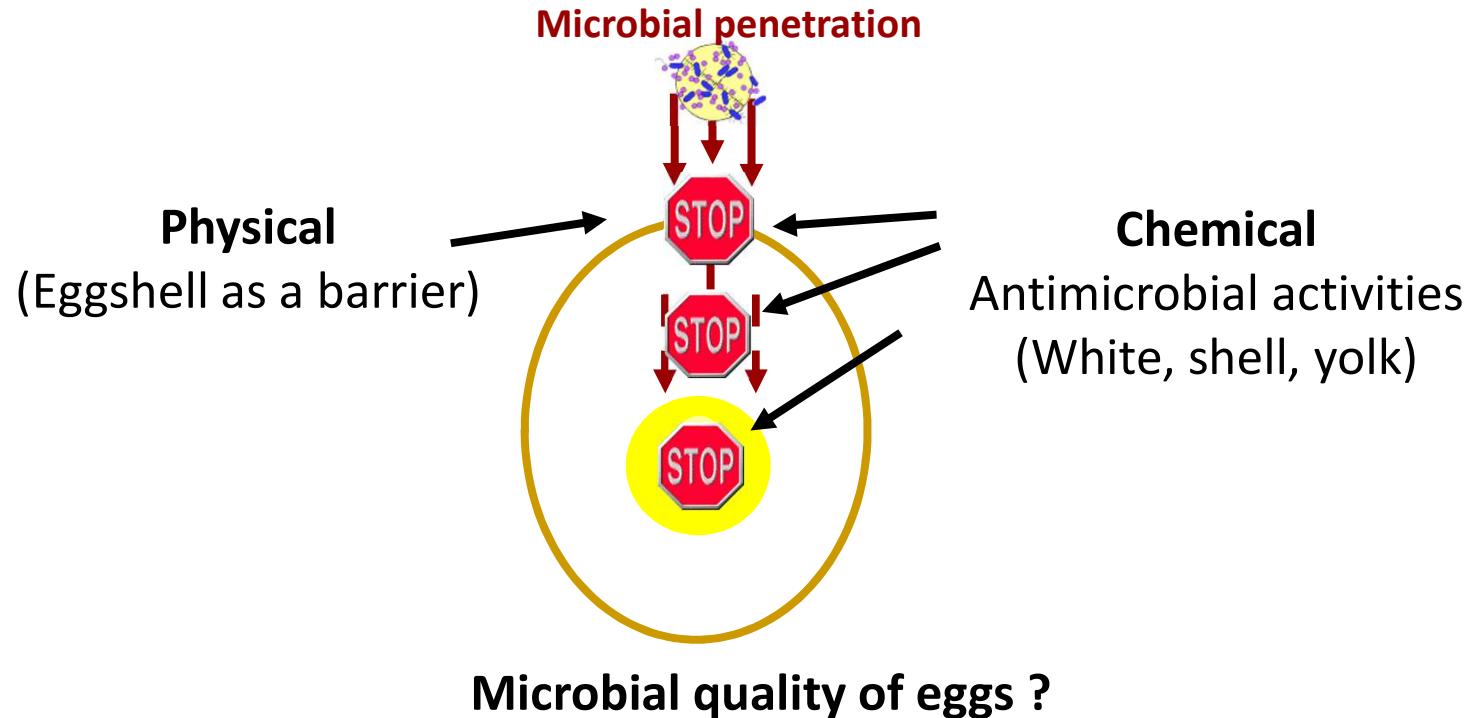


# Plan

- I. Introduction
- II. Approches à haut débit pour identifier les protéines de l'œuf
  - 1. Généralité – stratégie expérimentale
  - 2. Utilisation combinée des banques et outils
  - 3. Transcriptome de l'œuf
  - 4. Protéome de l'œuf
- III. Mieux comprendre les défenses de l'œuf grâce aux approches à haut débit  
Défense physique (coquille)
  - a) Protéines de la matrice organique et biominéralisation
  - b) Caractérisation fonctionnelle des protéines de la matrice
  - c) Avancées récentes en génomique pour améliorer la solidité de la coquille
- IV. Conclusion



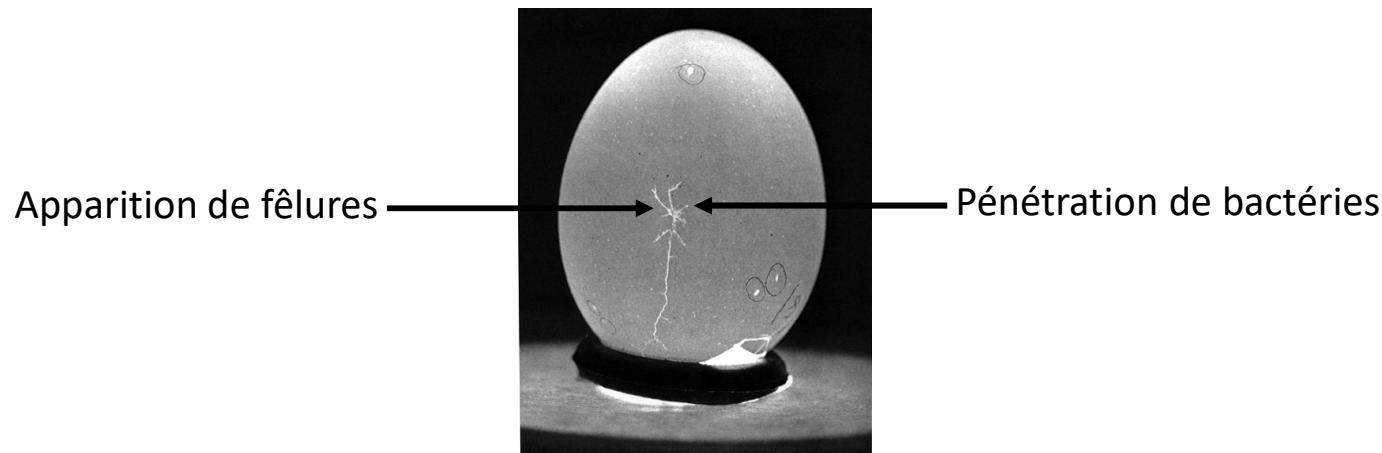
# Egg defences



Humans toxi-infections

# La coquille : une barrière physique contre la pénétration bactérienne

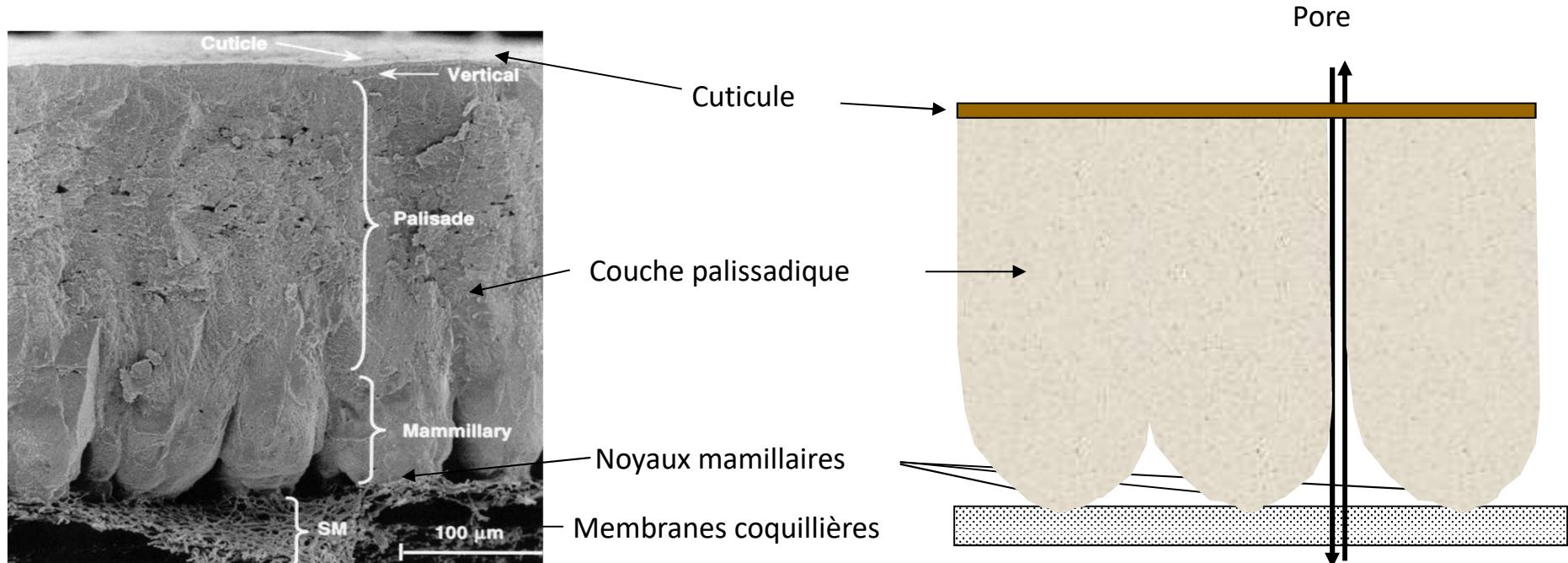
→ L'intégrité de la coquille est cruciale pour la sécurité alimentaire du consommateur



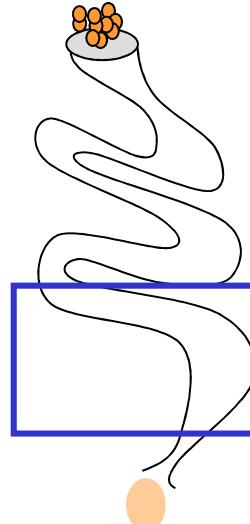
Comprendre les mécanismes de fabrication de la coquille et déterminer l'origine de ses faiblesses

Développer de nouveaux outils pour la sélection

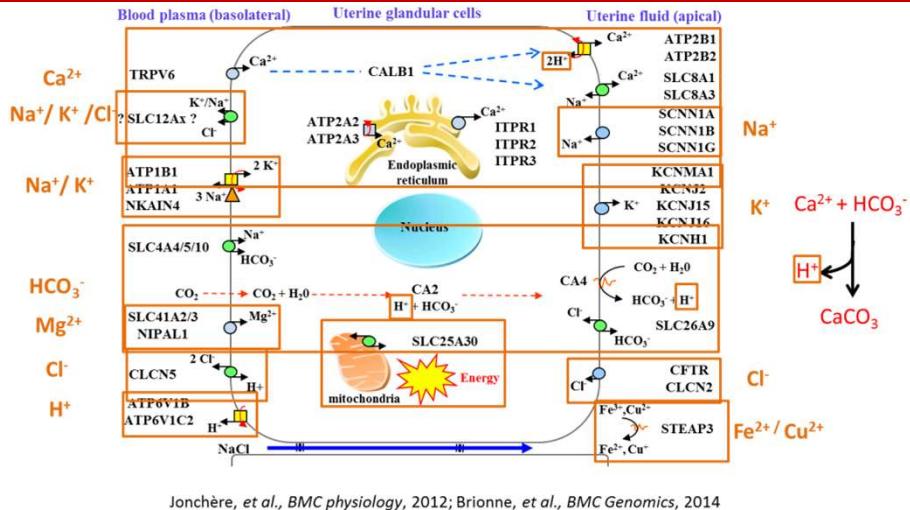
# La coquille (défense physique)



# Eggshell biomineralization in uterus

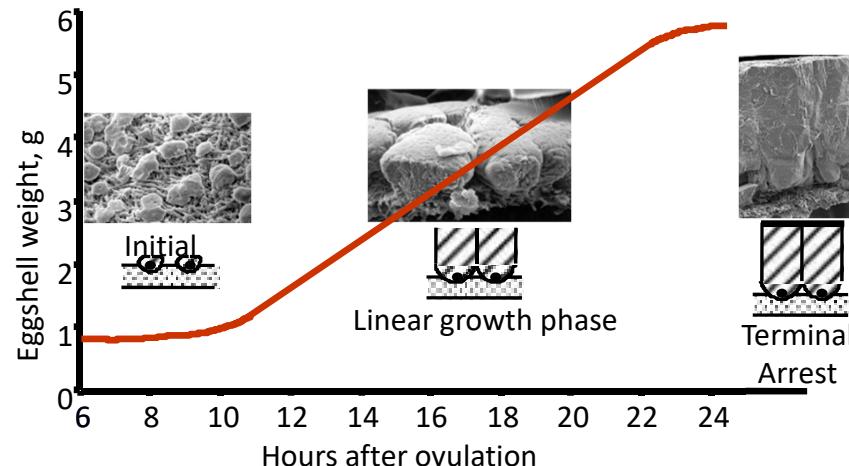


Supply of minerals for shell mineralization



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

3 main phases in the uterine fluid (acellular milieu)



# La Biomérisation

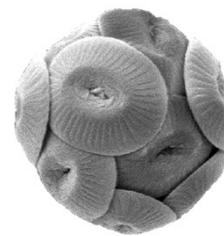
→ PROCESSUS UNIVERSEL ET CONSERVE SUR TERRE

\* Dépôts de minéraux sous conditions physiologiques dans un organisme vivant qui aboutit à la formation de structures très diversifiées avec des formes, des tailles et des couleurs différentes

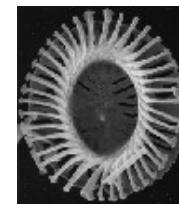
## Biomérisation acellulaire dite contrôlée



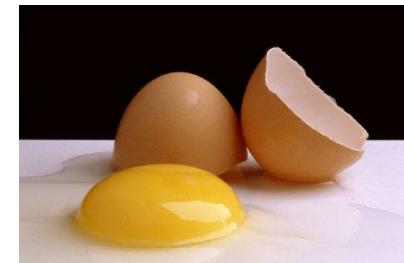
Perle



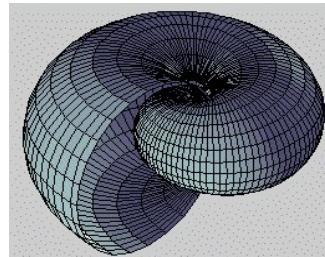
Coccolithes



Corail



Coquilles d'oiseaux



Coquilles de mollusques



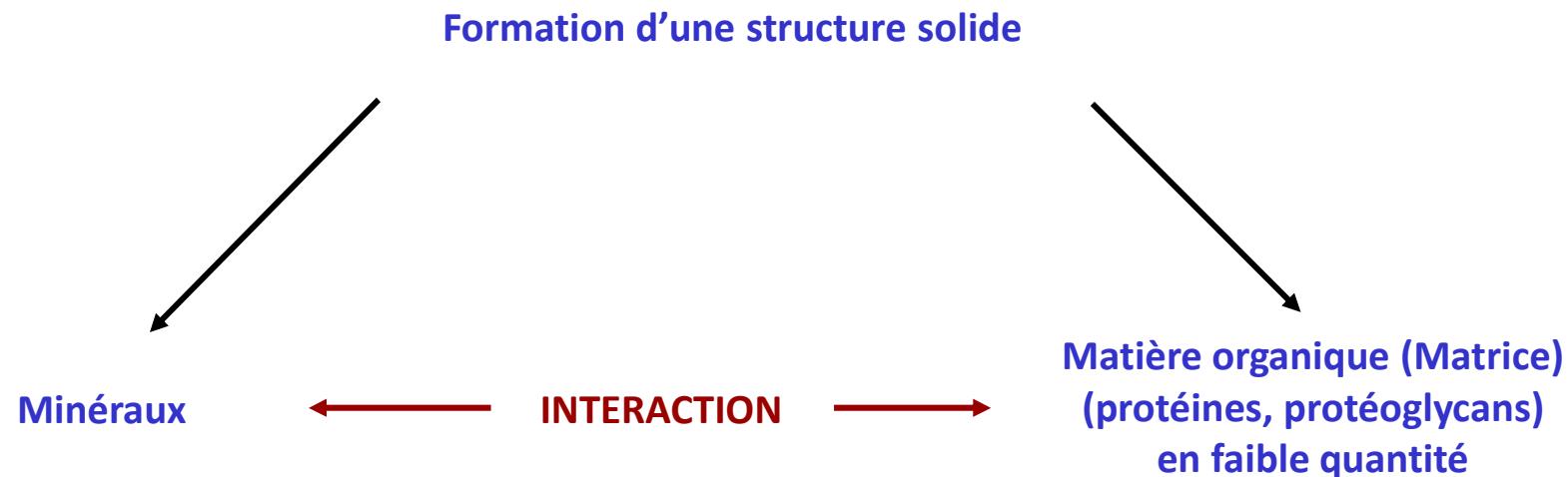
gastéropodes



# La Bioméminéralisation

→ PROCESSUS UNIVERSEL ET CONSERVE SUR TERRE

Malgré la diversité de formes et de fonctions, les structures bioméminérales se forment toujours selon les mêmes principes



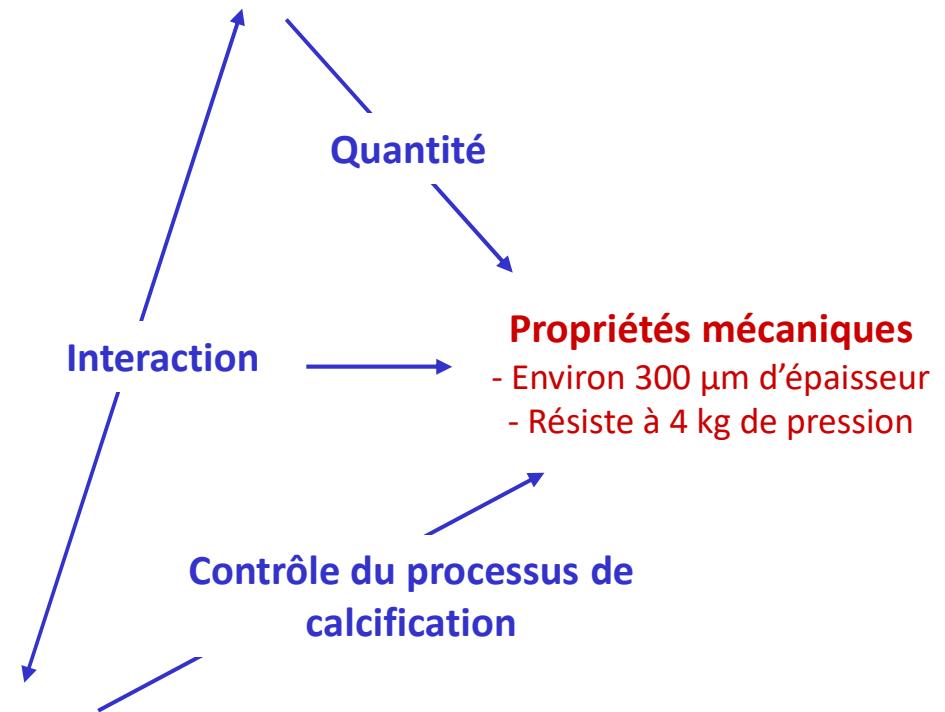
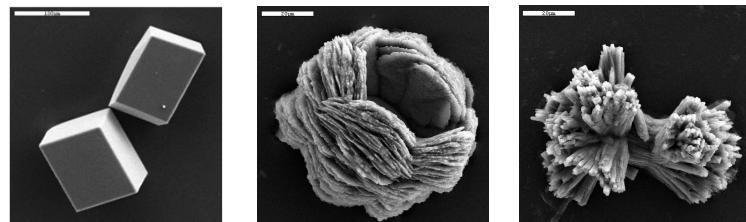
# La Bioméminéralisation

→ PROCESSUS UNIVERSEL ET CONSERVE SUR TERRE

Malgré la diversité de formes et de fonctions, les structures bioméminérales se forment toujours selon les mêmes principes

→ 95% de carbonate de calcium sous forme de calcite

Calcite      Aragonite      Vatérite



→ 3,5% de matière organique (matrice organique)  
*Protéines et protéoglycans*

# La Bioméminéralisation

## → PROCESSUS UNIVERSEL ET CONSERVE SUR TERRE

Malgré la diversité de formes et de fonctions, les structures bioméminérales se forment toujours selon les mêmes principes

Un espace biologiquement compartimenté (utérus pour la poule)

C'est dans cet espace que les entrées ioniques et organiques sont contrôlées pour atteindre les conditions physico-chimiques précises

Une hypersaturation du milieu

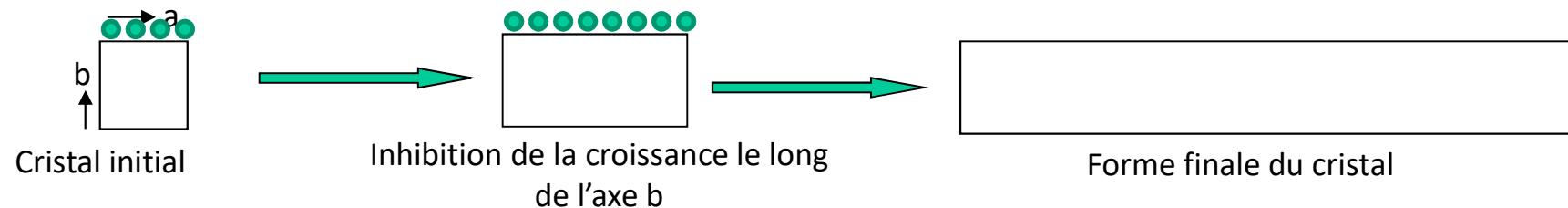
→ Les ions constitutifs du minéral doivent se trouver en conditions saturantes

La nucléation et la croissance du minéral

→ L'initiation de la cristallisation se fait à partir de sites se trouvant dans le milieu (nucléation)

La matrice organique joue souvent ce rôle dans les bioméminéraux

- Elle inhibe la croissance du minéral selon un ou plusieurs axes



# La Bioméridéralisation

→ PROCESSUS UNIVERSEL ET CONSERVE SUR TERRE

Malgré la diversité de formes et de fonctions, les structures bioméridérales se forment toujours selon les mêmes principes

Un espace biologiquement compartimenté (utérus pour la poule)

C'est dans cet espace que les entrées ioniques et organiques sont contrôlées pour atteindre les conditions physico-chimiques précises

Une hypersaturation du milieu

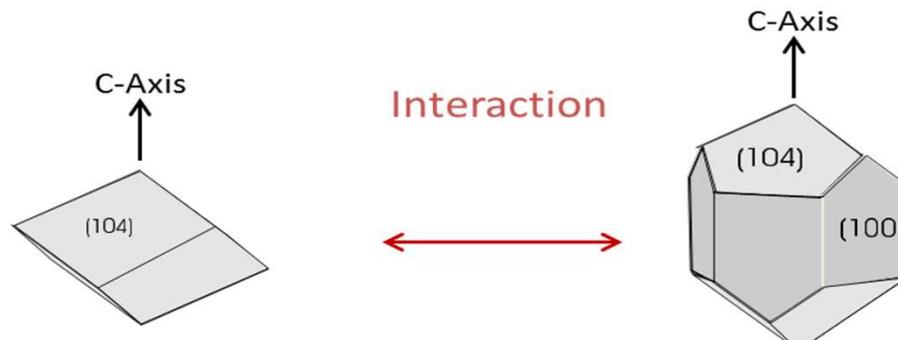
→ Les ions constitutifs du minéral doivent se trouver en conditions saturantes

La nucléation et la croissance du minéral

→ L'initiation de la cristallisation se fait à partir de sites se trouvant dans le milieu (nucléation)

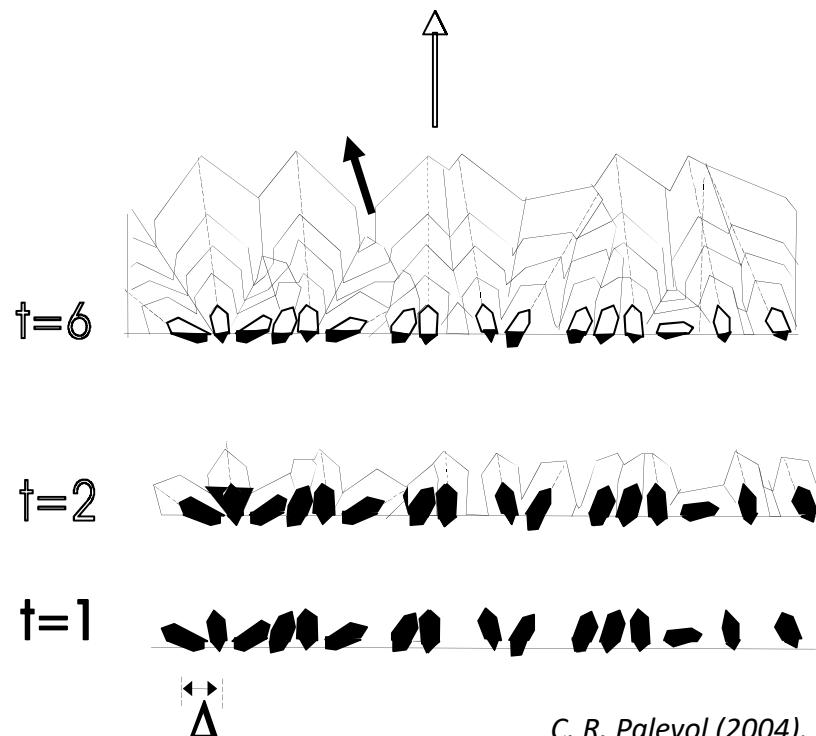
La matrice organique joue souvent ce rôle dans les bioméridéraux

- Elle inhibe la croissance du minéral selon un ou plusieurs axes

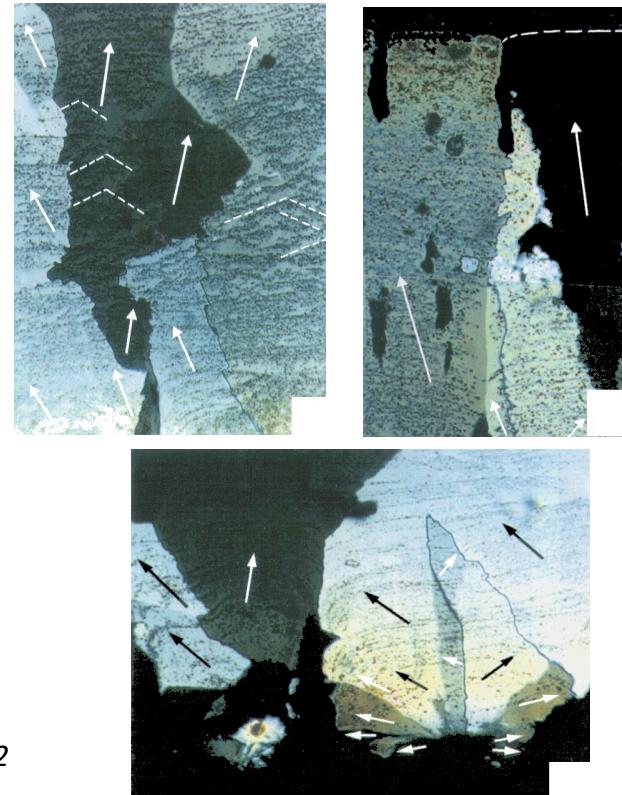


# La formation de la coquille, un processus de biominéralisation

- Séquence temporelle de la nucléation, de la croissance
- Modulée par la matrice organique



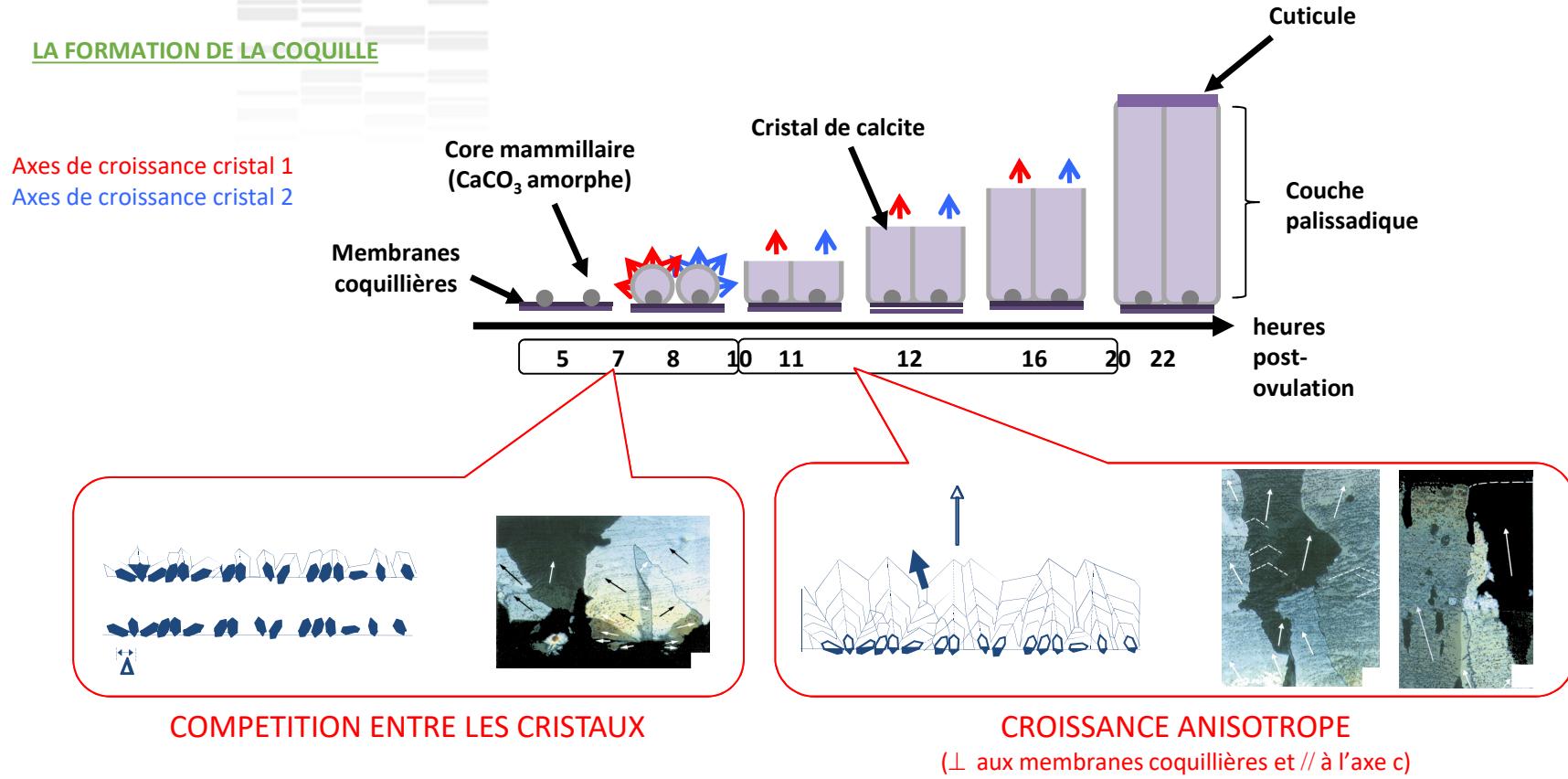
C. R. Palevol (2004), 3, 549-562



- Identification et caractérisation des protéines de la matrice organique

# Functions of eggshell matrix proteins

## LA FORMATION DE LA COUILLIE



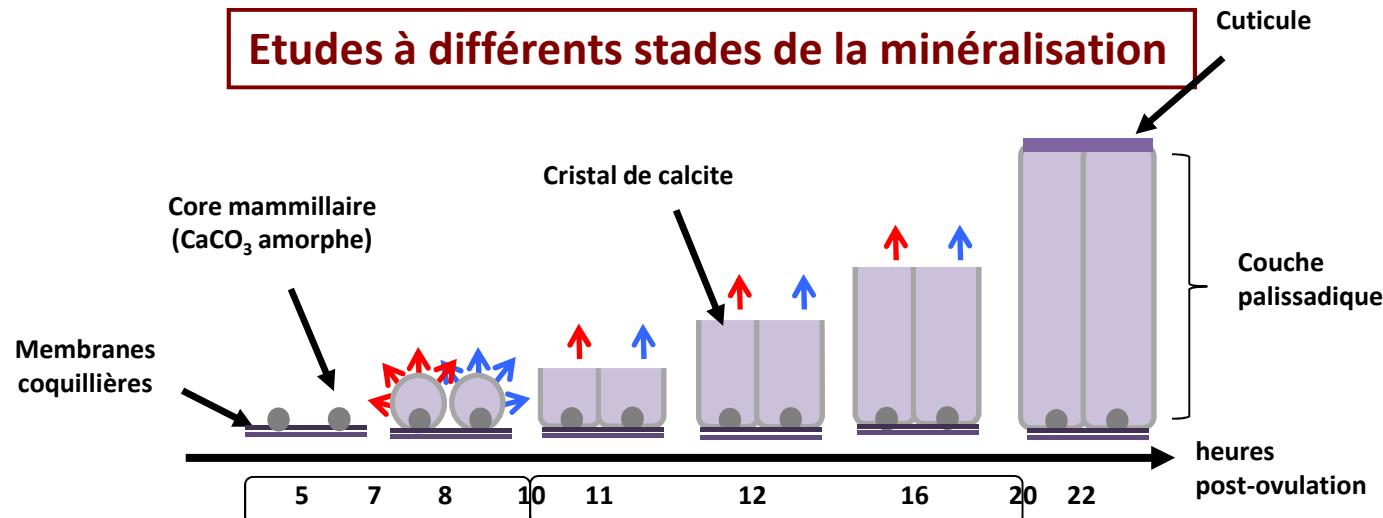
Rôle déterminant des protéines de la matrice

Approches globales et non hiérarchisées  
✓ Plus de 900 protéines  
✓ Plus de 600 transcrits spécifiques

Lesquelles ?      Quand ?  
Où ?      Pourquoi faire ?  
Comment faire ?

# Eggshell biomineralization

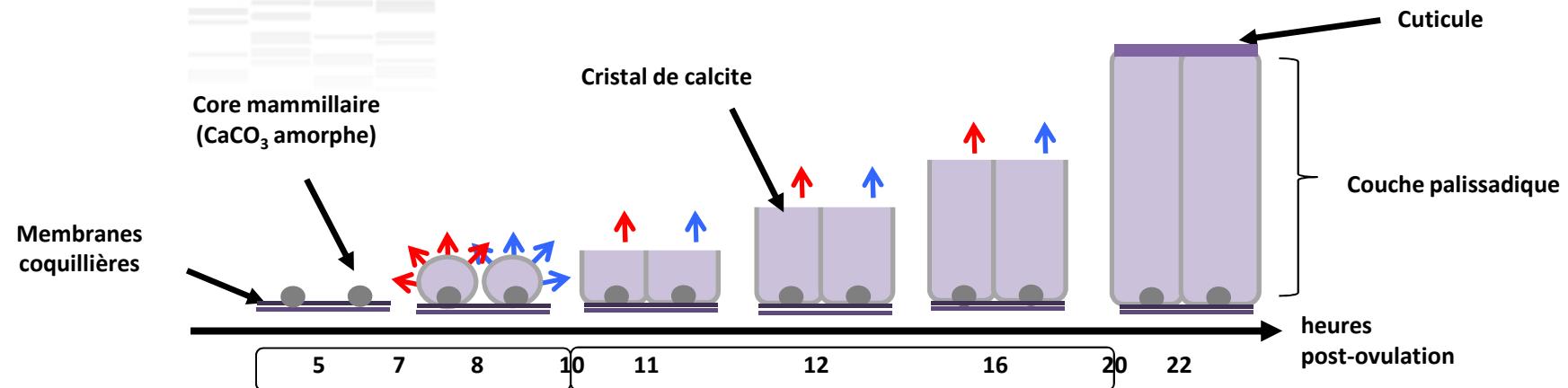
Hiérarchiser les acteurs moléculaires prépondérants lors du processus de minéralisation



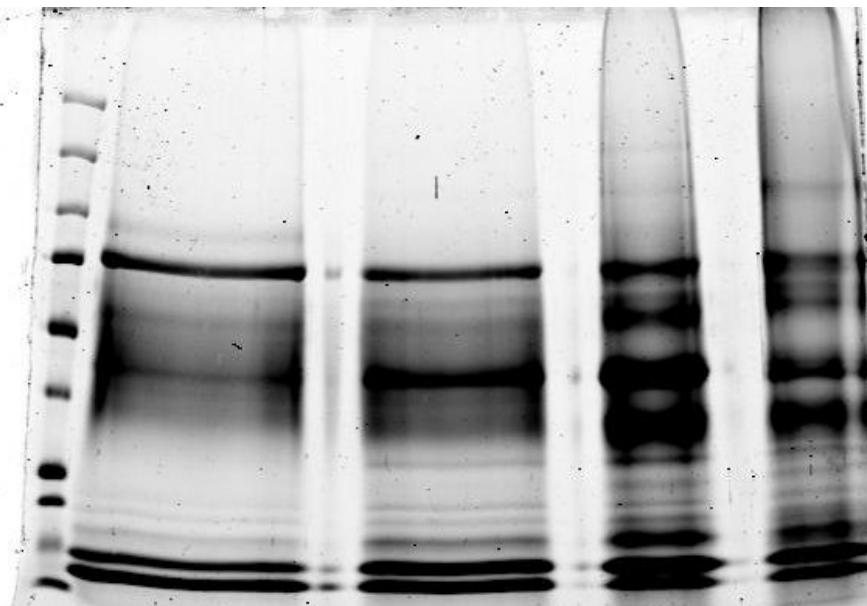
High-throughput quantitative proteomics, Uterine RNA-seq, statistical and bioinformatic functional analyses of matrix proteins

To sort major protein candidates involved in particular key points of the eggshell mineralization

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



↓  
Recueil du tissu utérin (ARNm), et des coquilles (protéines de la matrice)



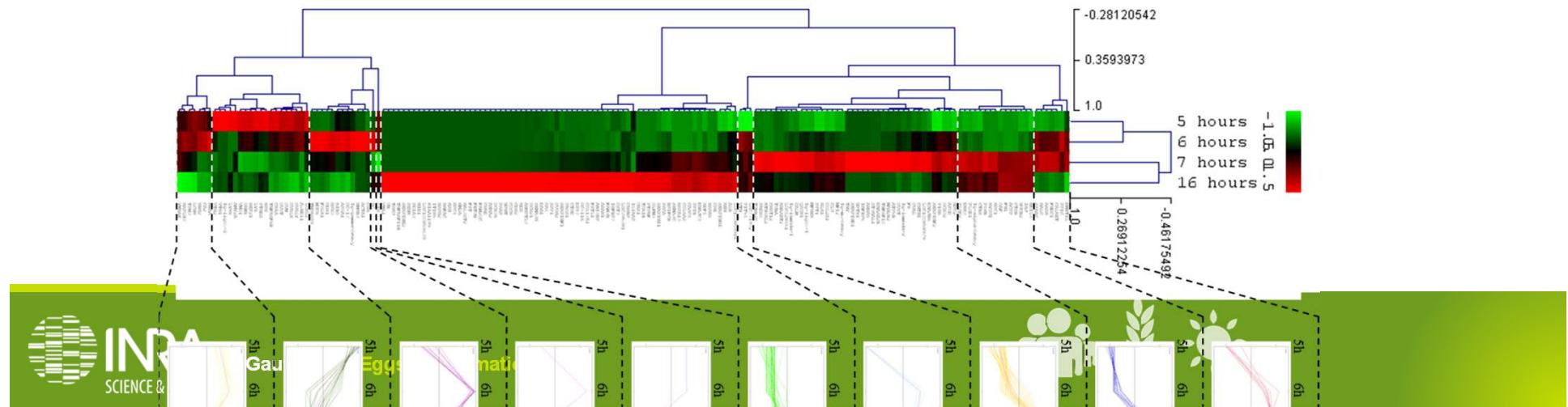
Analyse protéomique  
sur LTQ-VelosOrbitrap  
des bandes

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

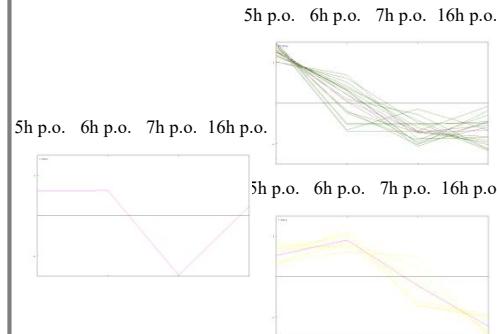
- 316 protéines quantifiées
- Détermination de l'abondance relative dans chacun des 5 stades
- Analyses statistiques
  - ANOVA  
Protéines ont des variations d'abondance significatives selon les stades
  - Cluster hiérarchique profils d'abondance protéique



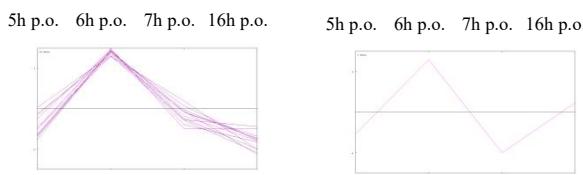
# Etude spatio-temporelle des protéines impliquées dans la biominéralisation de la coquille des oiseaux

## ■ Classement des protéines selon leur profil d'abondance

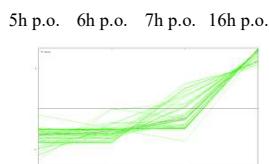
27 proteins overabundant during primary events of shell mineralization



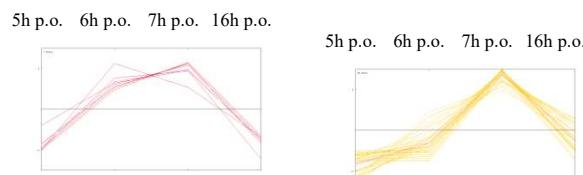
13 proteins overabundant during ACC transformation into calcite aggregates



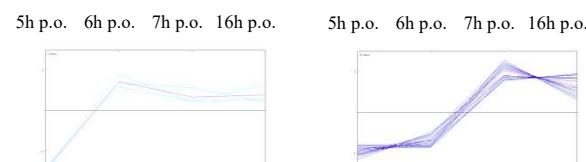
70 proteins overabundant during rapid growth phase



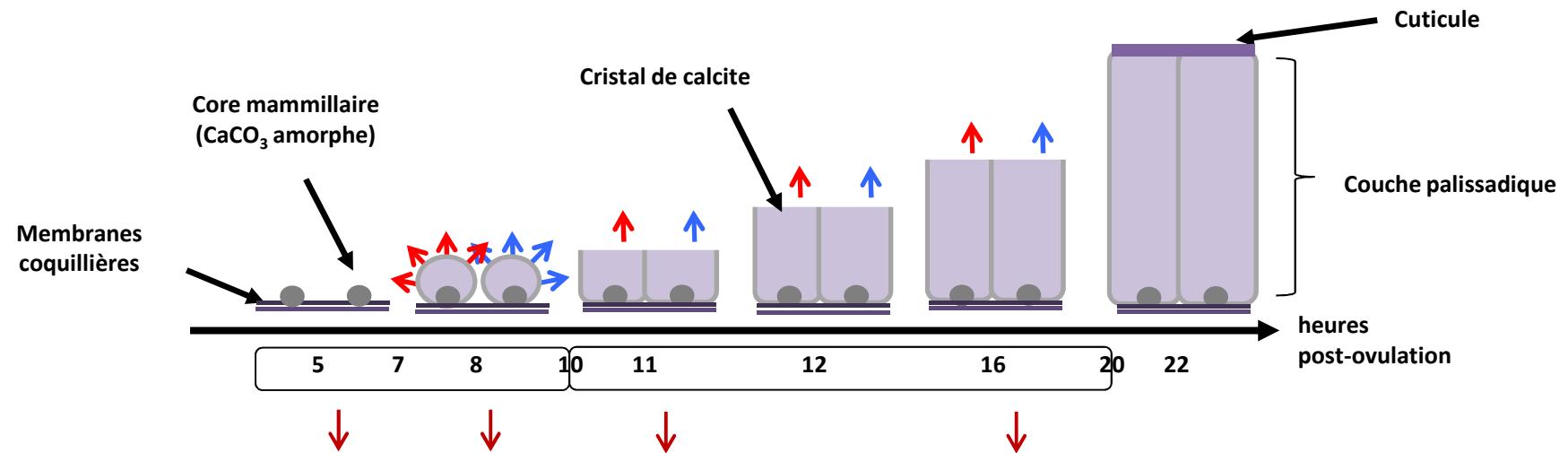
47 proteins overabundant when large calcite crystal units are formed



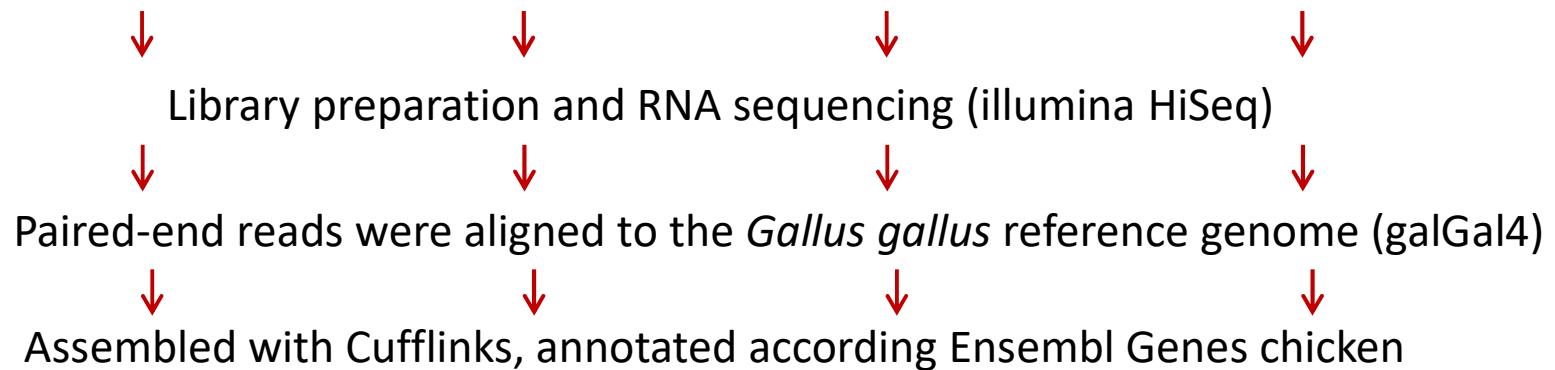
18 proteins overabundant at stages associated with the presence of calcite



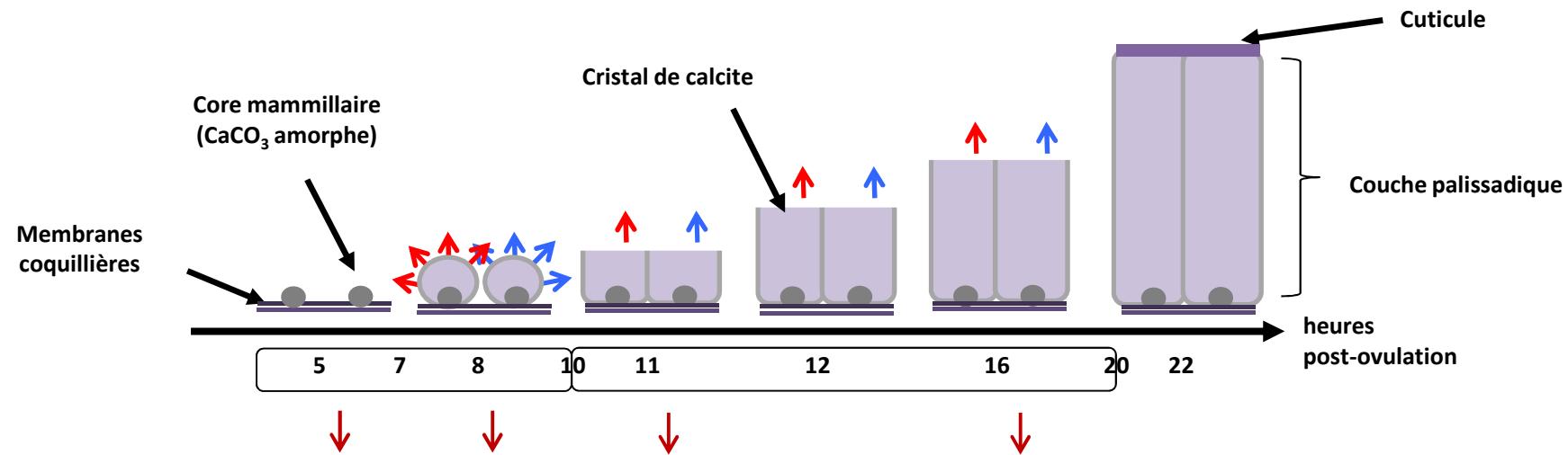
# Etude spatio-temporelle des protéines impliquées dans la biominéralisation de la coquille des oiseaux



Uterine tissues were harvested from 8 birds per stage and RNA were extracted



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



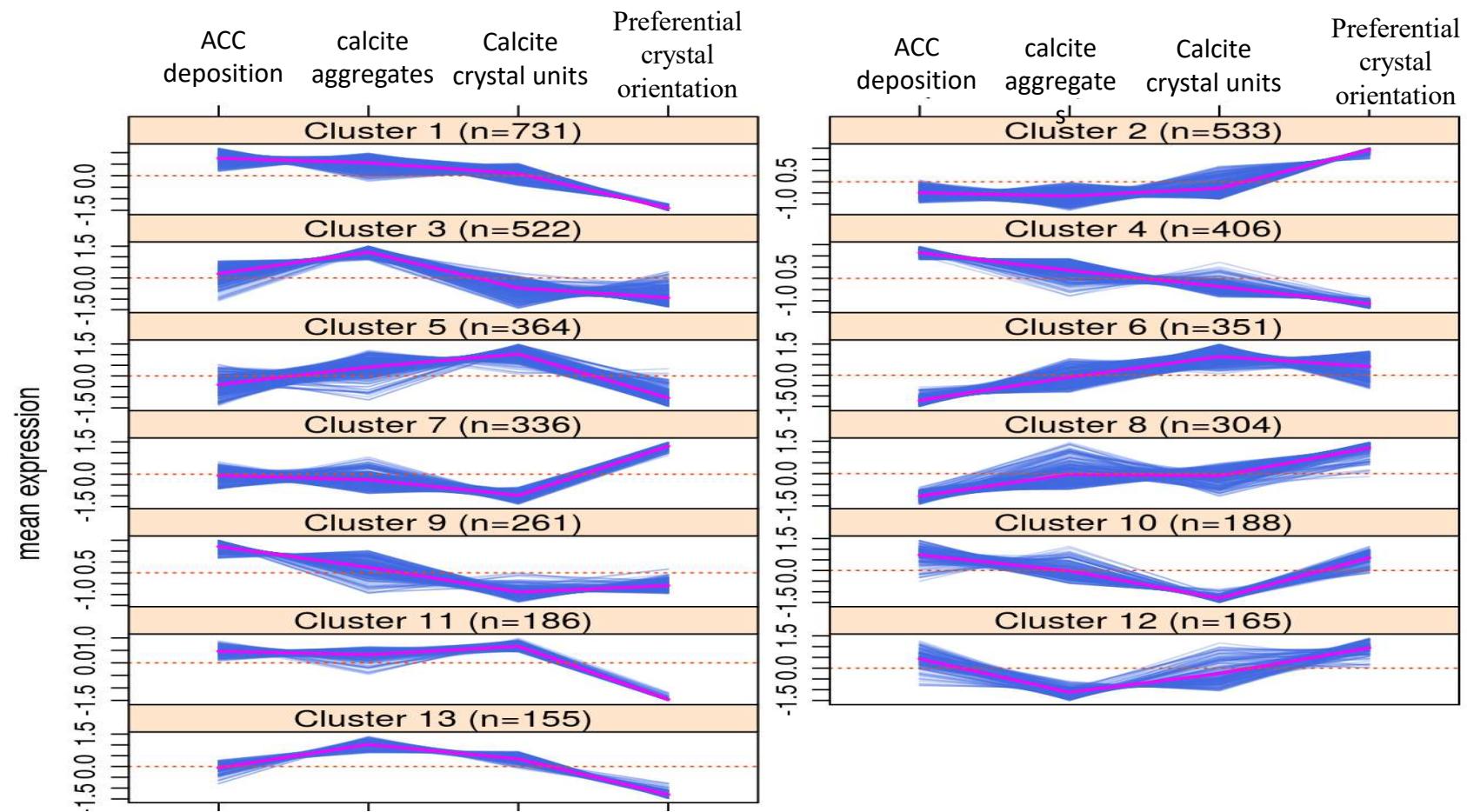
Use of DESeq2 (R package),  
normalization, adjustment of p-values using the Benjamini-Hochberg method (5%)

↓                    ↓                    ↓                    ↓  
Transcripts with an absolute Fold Change (Fc) upper than 1.5 in one stage

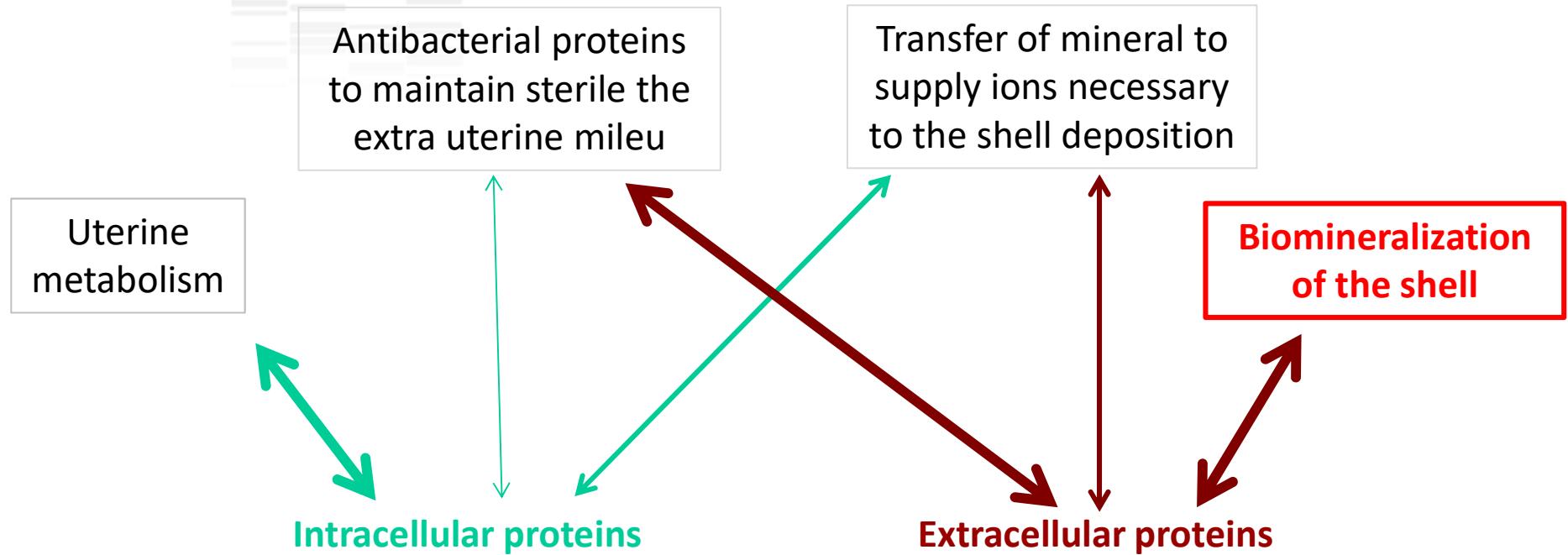
↓                    ↓                    ↓                    ↓  
**4502 differentially expressed transcripts representing 3766 different genes**

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

Profiling of the 4502 transcripts DE highlight 13 different clusters

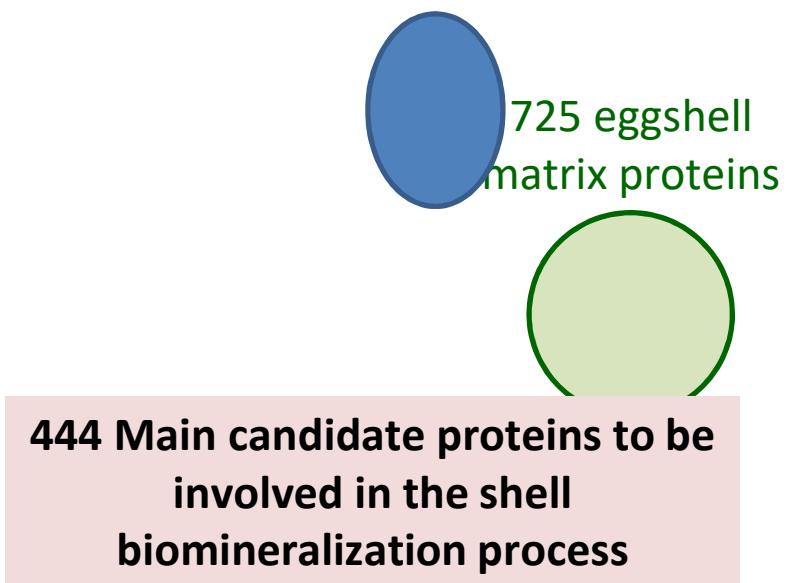
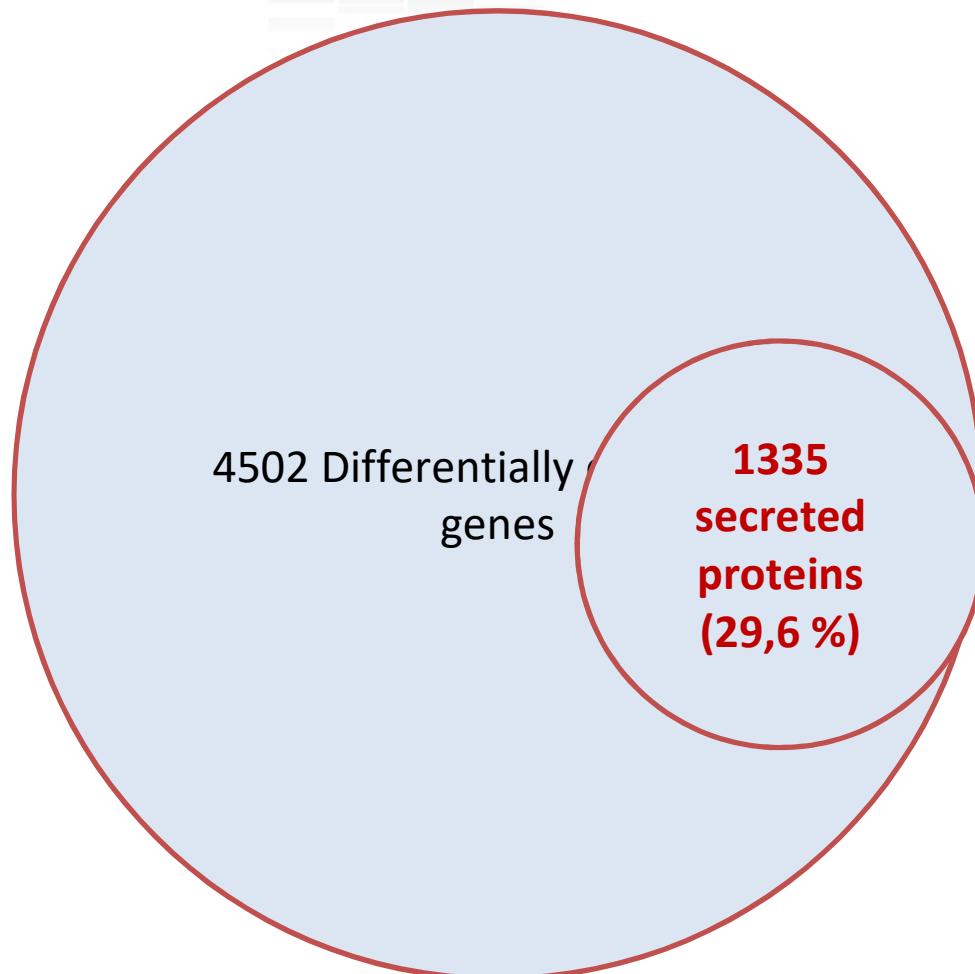


# Rôle of uterine differentially expressed genes

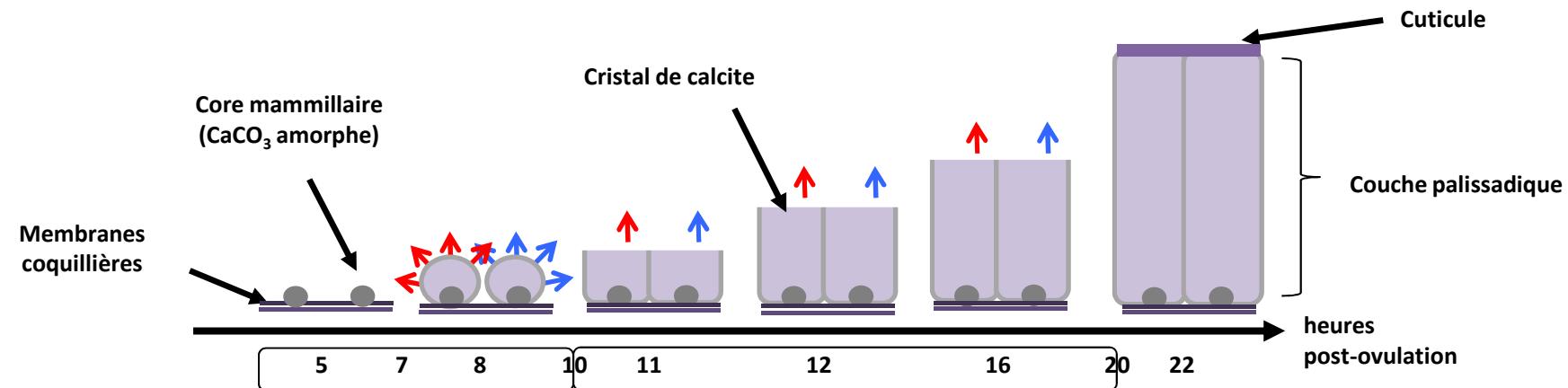


→ Predictive analysis of DE genes coding for secreted proteins

# Uterine genes and eggshell matrix proteins



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



**Proteomics and transcriptomics:  
Distribution and variation of abundance of 444 matrix proteins**

**Predicted functional activities of the identified matrix proteins ?**

(Marie et al., 2014, 2015a,b)



Literature, data mining and bioinformatics tools

Classification in 3 different groups according to their potential functions

Associated to mineralization process

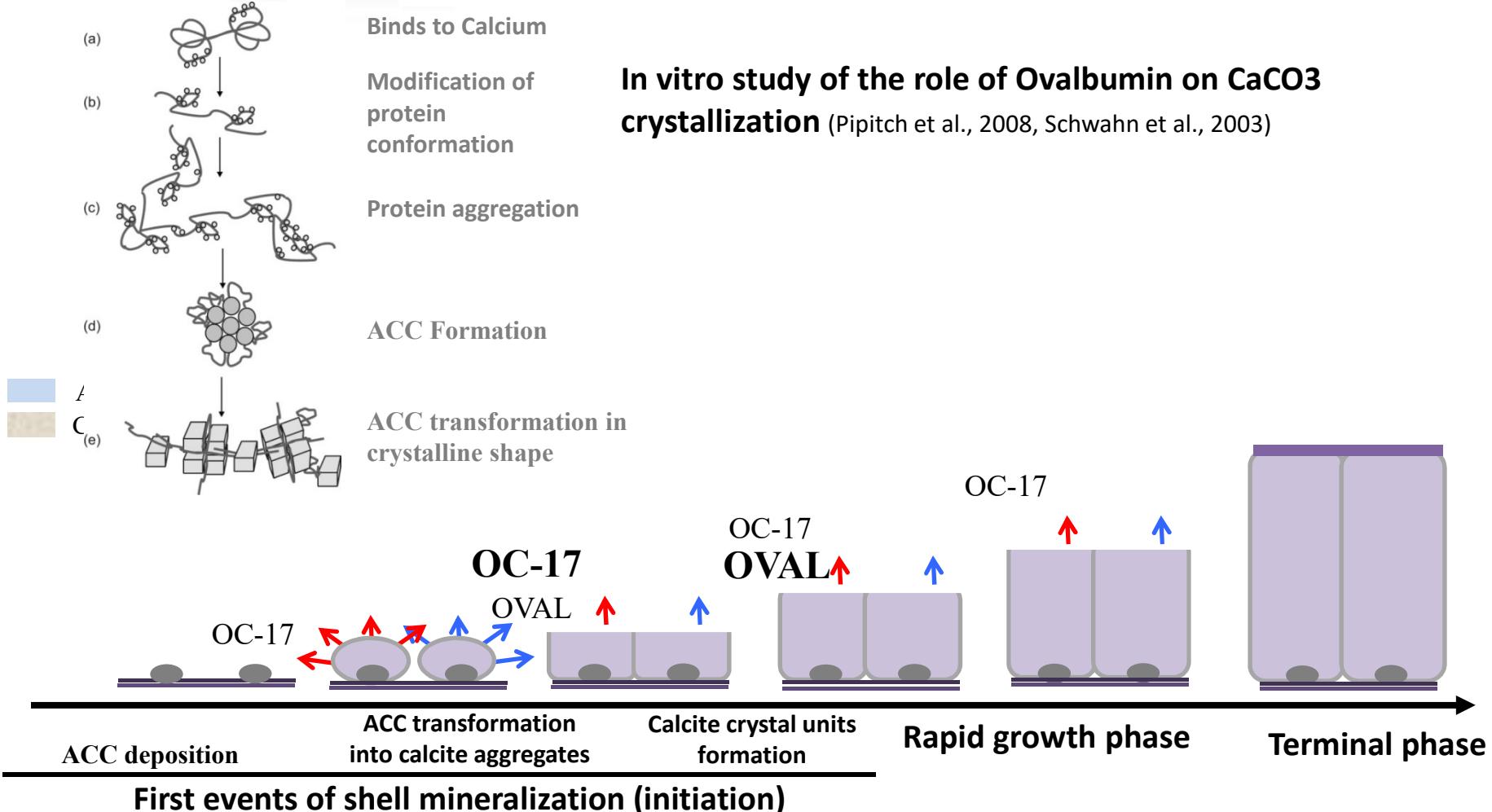
Involved in the regulation of activity of proteins

Antimicrobial and other proteins

# Function of matrix proteins at pivotal events

## □ Proteins having a direct involvement in eggshell mineralization

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



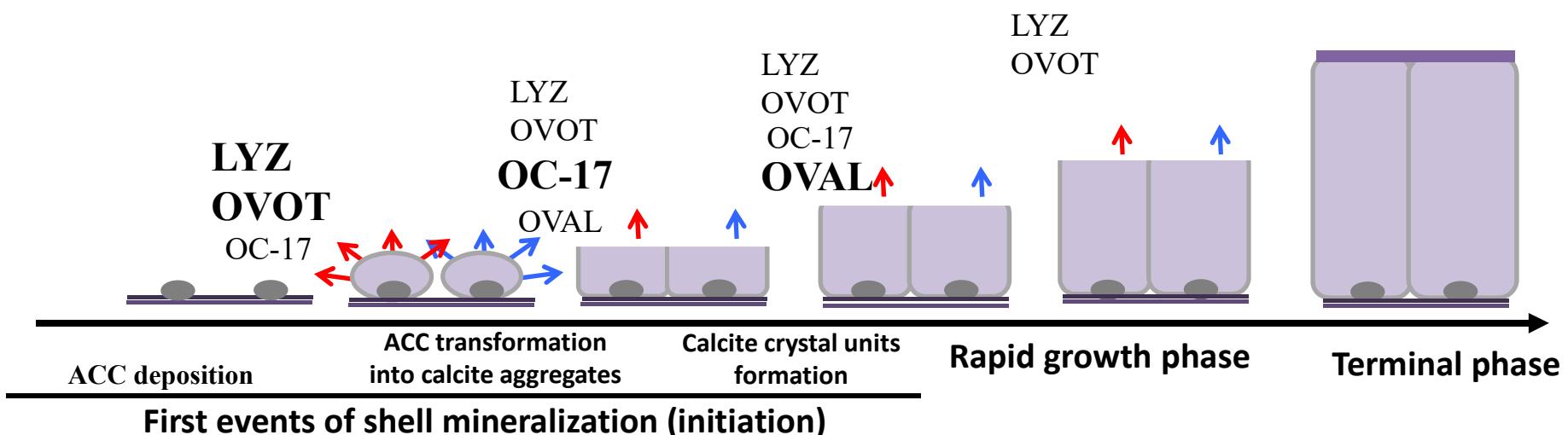
# Function of matrix proteins at pivotal events

## ☐ Proteins having a direct involvement in eggshell mineralization

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



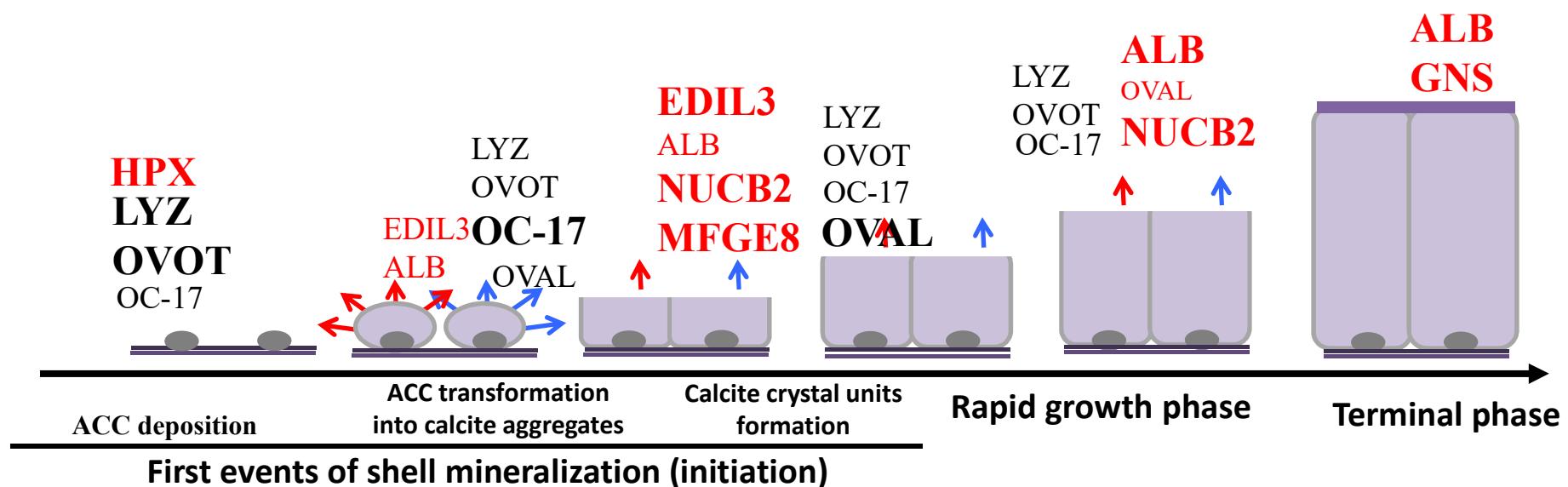
**Figure 1.** Ovocleidin-17 bound to an amorphous (a) and a crystallized (b) calcium carbonate nanoparticle containing 192 formula units. The



# Function of matrix proteins at pivotal events

## □ Proteins having a direct involvement in eggshell mineralization

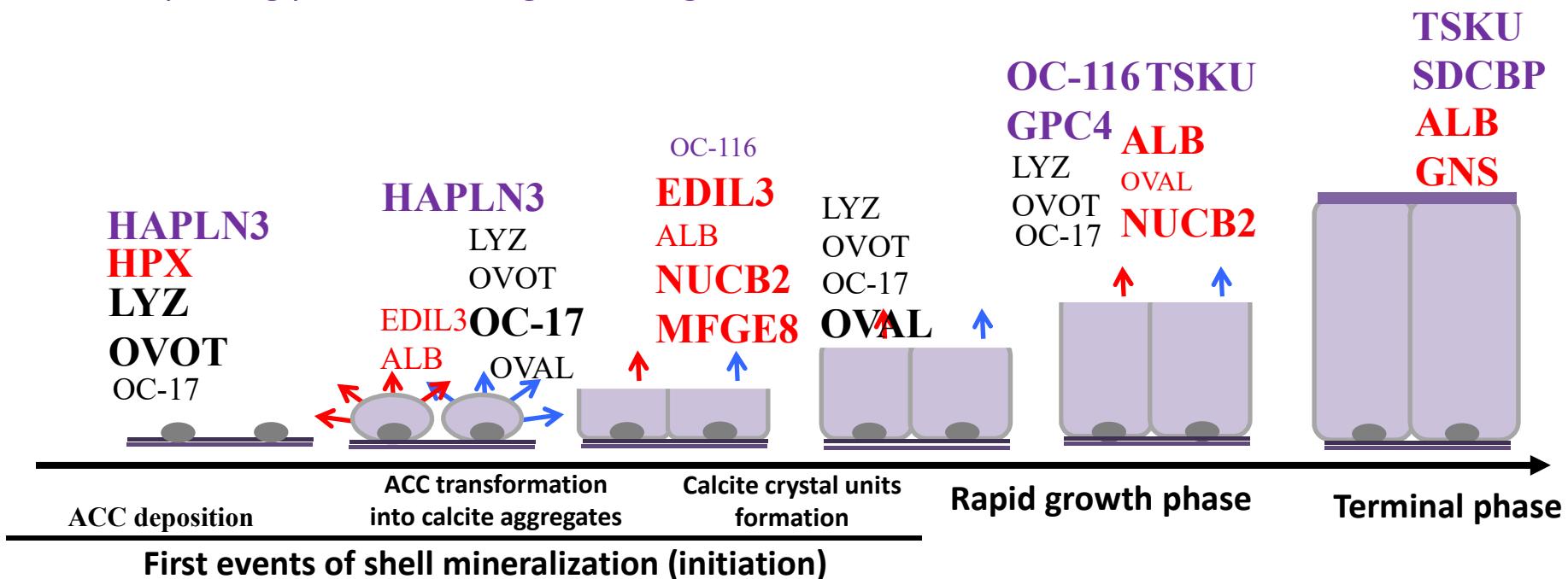
- ✓ Proteins with established role in the **biomineralisation**
- ✓ **Calcium binding proteins (CaBPs)** interacting with calcium, favoring crystal nucleation and driving the morphology of crystals
  - *Proteins with EF-hand and EGF-like calcium binding domains*



# Function of matrix proteins at pivotal events

## □ Proteins having a direct involvement in eggshell mineralization

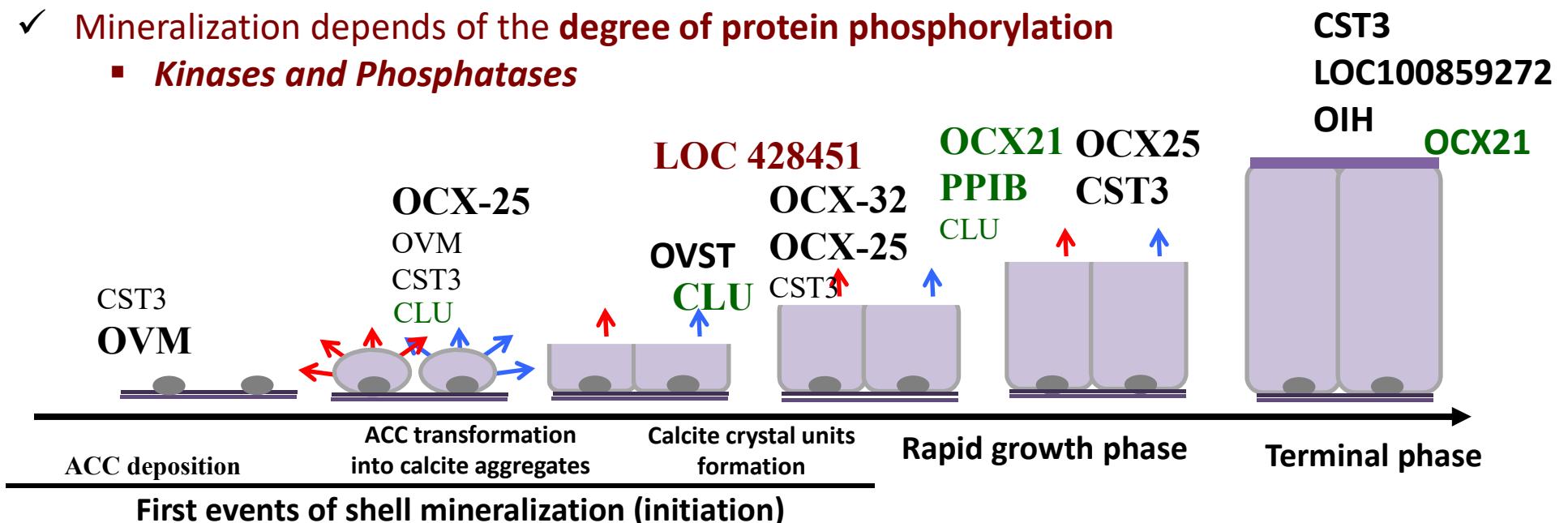
- ✓ Proteins with established role in the **biomineralisation**
- ✓ **Calcium binding proteins (CaBPs)** interacting with calcium, favoring crystal nucleation and driving the morphology of crystals
  - *Proteins with EF-hand and EGF-like calcium binding domains*
- ✓ **Proteoglycans and proteoglycan binding proteins**
  - proteoglycans have a negative charge to attract Ca<sup>2+</sup> ions



# Function of matrix 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)**.
  - *Direct interaction with other proteins.*
    - *Molecular chaperone interact with proteins driving mineralization*
    - *Proteases and protease inhibitors (specific and controlled role during calcification process, either by degrading proteins or regulating processing of proteins into their mature forms)*
- ✓ Mineralization depends of the **degree of protein phosphorylation**
  - *Kinases and Phosphatases*



# Apport des techniques à haut débit pour l'identification des gènes et des protéines impliqués dans la formation de la coquille

✓ RNA seq and Quantitative proteomics to classify and determine a hierarchy of proteins driving the mineralization → 444 candidates identified and a more restricted list of 22 pivotal candidate proteins with functions associated to mineralization

Use as biological markers for genomic selection to reinforce eggshell breaking strength

✓ Associate transcripts with published and private SNPs, QTLs related to shell quality

*(Collaboration with breeders and avian genetic teams)*

# Plan

- I. Introduction
- II. Approches à haut débit pour identifier les protéines déposées dans l'œuf d'oiseaux
  - 1. Généralité – stratégie expérimentale
  - 2. Utilisation combinée des banques et outils
  - 3. Transcriptome de l'œuf
  - 4. Protéome de l'œuf
- III. Mieux comprendre les défenses de l'œuf grâce aux approches à haut débit  
Défense physique (coquille)
  - a) Protéines de la matrice organique et biominéralisation
  - b) Caractérisation fonctionnelle des protéines de la matrice
  - c) Avancées récentes en génomique pour améliorer la solidité de la coquille
- IV. Conclusion



# Utilisation des avancées récentes en génétique et génomique pour améliorer la solidité de la coquille



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



Ian Dunn, Maureen Bain

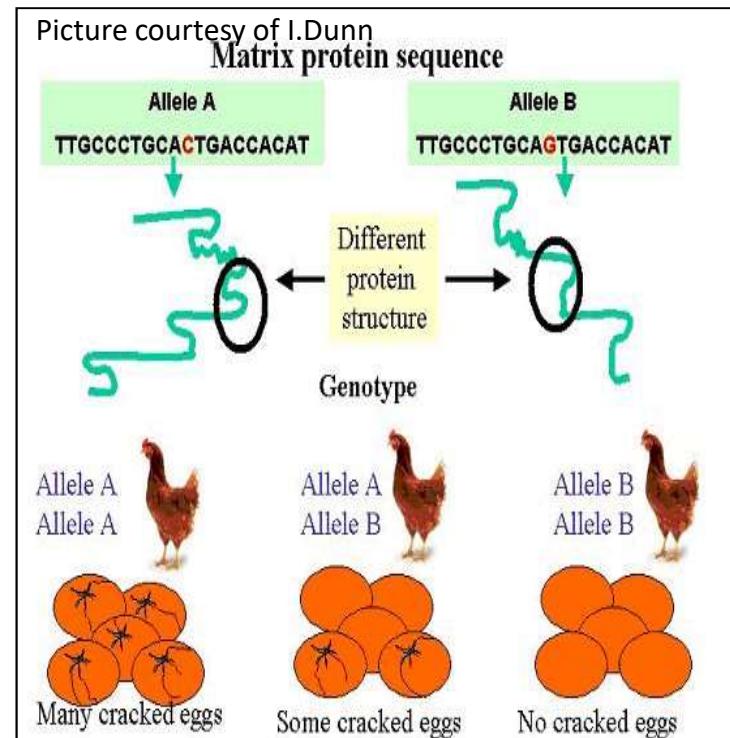
Roslin Institute, University of Glasgow

## Hypothèse

*“Une variation de l’expression des gènes codant pour les protéines de la matrice organique de la coquille provoque des différences mesurables de la qualité de la coquille”*

## Sélection génomique assistée par marqueurs (MAS)

- Sélection utilisant des marqueurs ADN spécifiques d'un caractère phénotypique difficile à utiliser de manière pratique en sélection
- Les gènes codant pour les protéines de la matrice organique de la coquille peuvent être considérés comme gènes candidats pour la MAS



# Utilisation des avancées récentes en génétique et génotypage pour améliorer la solidité de la coquille

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



Ian Dunn, Maureen Bain  
Roslin Institute, University of Glasgow



## Sélection assistée par marqueurs (MAS)

Approche gènes candidats

(Environ 16000 génotypages pour 8 gènes et 2066 descendants)

### Tests d'association

P value

*Ovocleidin-116*

Module élastique

P= 0.0004

*Ovocalyxin 32*

Déformation à la fracture

P= 0.006

*Ovocalyxin 32*

Résistance à la rupture

P= 0.001

Les études d'associations suggèrent que les gènes candidats peuvent expliquer les variations des propriétés structurales de la coquille de l'oeuf de poule.

# Plan

- I. Introduction
- II. Approches à haut débit pour identifier les protéines déposées dans l'œuf d'oiseaux
  - 1. Généralité – stratégie expérimentale
  - 2. Utilisation combinée des banques et outils
  - 3. Transcriptome de l'œuf
  - 4. Protéome de l'œuf
- III. Mieux comprendre les défenses de l'œuf grâce aux approches à haut débit
  - 1. Défense physique (coquille)
    - a) Protéines de la matrice organique et biominéralisation
    - b) Caractérisation fonctionnelle des protéines de la matrice
    - c) Avancées récentes en génomique pour améliorer la solidité de la coquille
  - 2. Défense antimicrobienne
    - a) Analyse bioinformatique des protéines antimicrobiennes
    - b) Classement fonctionnel des protéines antimicrobiennes
- IV. Conclusion



# CONCLUSIONS

Les stratégies utilisant la génomique et la génomique fonctionnelle simultanément avec la protéomique offrent un potentiel important

- Caractérisation des acteurs moléculaires
- Criblage de nombreuses fonctions biologiques potentielles

Intérêts dans la science de l'œuf

- protéines impliquées dans la biominéralisation de l'œuf
- Protéines de défenses moléculaires
- Autres activités biologiques

