



**HAL**  
open science

# 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>**

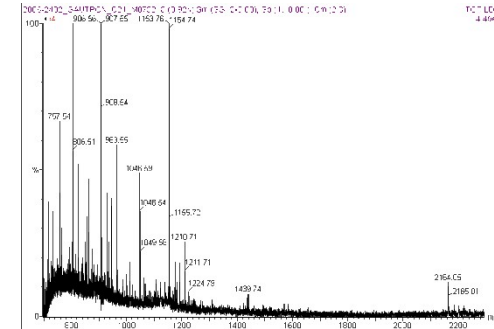
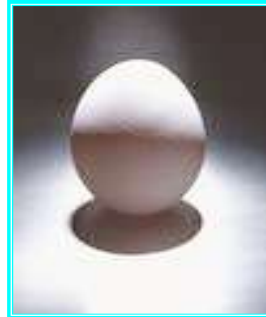
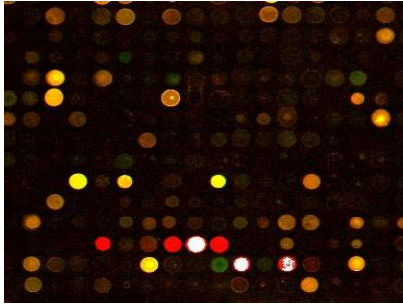
Submitted on 26 Sep 2023

**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.

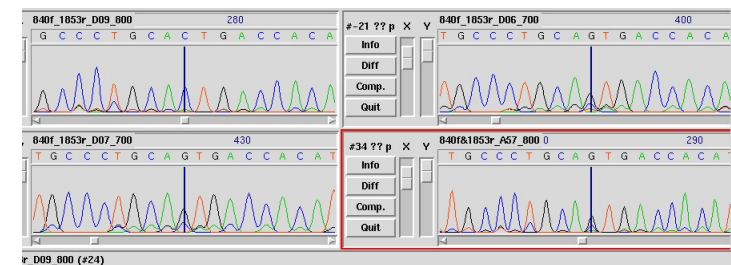
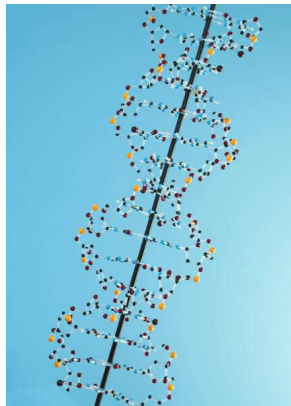


Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



# 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*



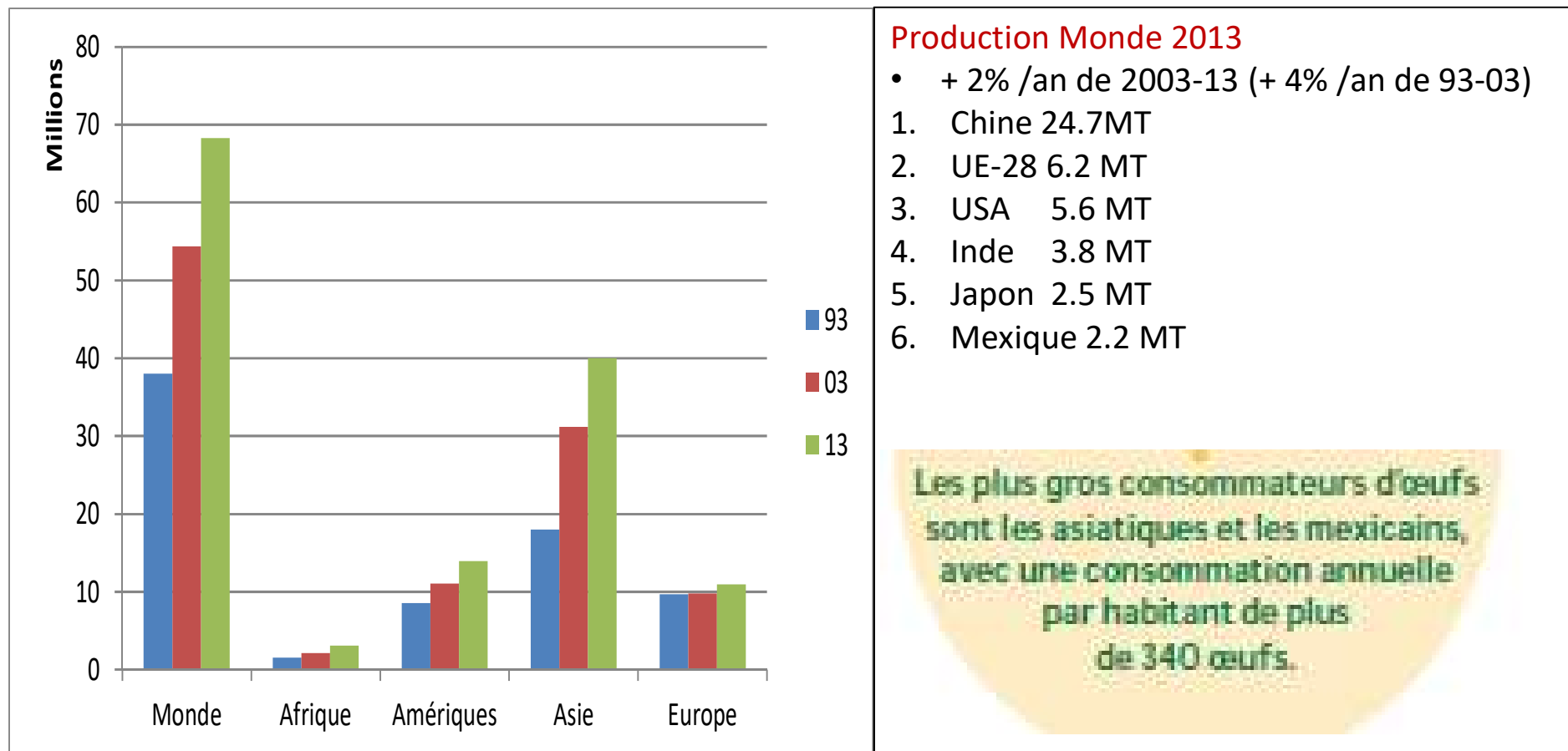
# Plan

- 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



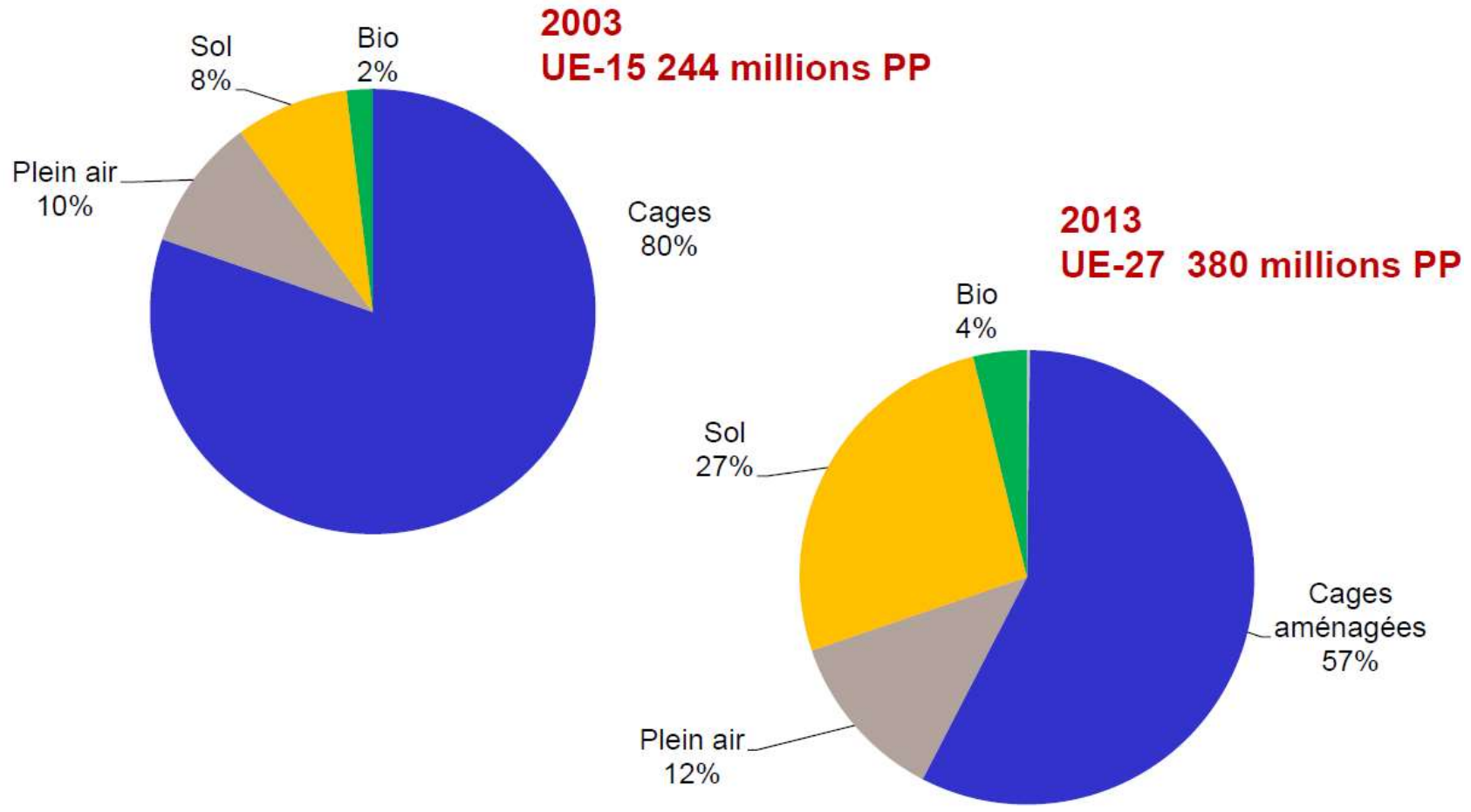
# 68.2 MT d'œufs produites dans le Monde en 2013

## > 1200 Milliards d'œufs chaque année



Itavi d'après FAO, Commission et FranceAgriMer

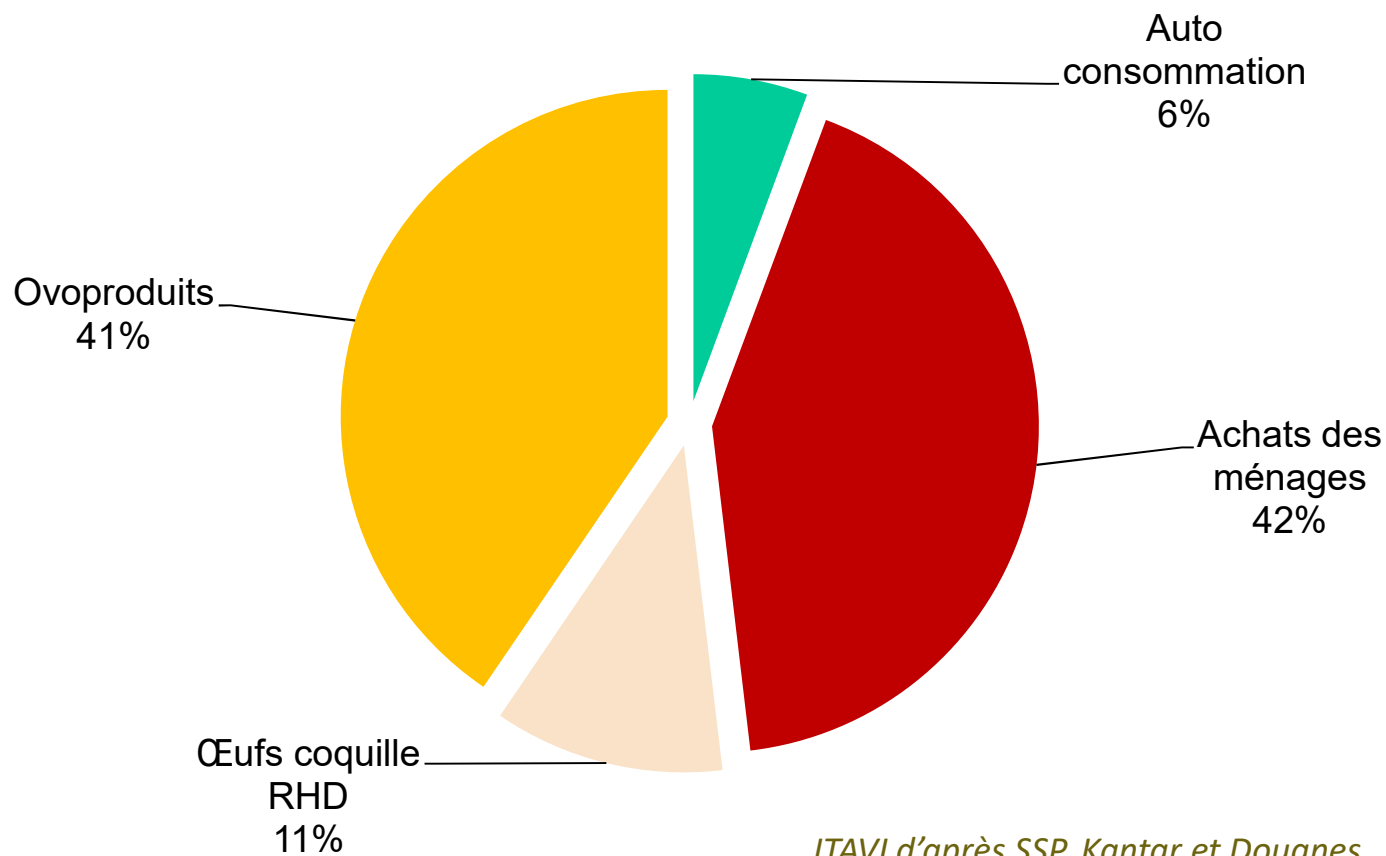
# Evolution des systèmes de production dans l'UE



 Source Commission européenne



# Répartition de la consommation globale française en 2013



*ITAVI d'après SSP, Kantar et Douanes*



# 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**



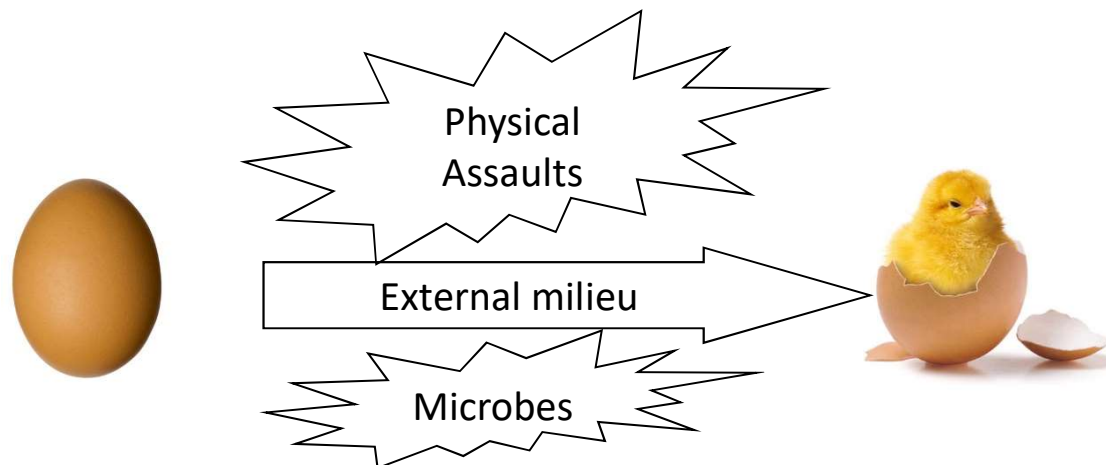
# L'œuf de poule

- ✓ 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'œufs**



# 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

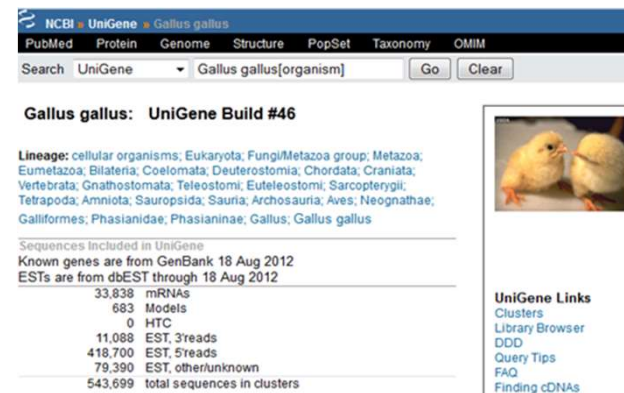
→ 2006, environ 50 protéines de l'œuf (10 dans la coquille)

## 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'œuf**

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



**dbEST: database of "Expressed Sequence Tags"**

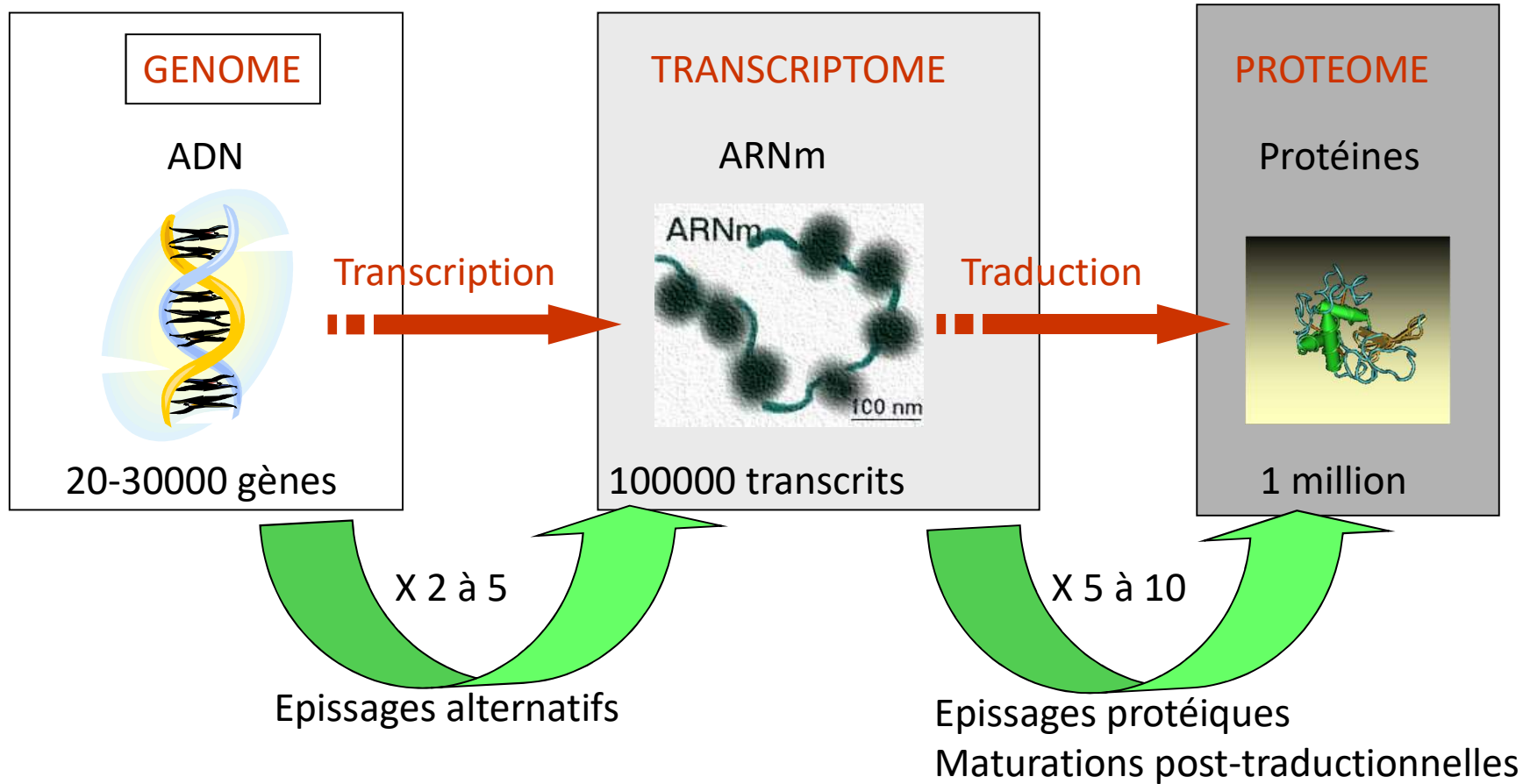
dbEST release 130101



# Les banques cDNA et EST

Le but

\* Identifier les gènes fonctionnels



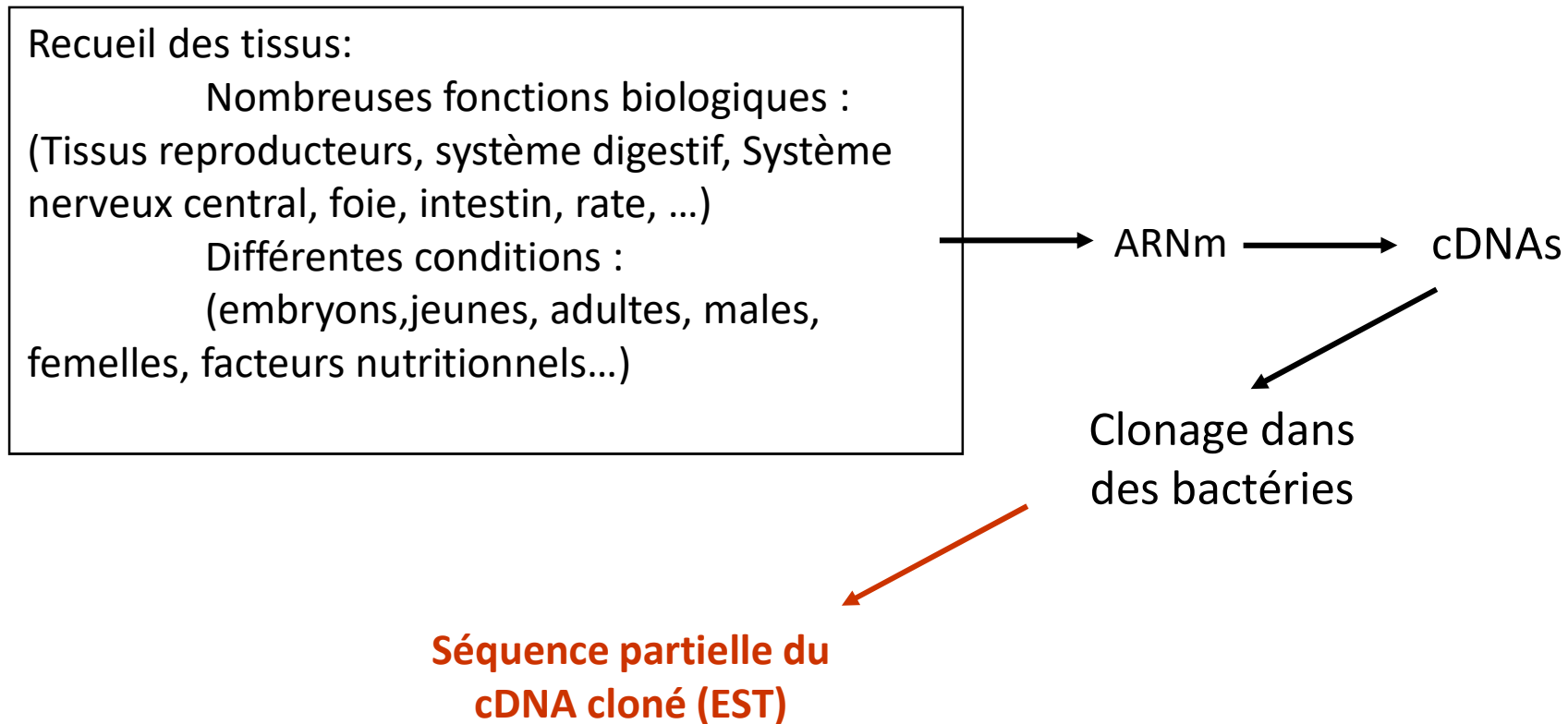
# Les banques EST

## Le but

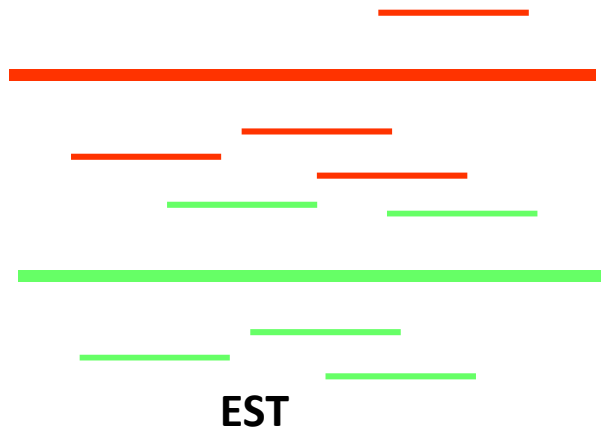
- \* Identifier les gènes fonctionnels

## Méthode

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



# 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"

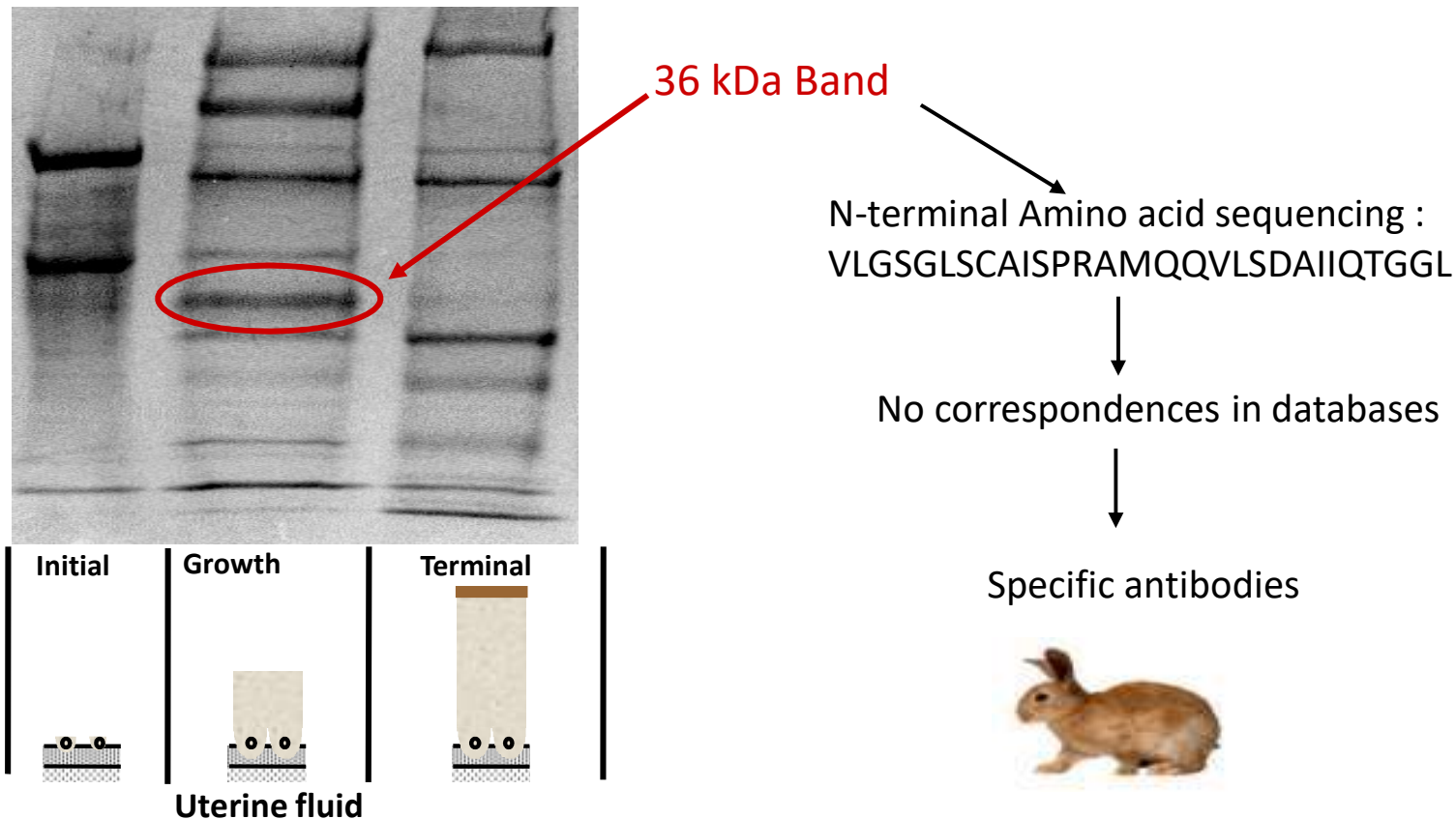
dbEST release 130101

**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))



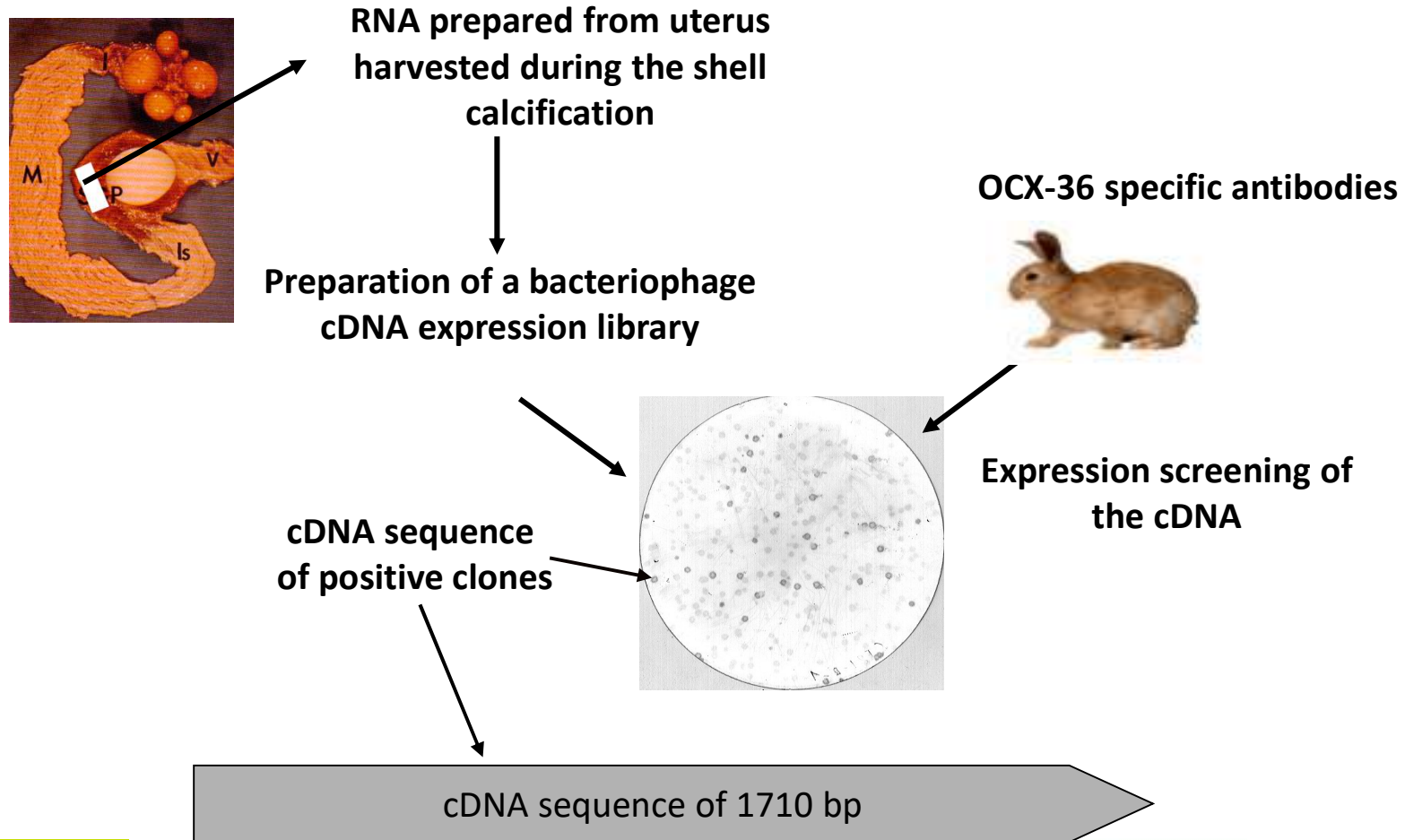
# Utilisation combinée des banques cDNA, EST, génomique et des outils de bioinformatique

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



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

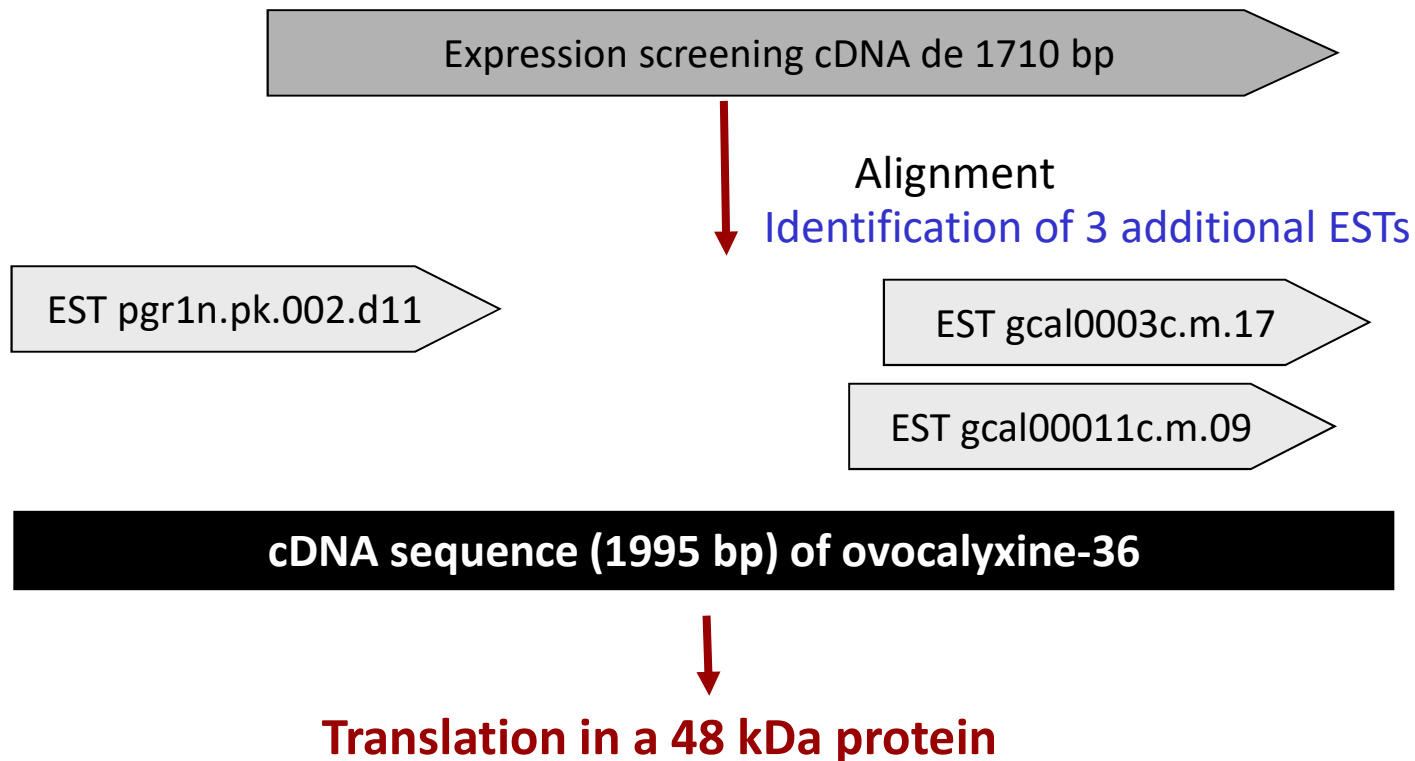
Ovocalyxin-36, une protéine de la matrice organique de la coquille





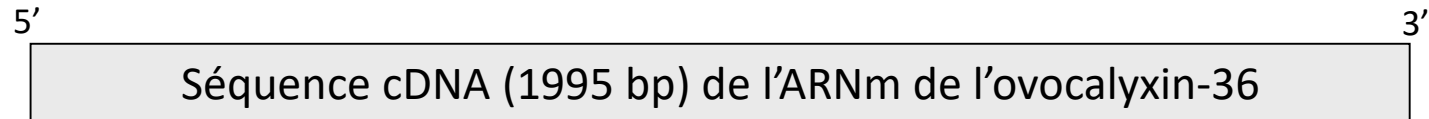
# Utilisation combinée des banques cDNA, EST, génomique et des outils de bioinformatique

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



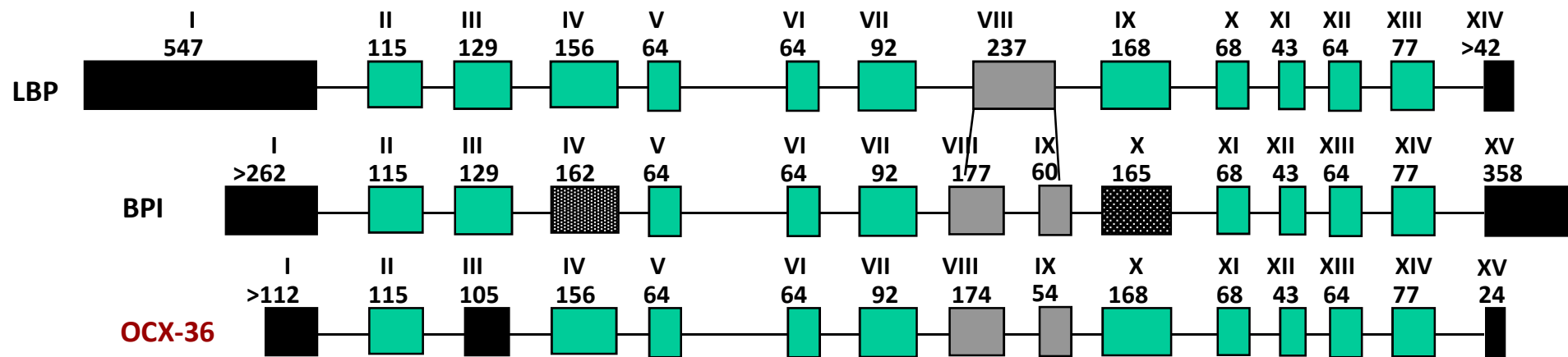
Identification de la séquence génomique de l'ovocalyxine-36  
Chromosome 20  
Position 9834141 et 9842177



# 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



Gènes apparentés

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

# Ovocalyxin-36

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

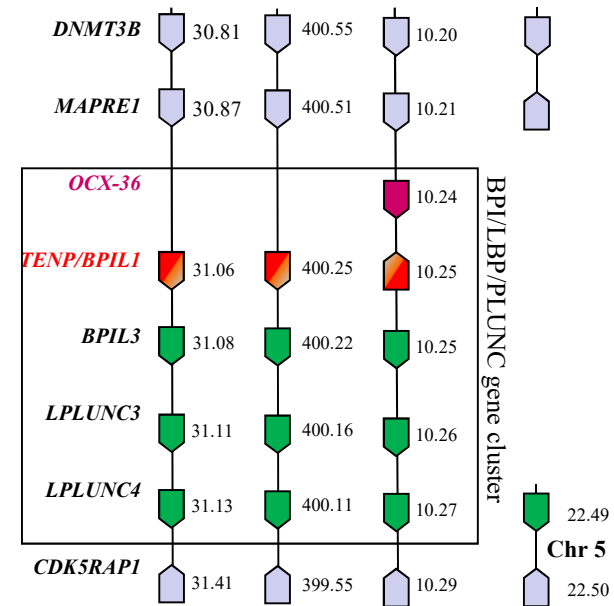
BIOLOGY OF REPRODUCTION 83, 893–900 (2010)  
Published online before print 11 August 2010.  
DOI 10.1095/biolreprod.110.085019

## Minireview

### What Makes an Egg Unique? Clues from Evolutionary Scenarios of Egg-Specific Genes<sup>1</sup>

Xin Tian,<sup>3,4,5,6</sup> Joel Gautron,<sup>7</sup> Philippe Monget,<sup>3,4,5,6</sup> and Géraldine Pascal<sup>2,3,4,5,6</sup>

UMR85,<sup>3</sup> Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA, Nouzilly, France  
UMR6175,<sup>4</sup> CNRS, Nouzilly, France  
Université François Rabelais de Tours,<sup>5</sup> Tours, France  
Haras Nationaux,<sup>6</sup> Nouzilly, France  
UR83 Recherches Avicoles,<sup>7</sup> INRA, Nouzilly, France



Developmental and Comparative Immunology xxx (2010) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Developmental and Comparative Immunology

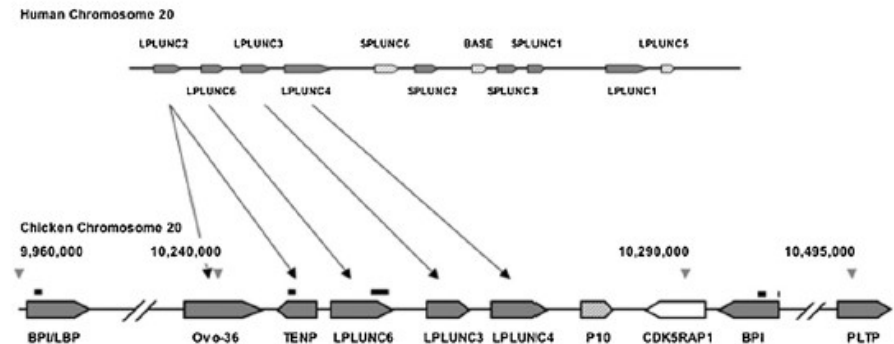
journal homepage: [www.elsevier.com/locate/dci](http://www.elsevier.com/locate/dci)



### Identification and characterisation of the BPI/LBP/PLUNC-like gene repertoire in chickens reveals the absence of a LBP gene<sup>☆</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,4</sup>

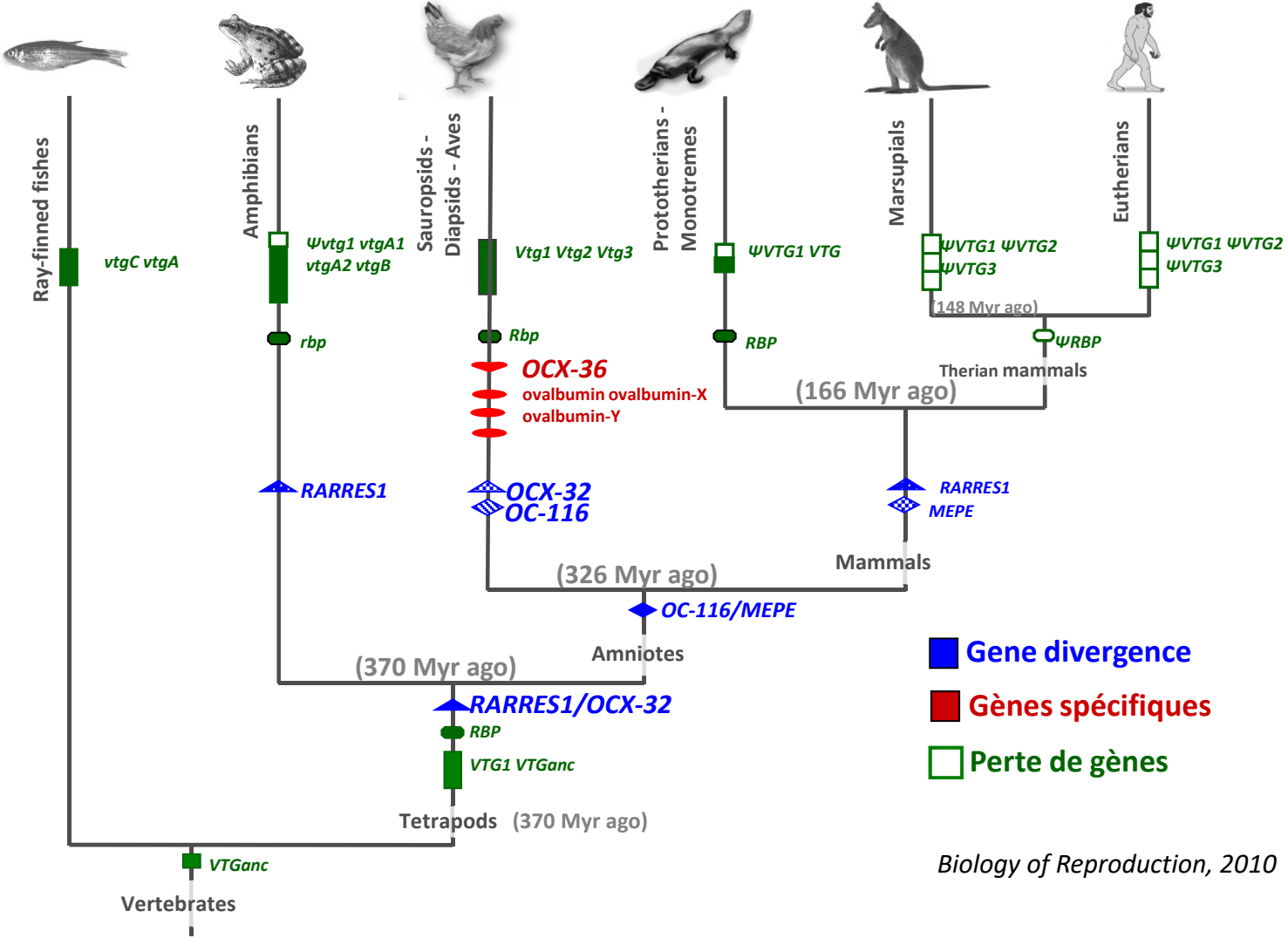
<sup>a</sup> Academic Unit of Respiratory Medicine, Department of Infection and Immunity, University of Sheffield, Sheffield S10 2JF, UK  
<sup>b</sup> Department of Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, P.O. Box 80.165, 3508 TD Utrecht, The Netherlands  
<sup>c</sup> Krebs Institute for Biomolecular Research, Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, Sheffield S10 2TN, UK



Gautron J. / Eggshell formation



# Evolution des gènes



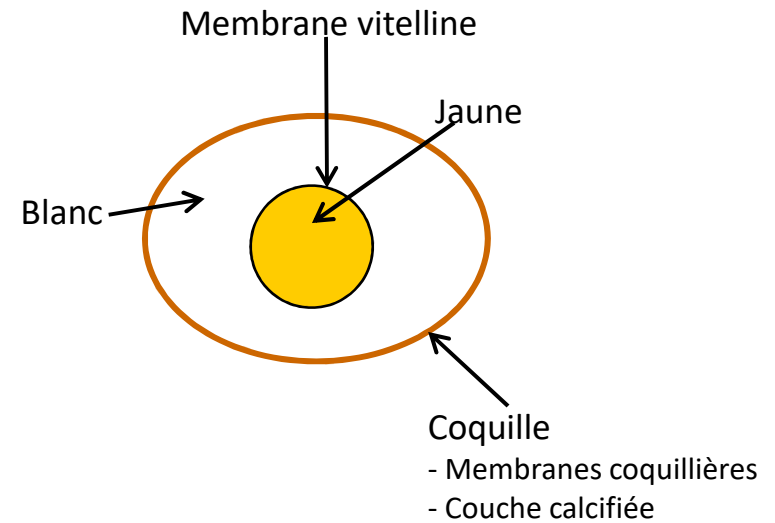
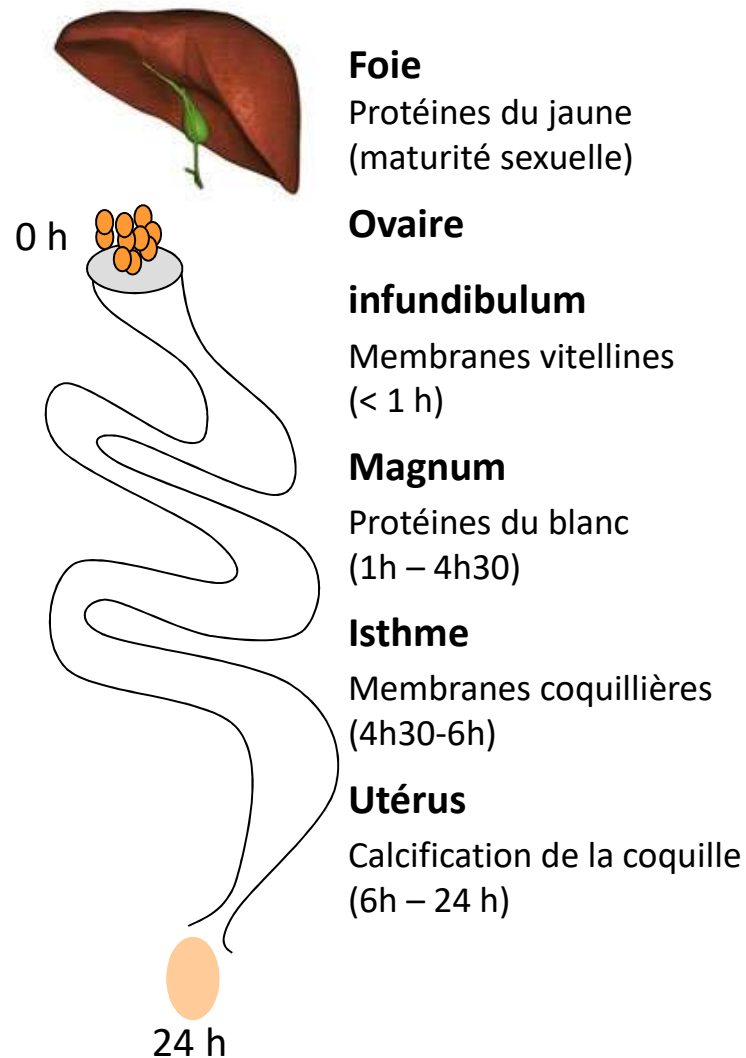
Biology of Reproduction, 2010

# Plan

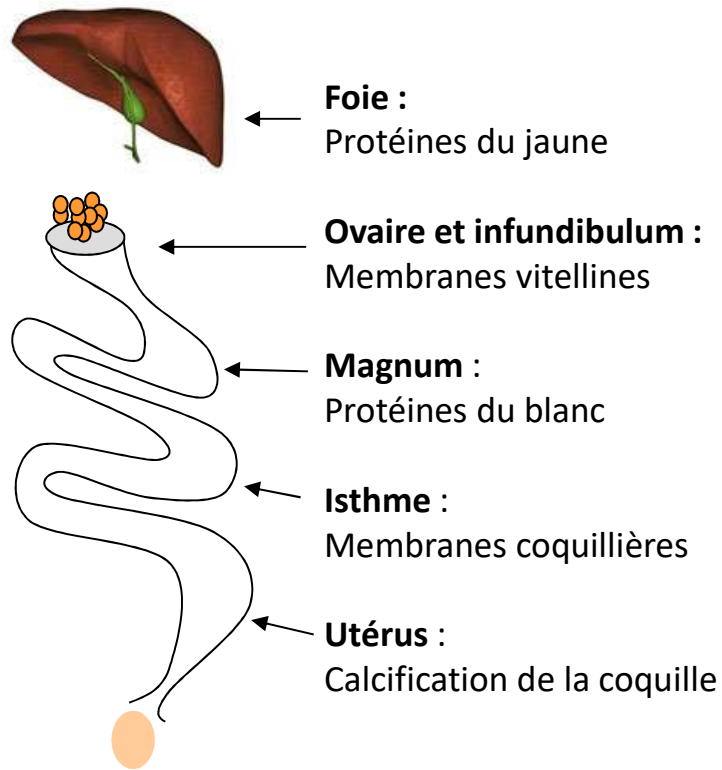
- I. Introduction
- II. Approches à haut débit pour identifier les protéines déposées dans l'œuf d'oiseaux
  1. Généralité – stratégie expérimentale
  2. Utilisation combinée des banques et outils
  3. Transcriptome de l'œuf
  4. Protéome de l'œuf
- III. Mieux comprendre les défenses de l'œuf grâce aux 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



# 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

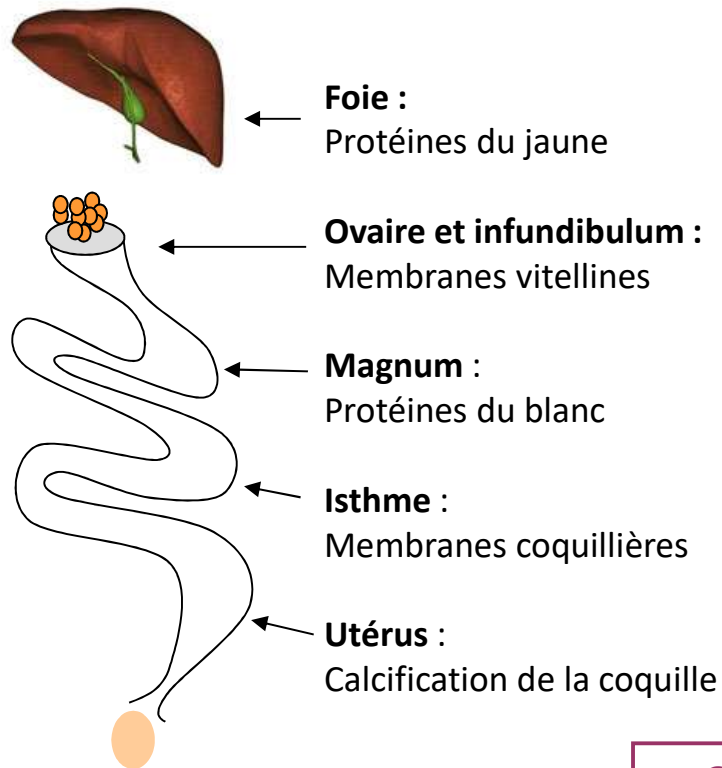


Différents stades physiologiques





# La transcriptomique



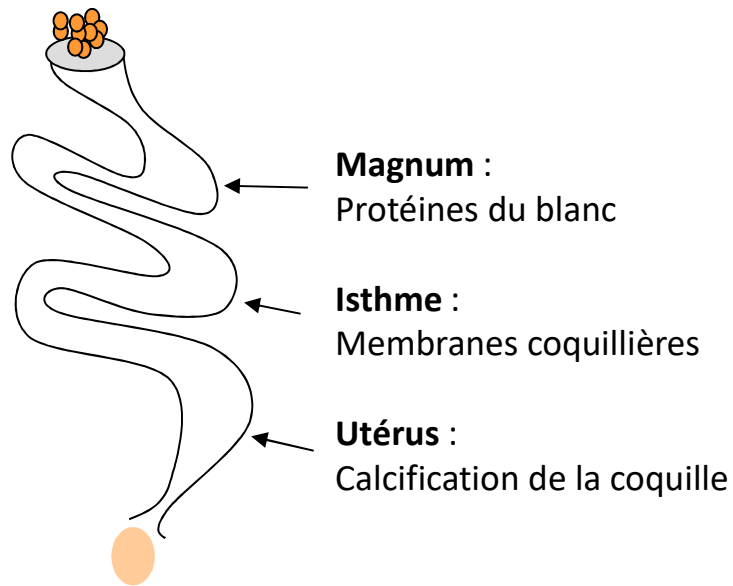
Utilisation de puces à ADN ou RNA-Seq

↓  
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 coquillières 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



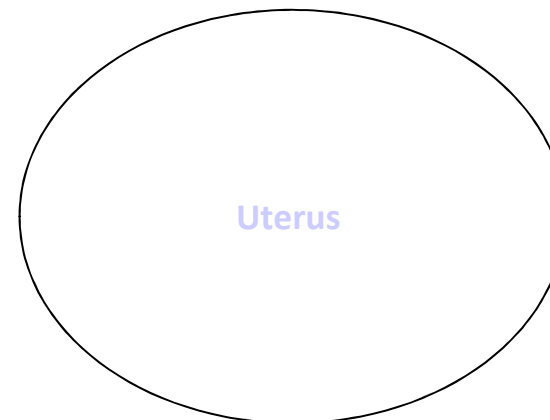
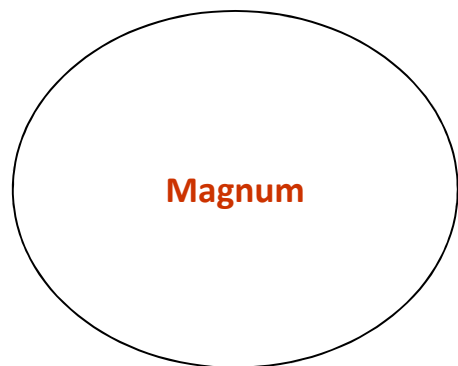
Utilisation de puces à ADN



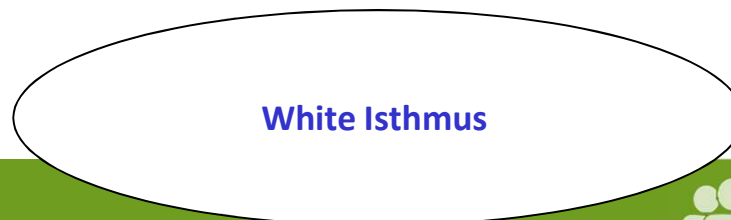
Comparaison de l'expression des gènes  
entre les différents tissus

# 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)

Magnum

Uterus

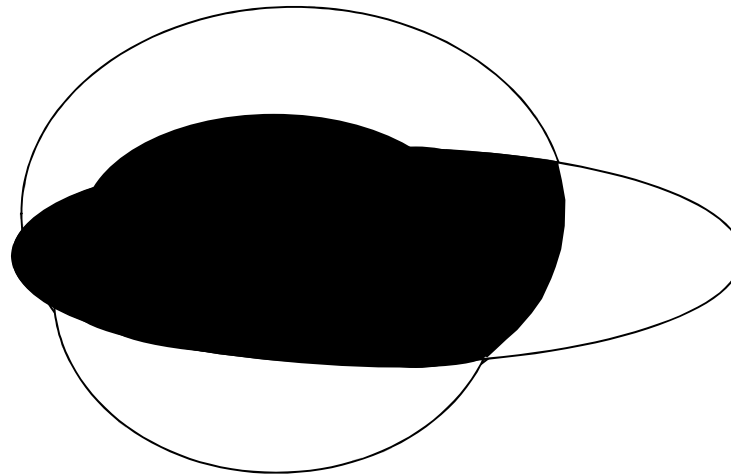
White Isthmus



# 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>

**RESEARCH ARTICLE** Open Access

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

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

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

*EggMeat symposia 2011 - Leipzig*

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

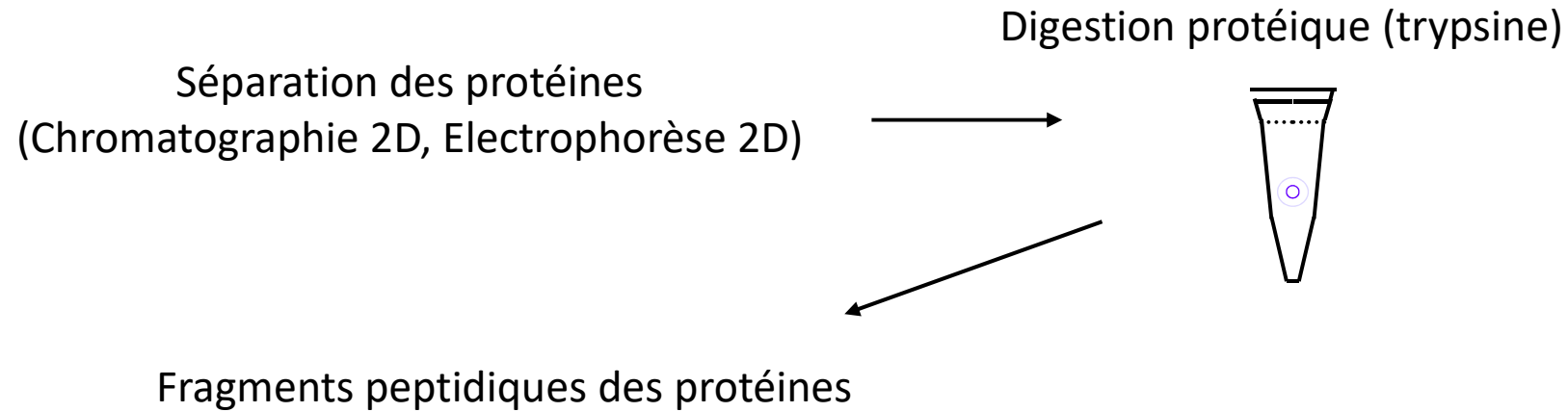
Gene expression profiling to identify eggshell proteins involved in physical defense of the chicken egg

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>

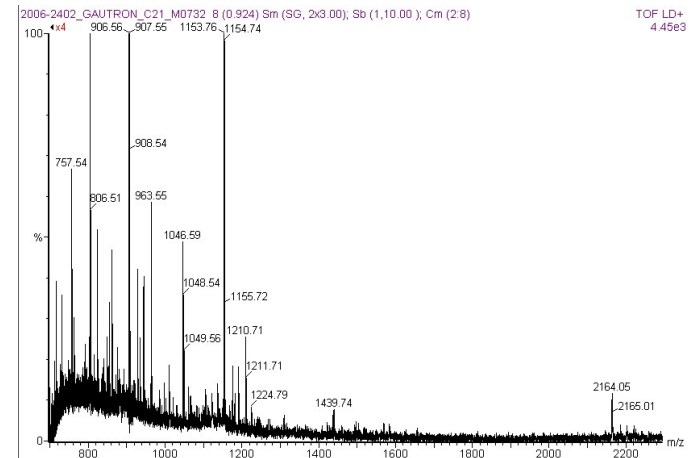
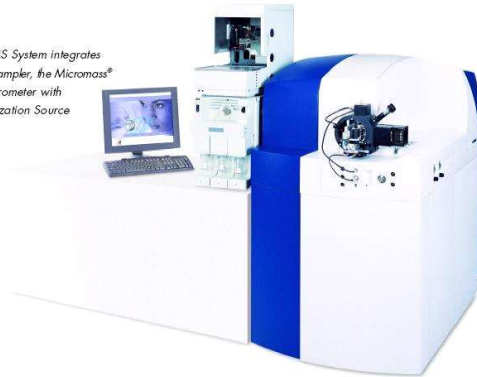


# La protéomique

(Mass spectrometry-based methods for protein identification)



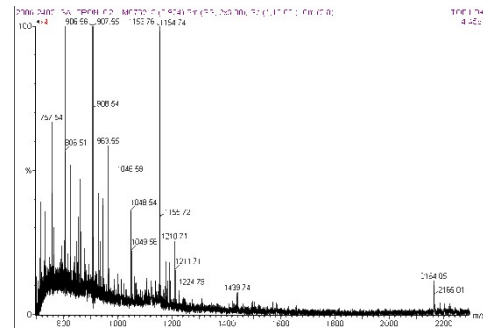
Waters® nanoscale LC/MS/MS System integrates the CapLC® XE Pump and Autosampler, the Micromass® Q-ToF Ultima™ API Mass Spectrometer with integral NanoLockSpray™ Ionization Source and MassLynx™ 4.0 Software.



Détermination de la masse Réelle des peptides



# La protéomique



Masse expérimentale des peptides

Séquences génomiques  
Séquences cDNA et ESTs



Digestion *in Silico* des protéines

Masse virtuelle des peptides

Comparaison

MEPSPLLLLLLLAPCGRGWAVSGR**APAEETARDGR/SVLPEKDDFHPR**TDTDPTTNCVNNCRDDGNCGRS  
RKCCHIRCPFR**CPQVPARPDTYPK**KKVPHIIGCCNSTCSSDTEFPNHLRCCQPMRRSSR**ITVALSLLGLGCWW**  
CSDPEKLCR**LIPRHRL**CRGRAYCYACIPALRSCR**VFVHSSCGGNANNFR**TLAECQQVCQHGLHKH

Identification protéique





# 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*)

2322

DOI 10.1002/pmic.200800032

Proteomics 2008, 8, 2322–2332

178

DOI 10.1002/pmic.200700790

Proteomics 2008, 8, 178–191

RESEARCH ARTICLE

RESEARCH ARTICLE

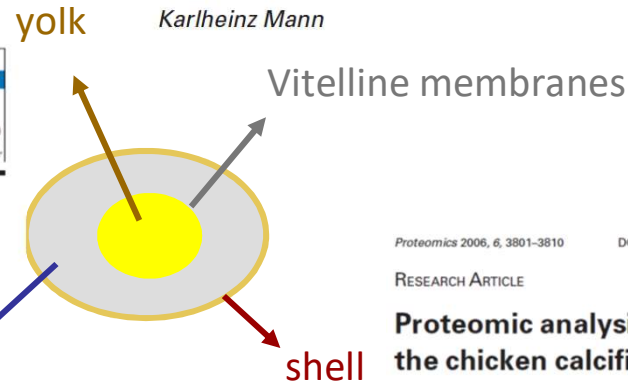
## The chicken egg yolk plasma and granule proteomes

Karlheinz Mann and Matthias Mann

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

## Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane

Karlheinz Mann



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

Alessia Farinazzo<sup>a</sup>, Umberto Restuccia<sup>b</sup>, Angela Bachi<sup>b</sup>, Luc Guerrier<sup>c</sup>, Frederic Fortis<sup>c</sup>, Egisto Boschetti<sup>c</sup>, Elisa Fasoli<sup>a</sup>, Attilio Citterio<sup>a</sup>, Pier Giorgio Righetti<sup>2,4</sup>

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

3558

DOI 10.1002/pmic.200700397

Proteomics 2007, 7, 3558–3568

RESEARCH ARTICLE

## The chicken egg white proteome

Karlheinz Mann

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

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 F...

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

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



proteins

<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



Gautron J. / Eggshell formation



# « 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

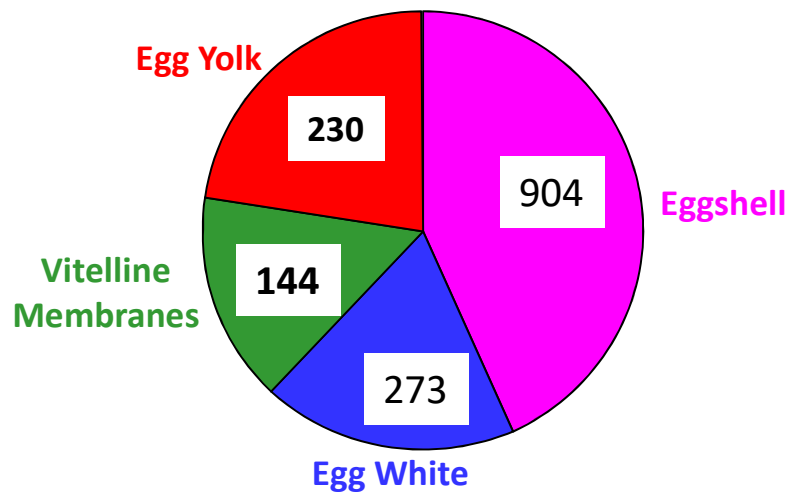


894 genes encode egg proteins

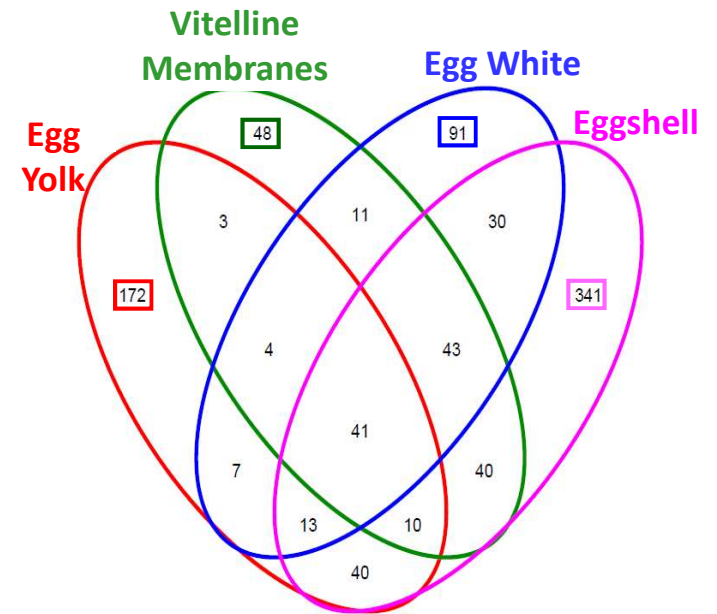
Protein variants  
and isoforms

1261 non redundant proteins in the egg

Repartition in egg compartments



Common, shared and specific proteins

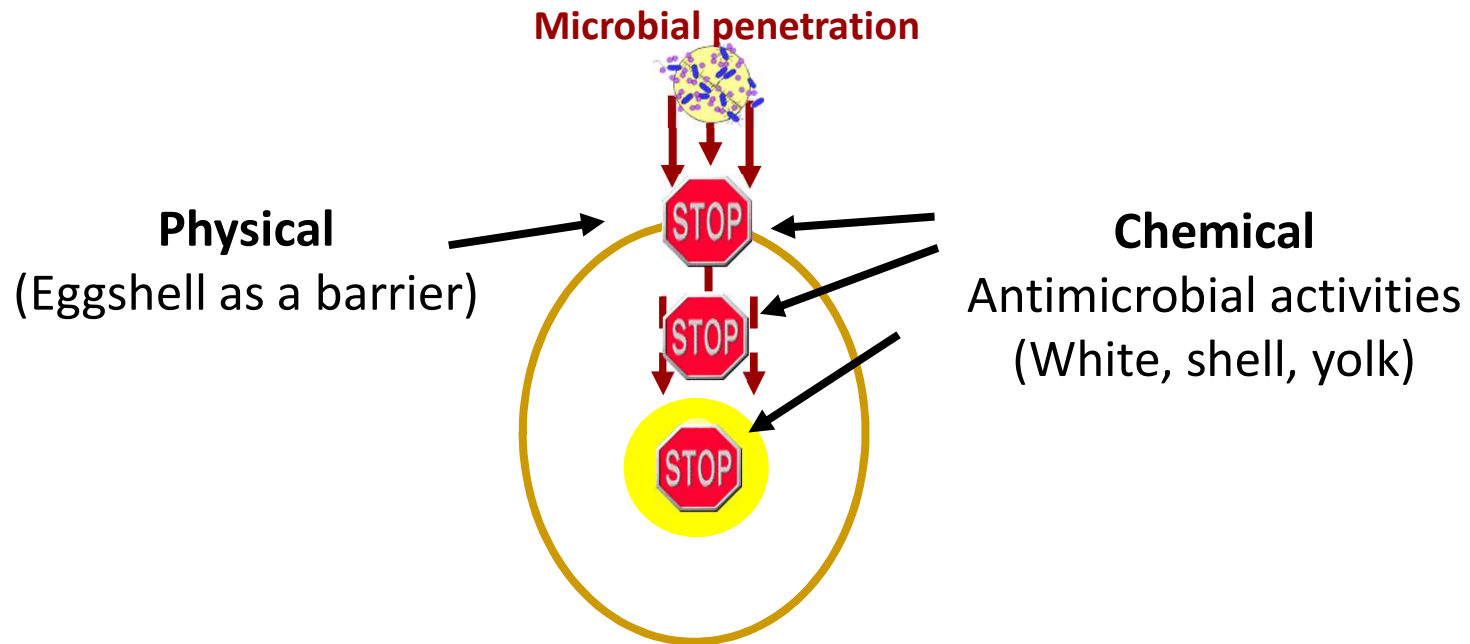


# Plan

- 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



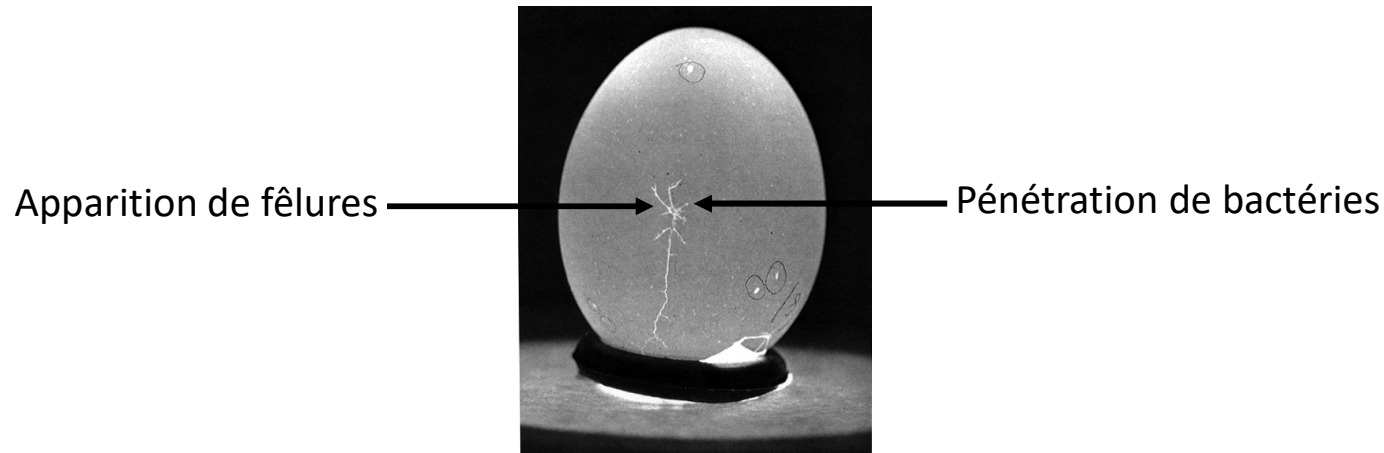
**Microbial quality of eggs ?**



**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

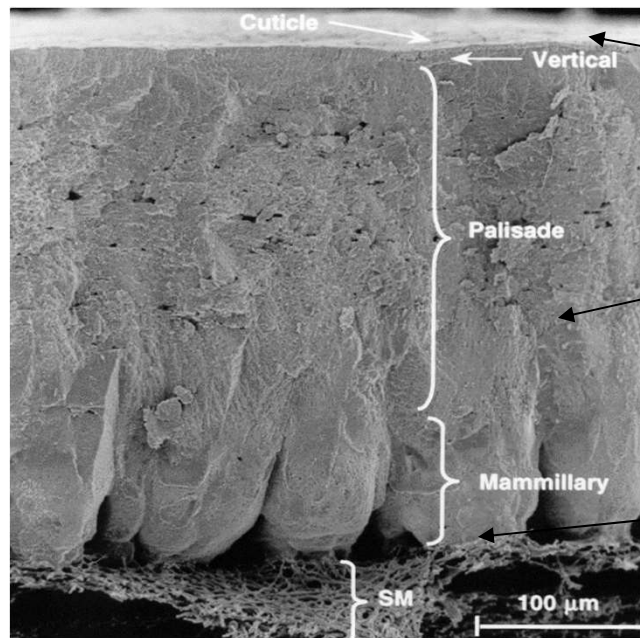


Comprendre les mécanismes de fabrication de la coquille et déterminer l'origine de ses faiblesses

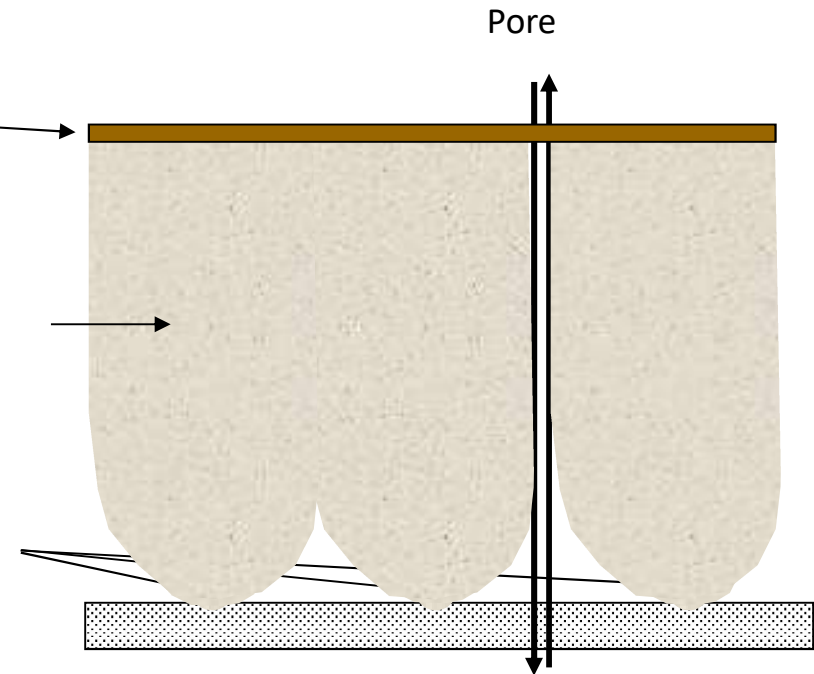
Développer de nouveaux outils pour la sélection



# La coquille (défense physique)



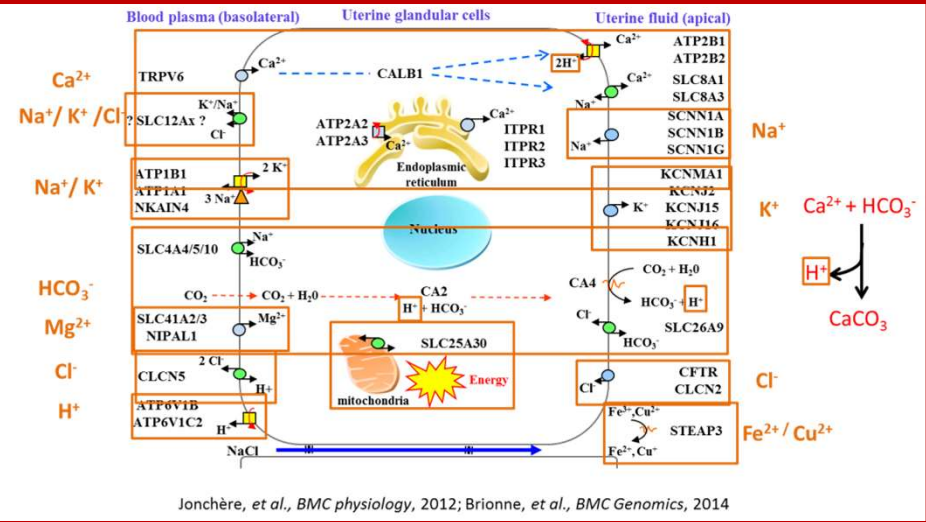
Cuticule  
Couche palissadique  
Noyaux mamillaires  
Membranes coquillières



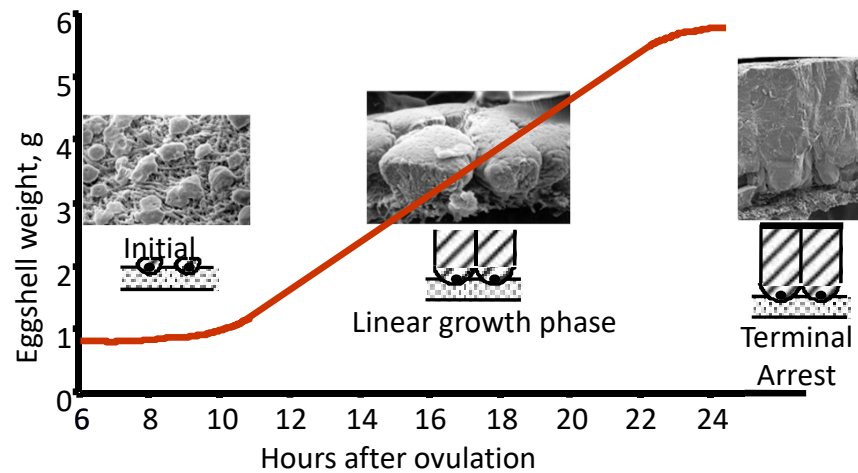


# Eggshell biomineralization in uterus

Supply of minerals for shell mineralization



3 main phases in the uterine fluid (acellular milieu)



# La Biominéralisation

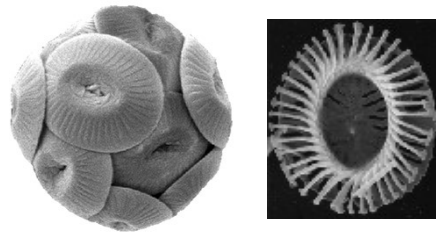
## → PROCESSUS UNIVERSEL ET CONSERVE SUR TERRE

\* 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

### Biominéralisation acellulaire dite contrôlée



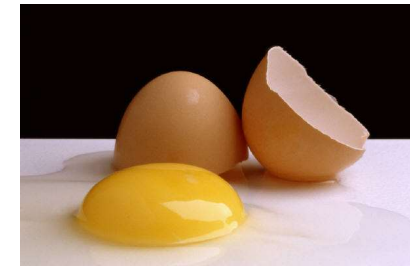
Perle



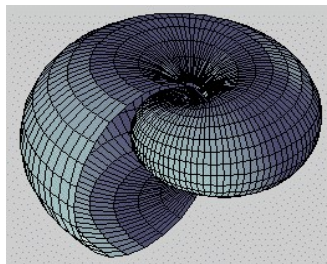
Coccolithes



Corail



Coquilles d'oiseaux



Coquilles de mollusques



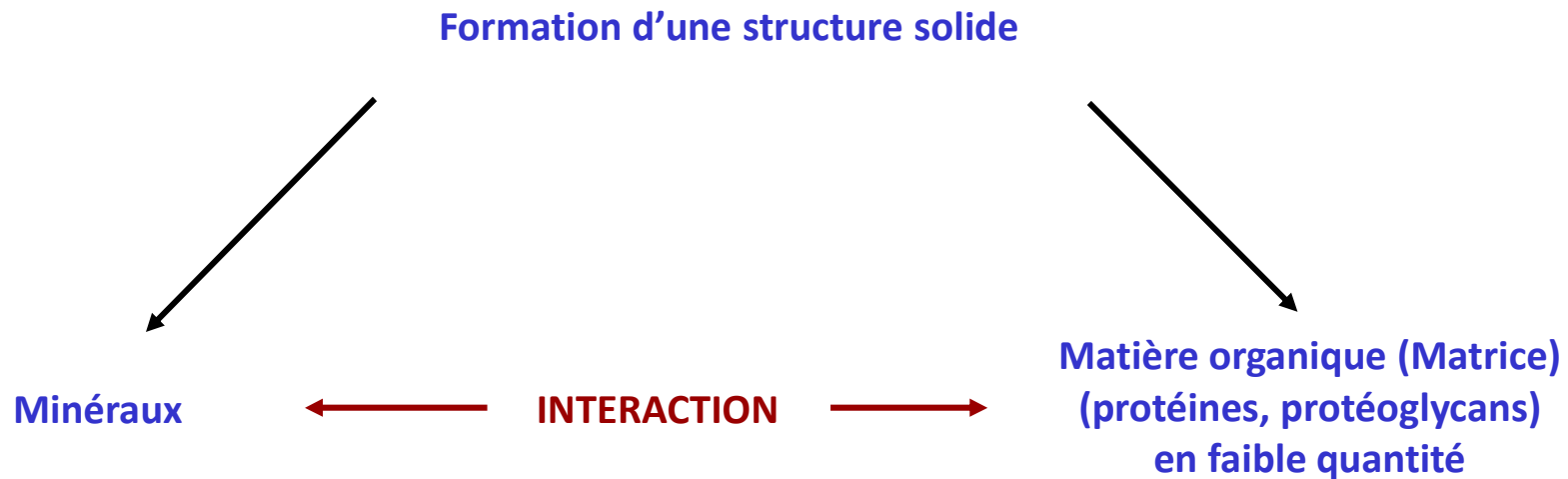
gastéropodes



# La Biominéralisation

→ **PROCESSUS UNIVERSEL ET CONSERVE SUR TERRE**

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



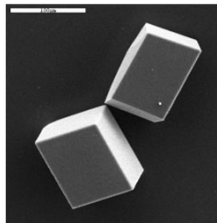
# La Biominéralisation

## → PROCESSUS UNIVERSEL ET CONSERVE SUR TERRE

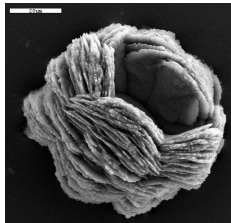
Malgré la diversité de formes et de fonctions, les structures biominérales se forment toujours selon les mêmes principes

→ 95% de carbonate de calcium sous forme de calcite

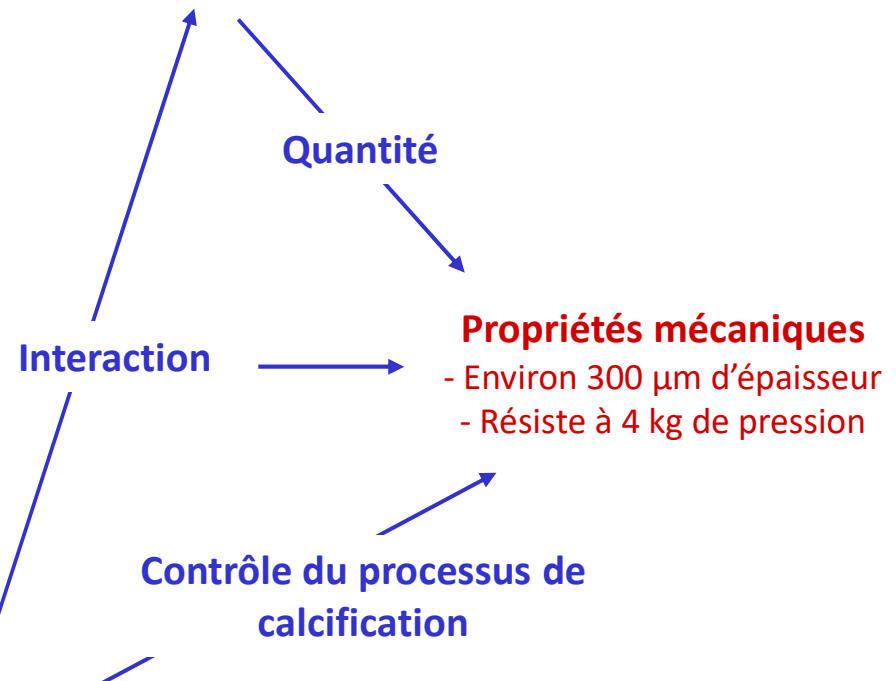
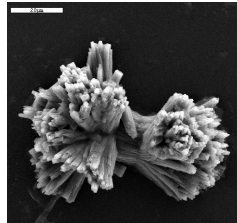
Calcite



Aragonite



Vatérite



Quantité

Interaction

**Propriétés mécaniques**

- Environ 300  $\mu\text{m}$  d'épaisseur
- Résiste à 4 kg de pression

Contrôle du processus de calcification

→ 3,5% de matière organique (matrice organique)

*Protéines et protéoglycanes*

# La Biominéralisation

## → PROCESSUS UNIVERSEL ET CONSERVE SUR TERRE

Malgré la diversité de formes et de fonctions, les structures biominérales 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

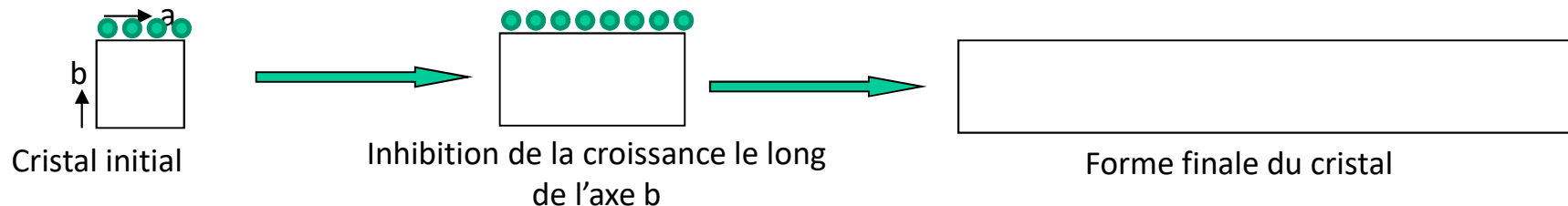
→ Les ions constitutifs du minéral doivent se trouver en conditions saturantes

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 biominéraux**

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



# La Biominéralisation

## → PROCESSUS UNIVERSEL ET CONSERVE SUR TERRE

Malgré la diversité de formes et de fonctions, les structures biominérales 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

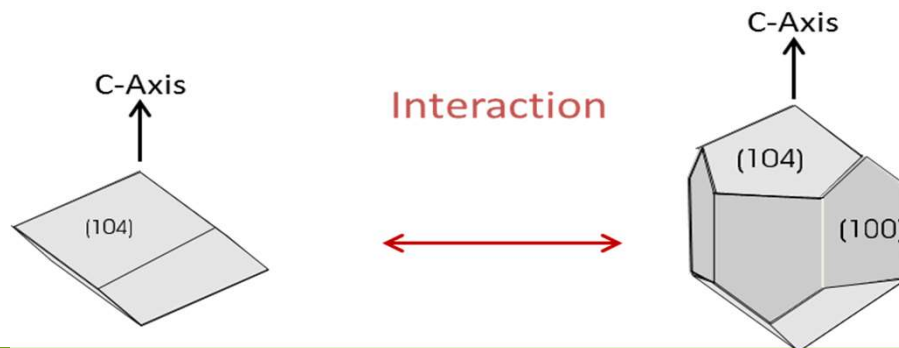
→ Les ions constitutifs du minéral doivent se trouver en conditions saturantes

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 biominéraux**

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

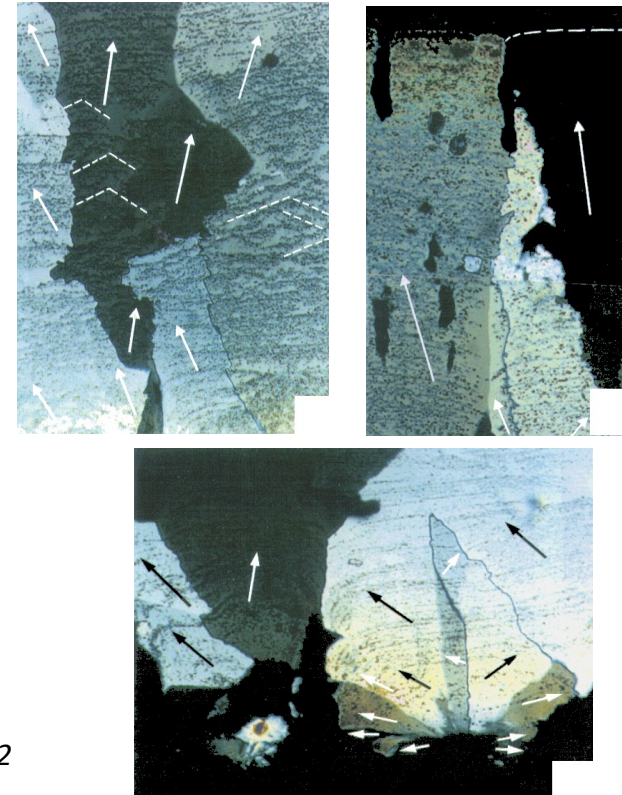
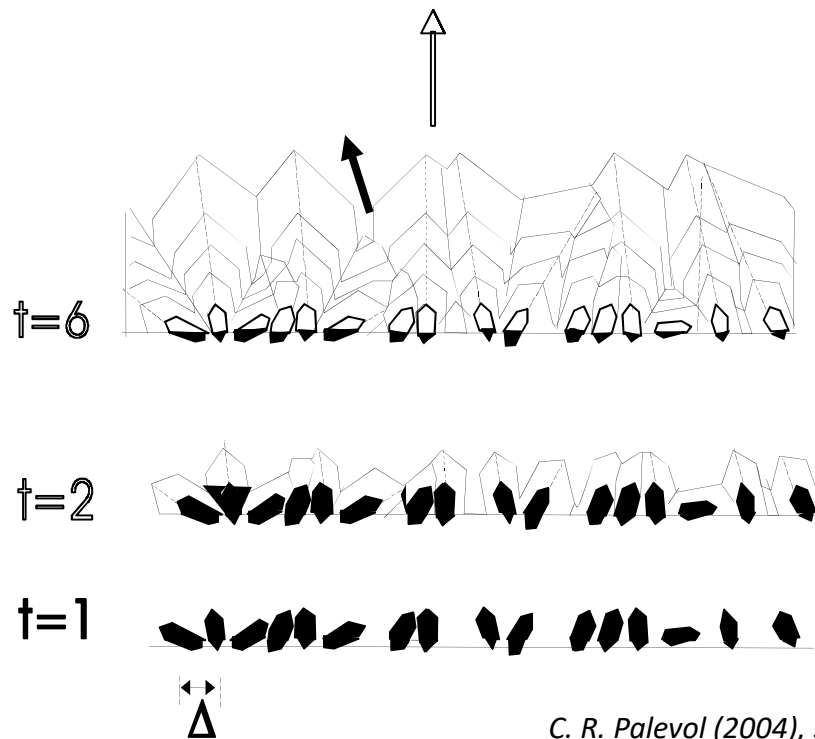




# La formation de la coquille, un processus de biominéralisation

→ Séquence temporelle de la nucléation, de la croissance

→ Modulée par la matrice organique



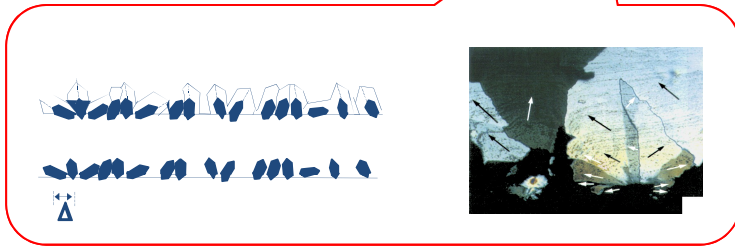
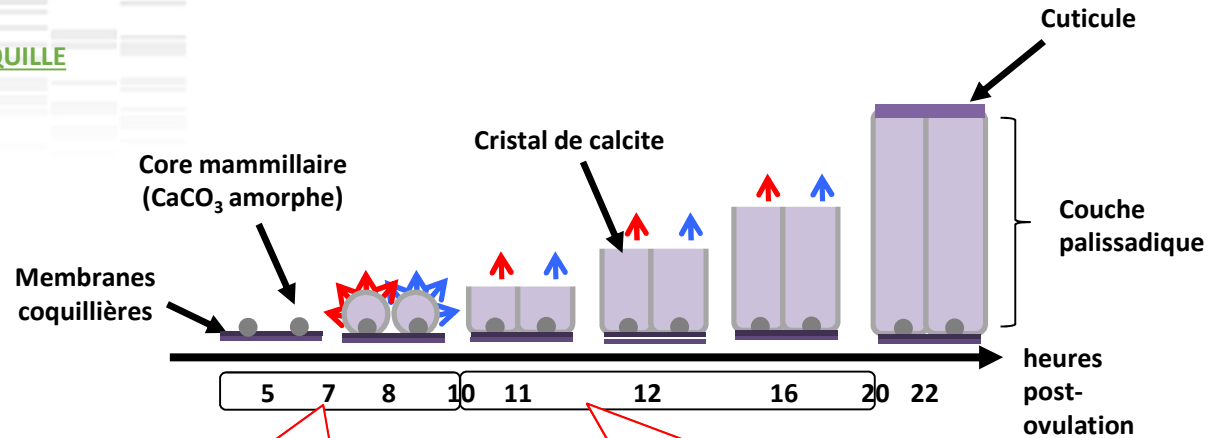
*C. R. Palevol (2004), 3, 549-562*

→ Identification et caractérisation des protéines de la matrice organique

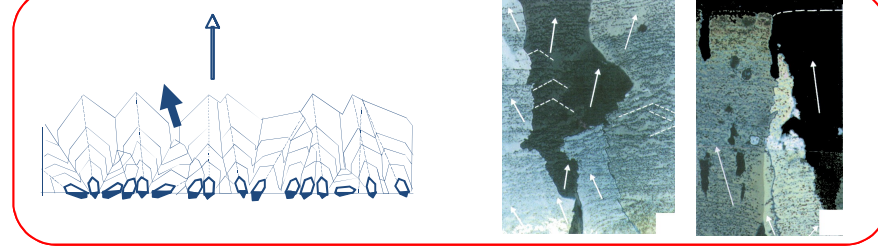
# Functions of eggshell matrix proteins

## LA FORMATION DE LA COQUILLE

Axes de croissance cristal 1  
Axes de croissance cristal 2



COMPETITION ENTRE LES CRISTAUX



CROISSANCE ANISOTROPE  
( $\perp$  aux membranes coquillières et  $\parallel$  à l'axe c)

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 ?

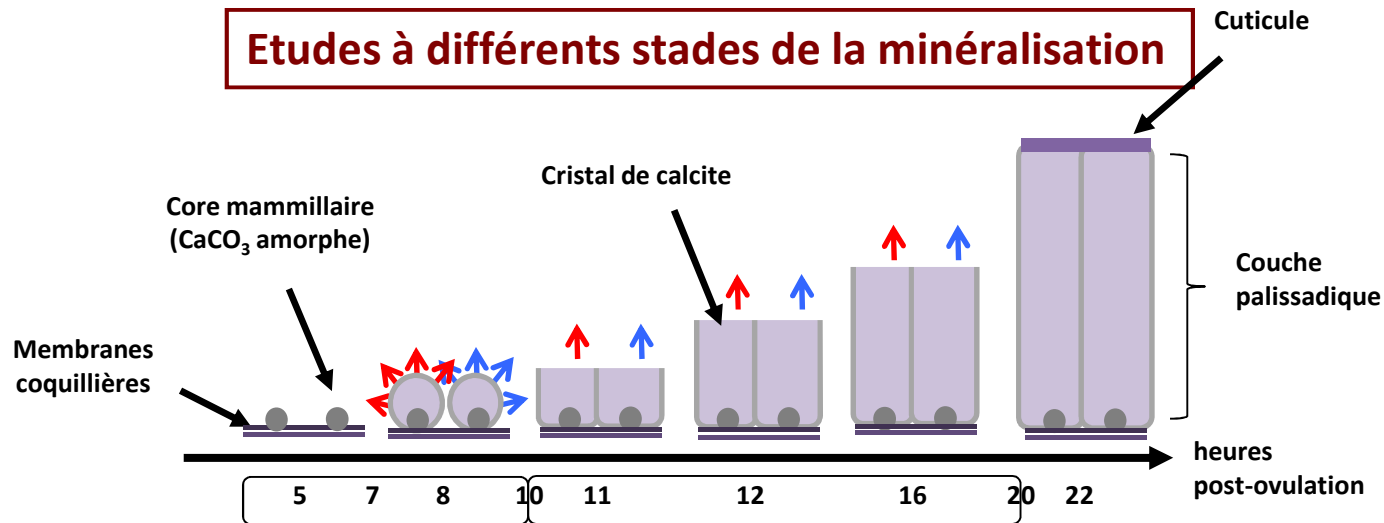
Comment faire ?



# Eggshell biomineralization

Hiérarchiser les acteurs moléculaires prépondérants lors du processus de minéralisation

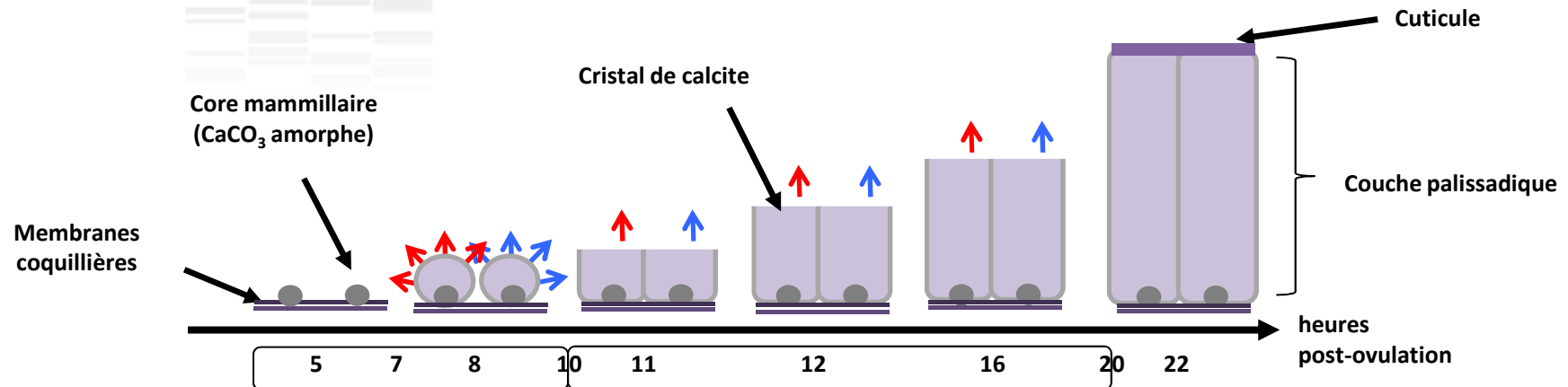
Etudes à différents stades de la minéralisation



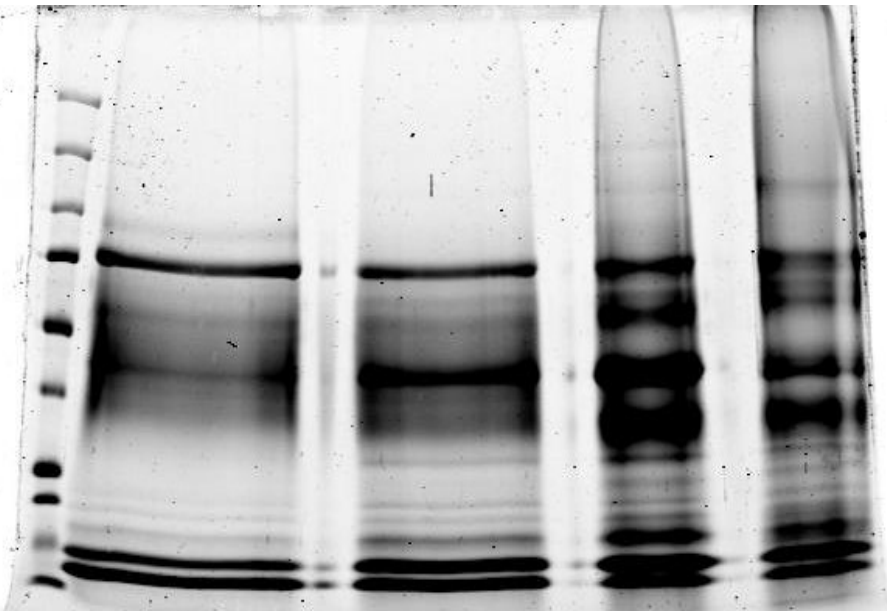
High-throughput quantitative proteomics, Uterine RNA-seq, statistical and bioinformatic functional analyses of matrix proteins

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)



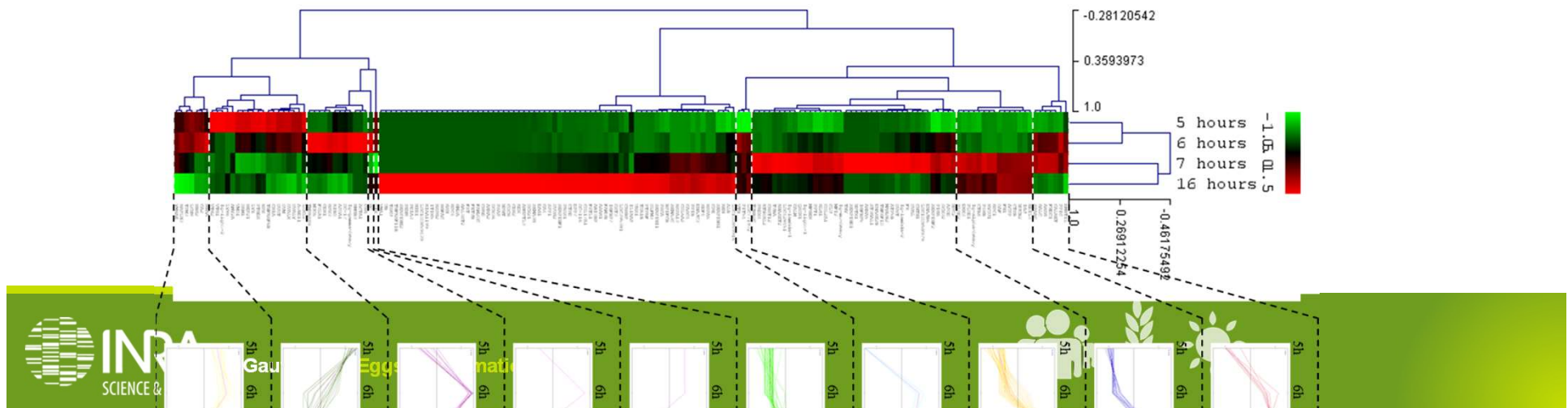
Analyse protéomique  
sur LTQ-VelosOrbitrap  
des bandes

Identification des protéines

Etablissement d'une liste non  
redondante de 316 protéines

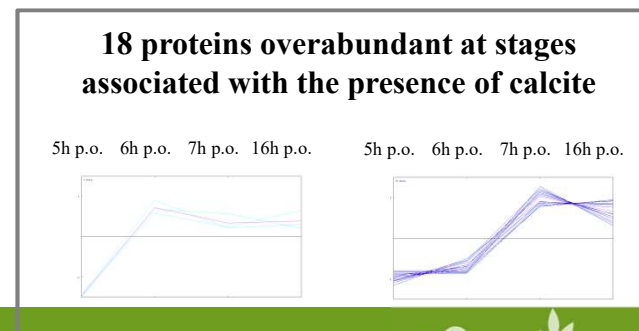
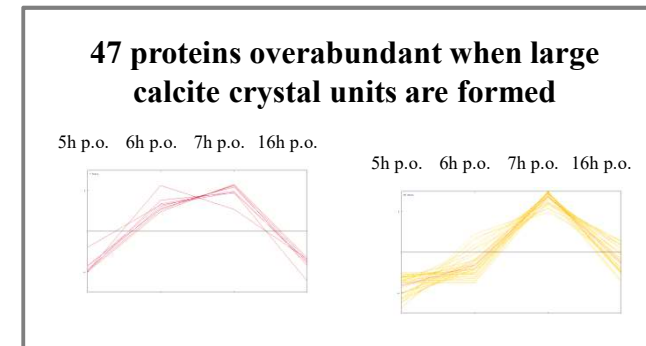
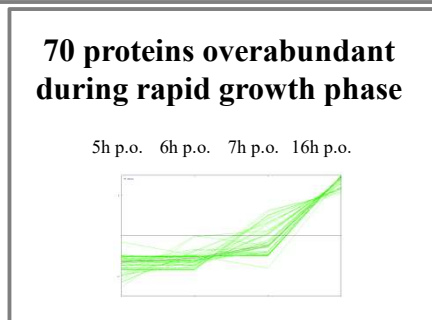
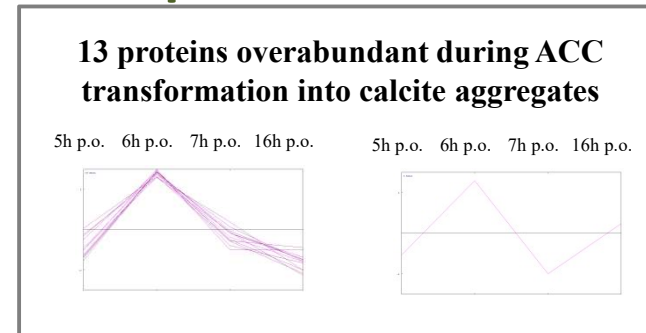
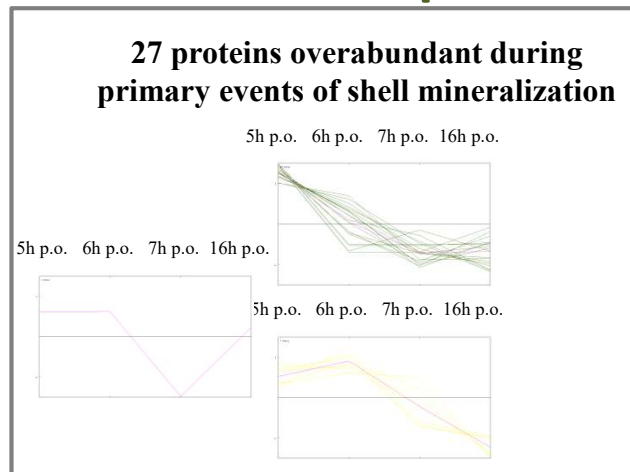
# Etude spatio-temporelle des protéines impliquées dans la biominéralisation de la coquille des oiseaux

- 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

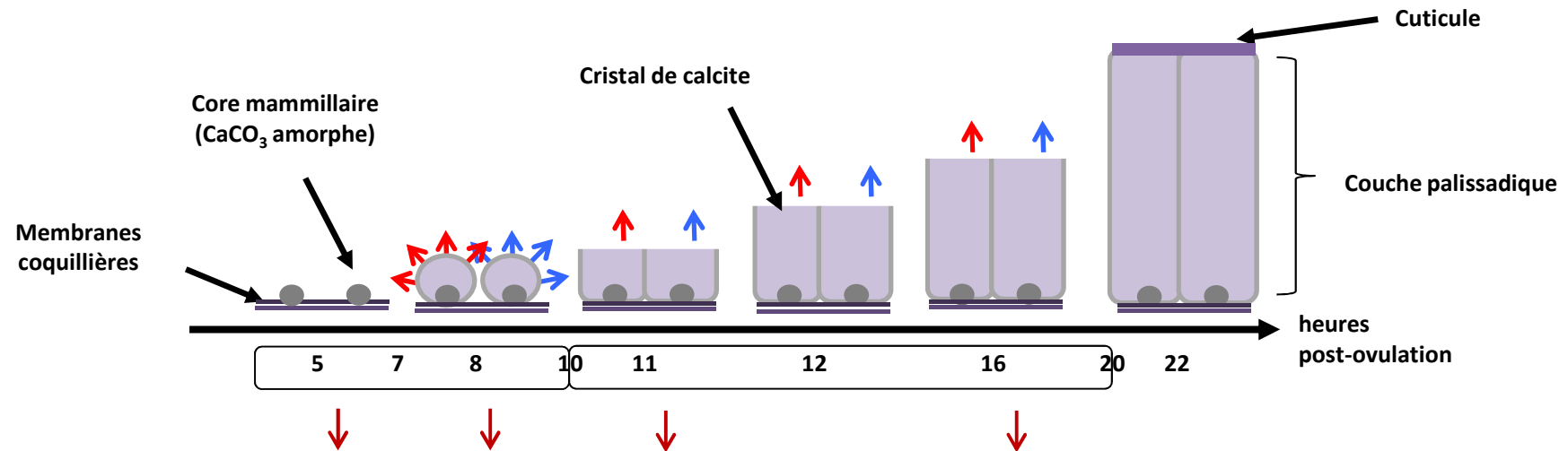


# Etude spatio-temporelle des protéines impliquées dans la biominéralisation de la coquille des oiseaux

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



# 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

↓

Library preparation and RNA sequencing (illumina HiSeq)

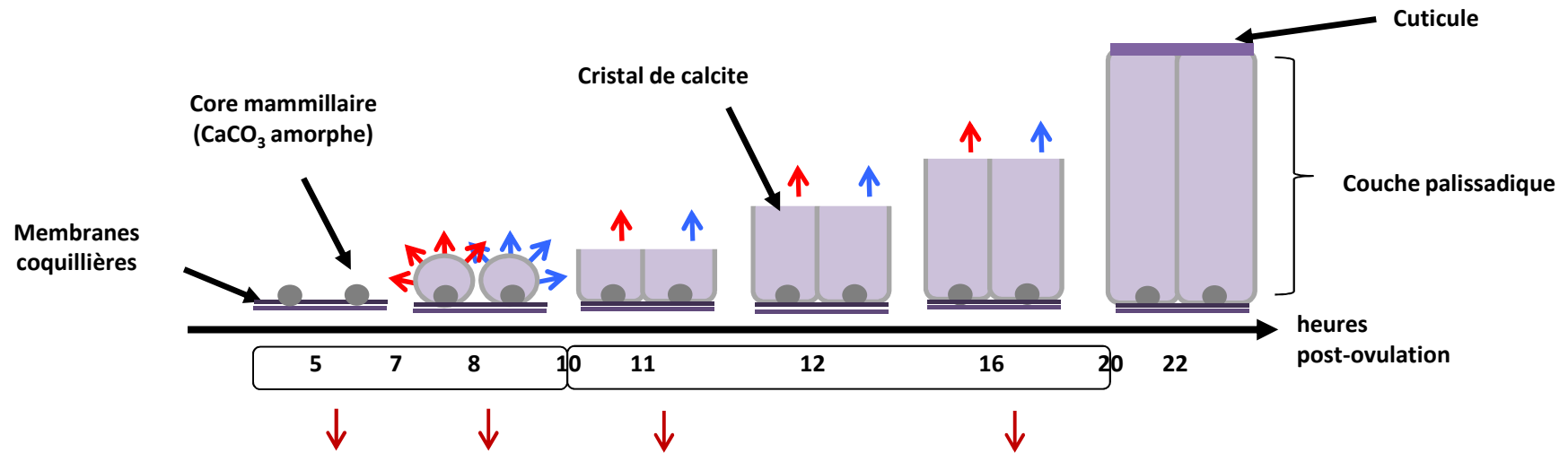
↓

Paired-end reads were aligned to the *Gallus gallus* reference genome (galGal4)

↓

Assembled with Cufflinks, annotated according Ensembl Genes chicken

# 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%)

↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

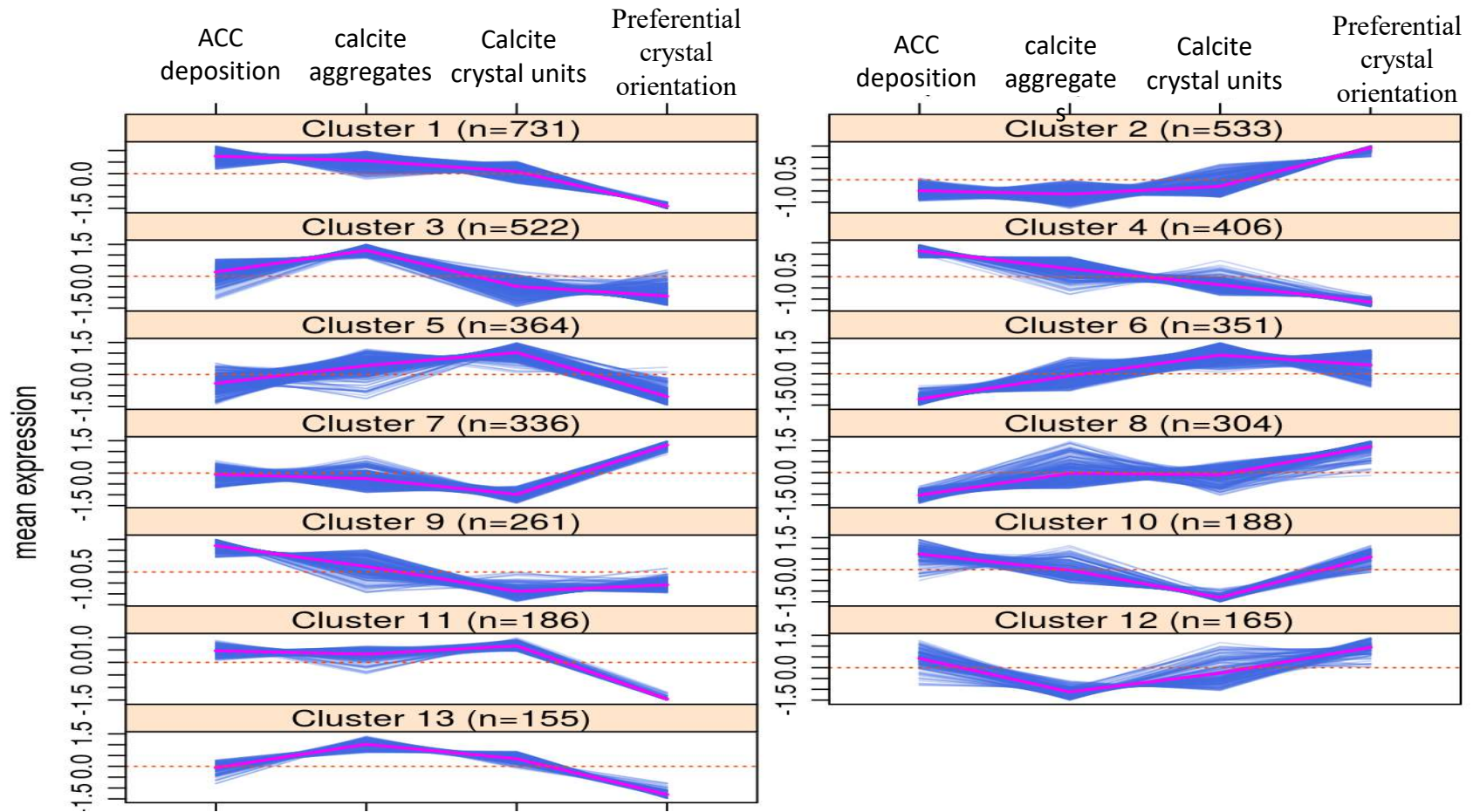
Transcripts with an absolute Fold Change (Fc) upper than 1.5 in one stage

↓ ↓ ↓ ↓

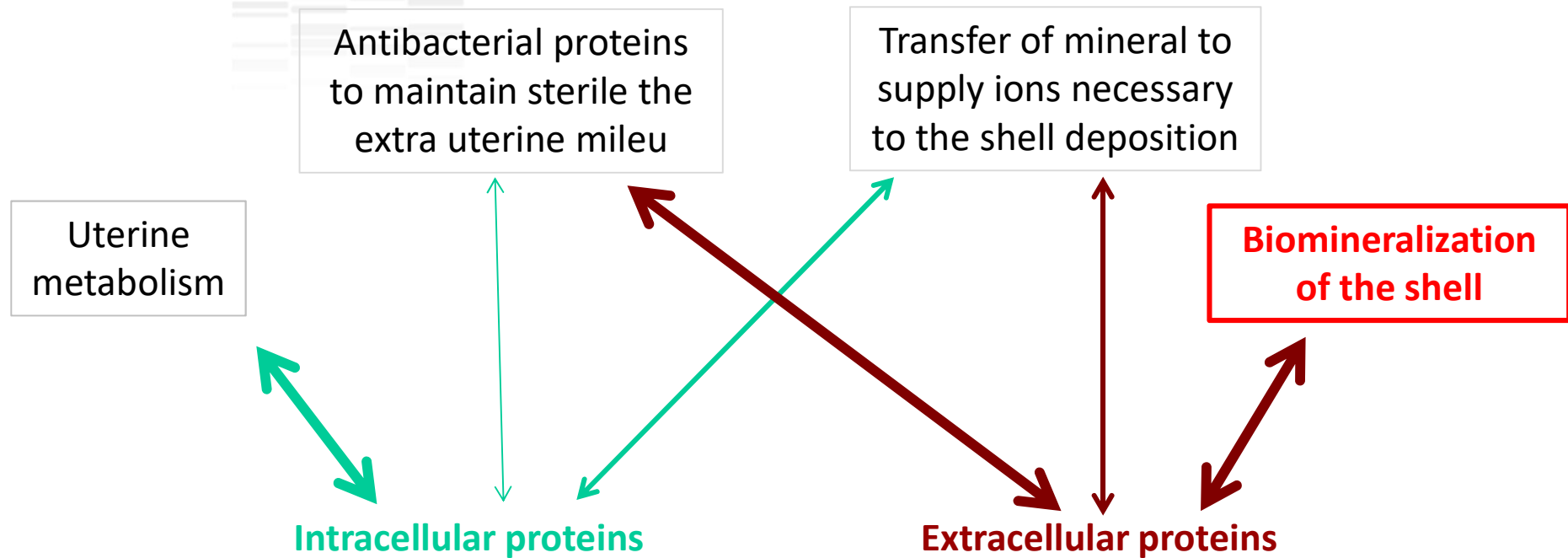
**4502 differentially expressed transcripts representing 3766 different genes**

# 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

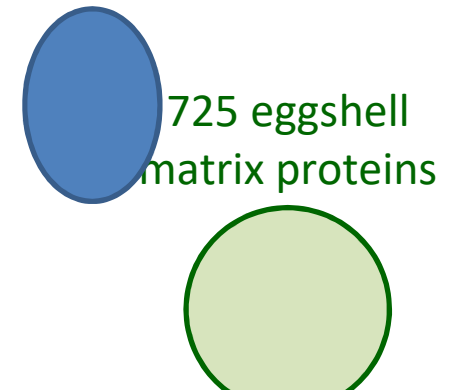
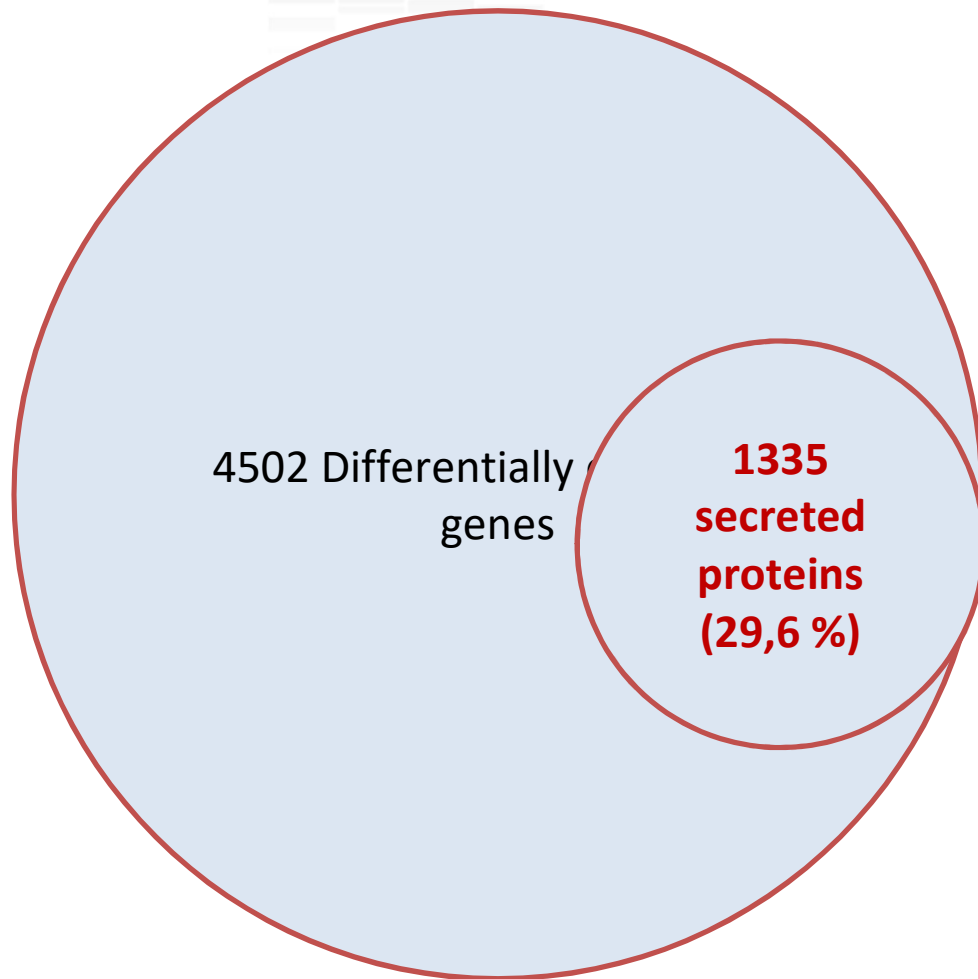


→ Predictive analysis of DE genes coding for secreted proteins





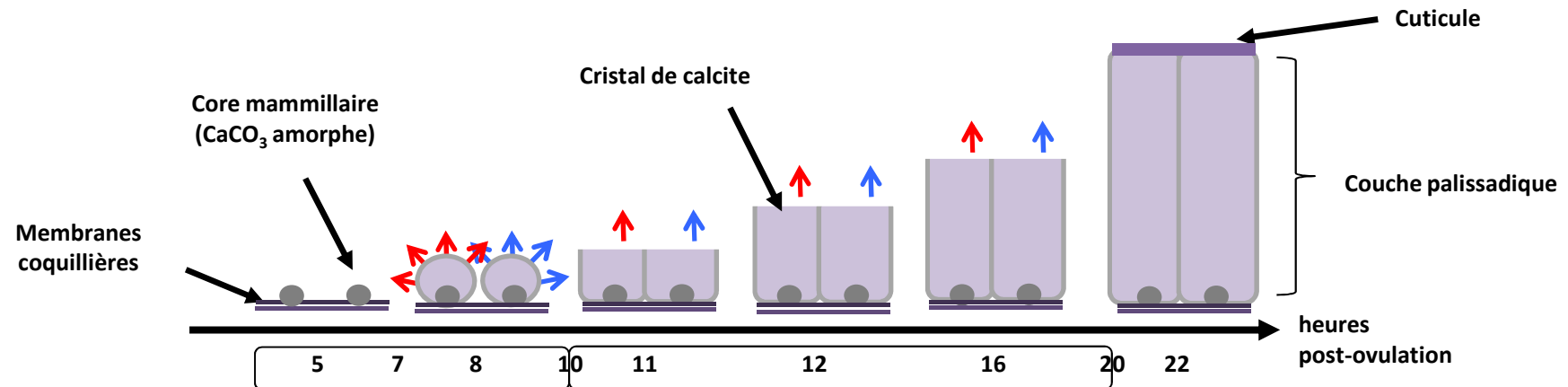
# Uterine genes and eggshell matrix proteins



**444 Main candidate proteins to be involved in the shell biomineralization process**



# 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)



**Impact  
(2013-2017)**

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**

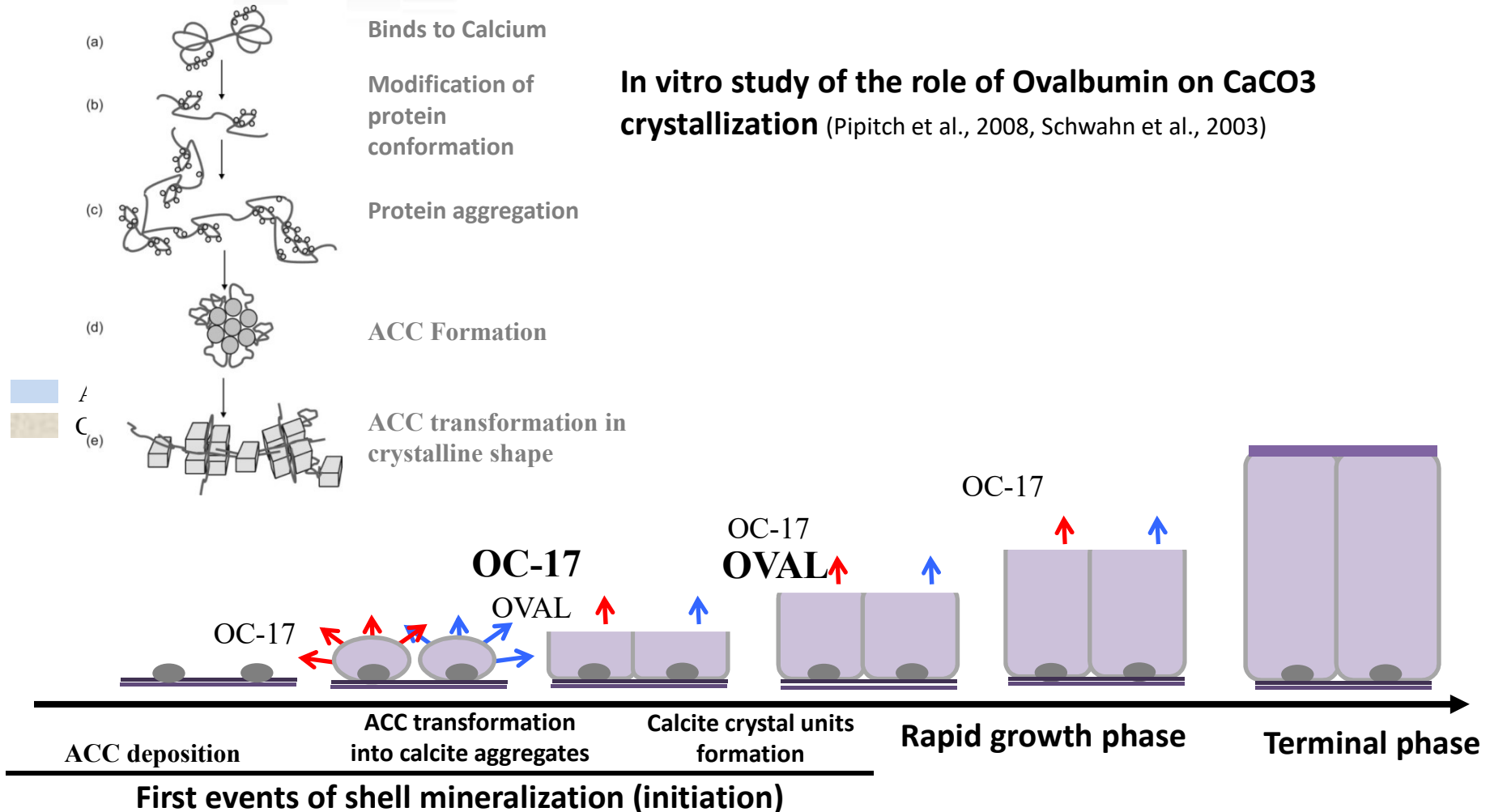
**Antimicrobial and other  
proteins**



# 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**

Freeman et al, 2010

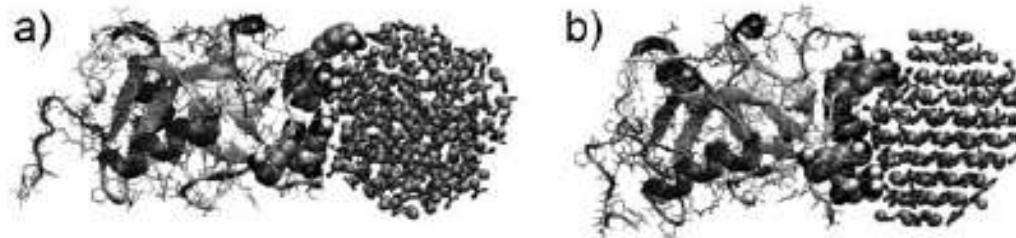
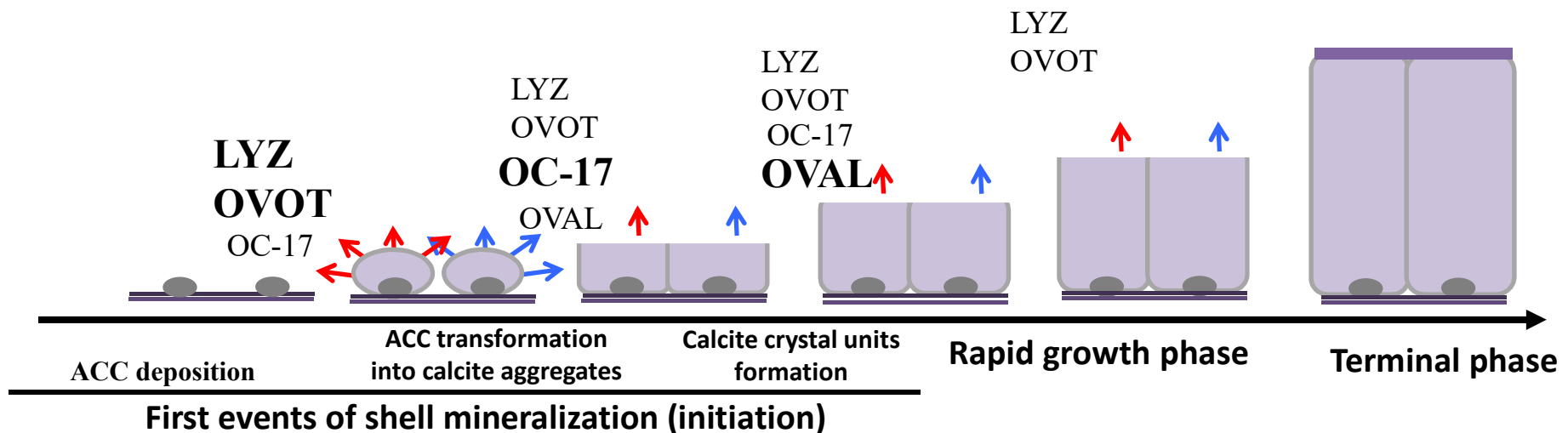


Figure 1. Ovocleidin-17 bound to an amorphous (a) and a crystallized (b) calcium carbonate nanoparticle containing 192 formula units. The



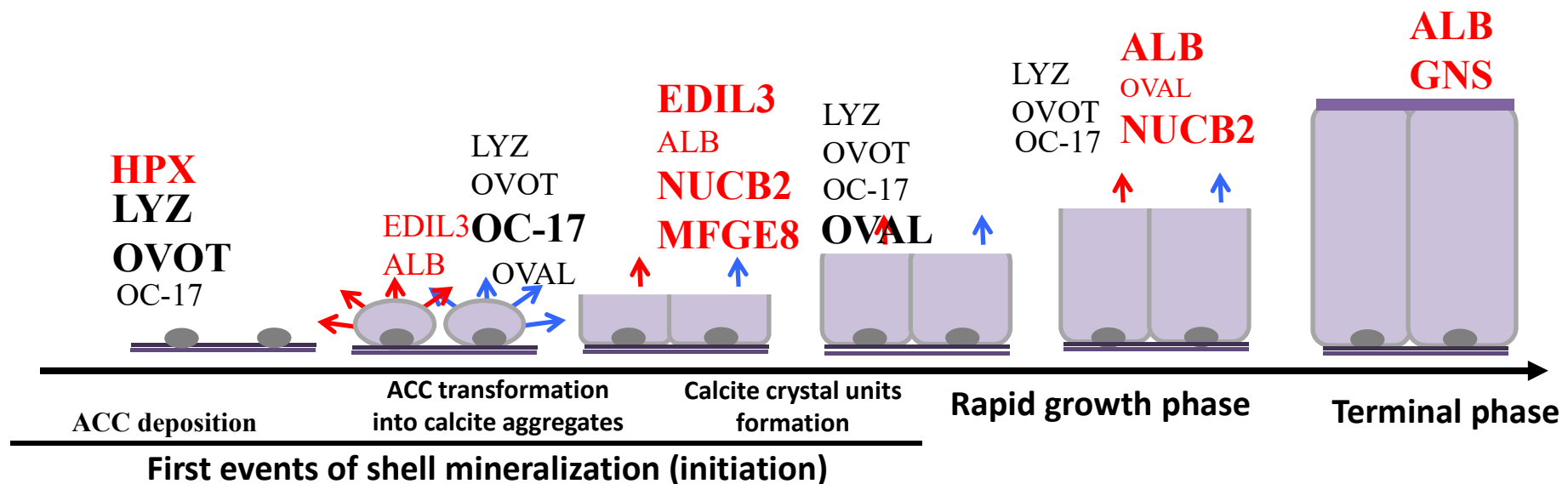
# Function of matrix proteins at pivotal events

## □ 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

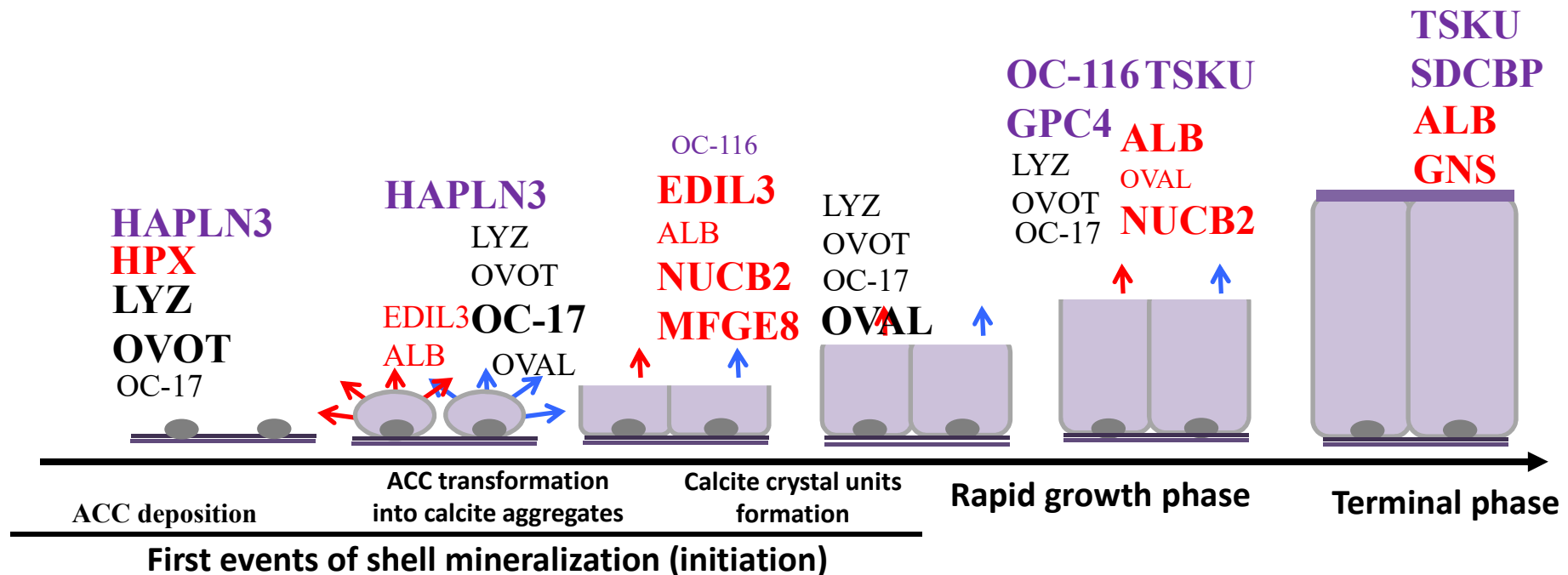
✓ Proteins with established role in the **biomineralisation**

✓ **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**

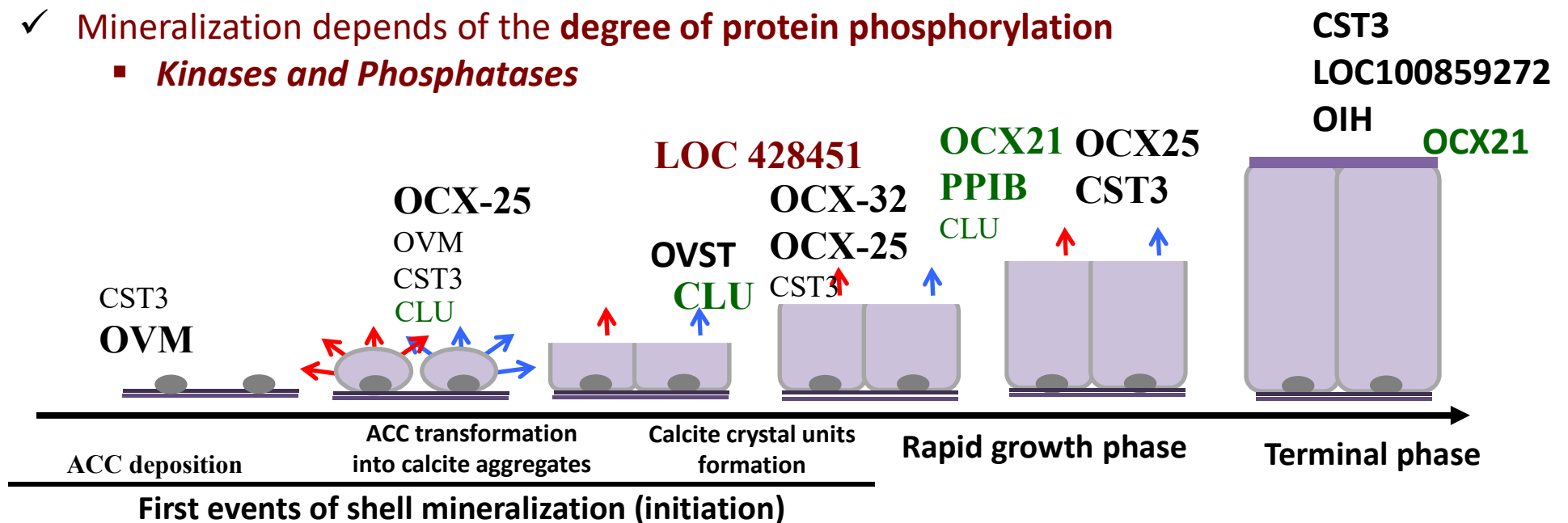
- proteoglycans have a negative charge to attract Ca<sup>2+</sup> ions



# 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

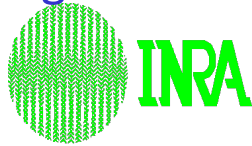
- I. Introduction
- II. Approches à haut débit pour identifier les protéines déposées dans l'œuf d'oiseaux
  1. Généralité – stratégie expérimentale
  2. Utilisation combinée des banques et outils
  3. Transcriptome de l'œuf
  4. Protéome de l'œuf
- III. Mieux comprendre les défenses de l'œuf grâce aux 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



SRA STATION DE RECHERCHES AGRICOLES  
Nozilly, 37380 MONNAIE, France

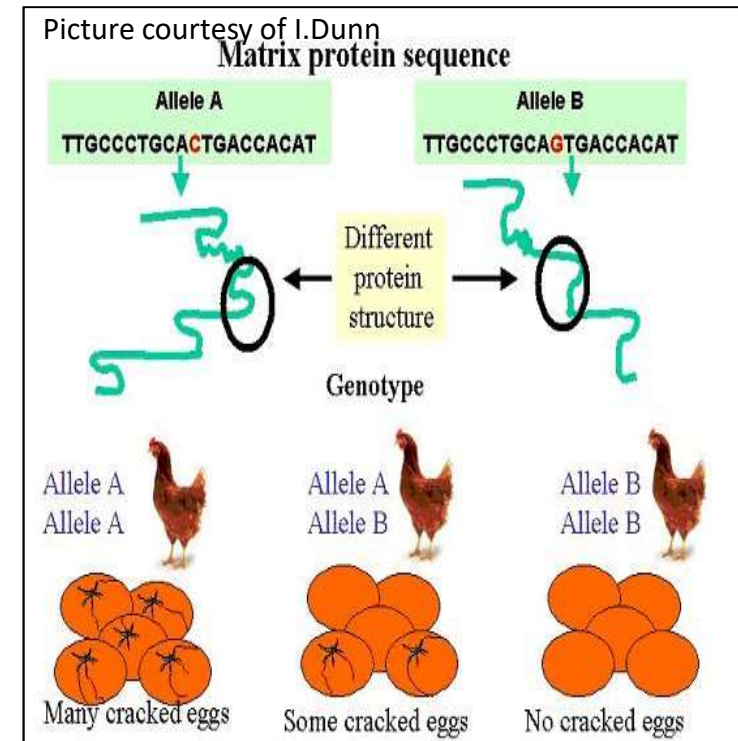
Ian Dunn, Maureen Bain  
Roslin Institute, University of Glasgow

## 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 génomique pour améliorer la solidité de la coquille

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



SRA STATION DE RECHERCHES AVICOLEES  
Nouzilly, 37380 MONNAIE, France

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

