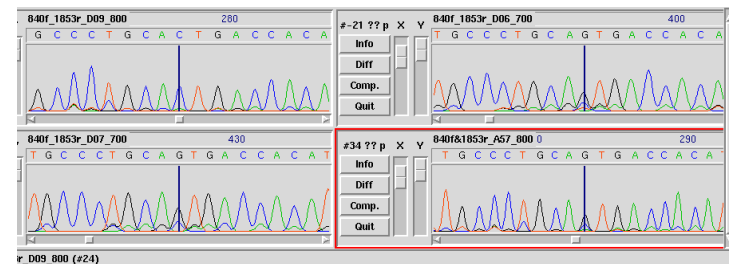
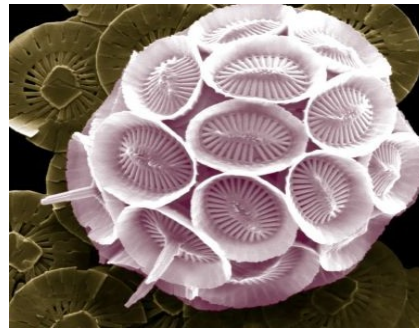
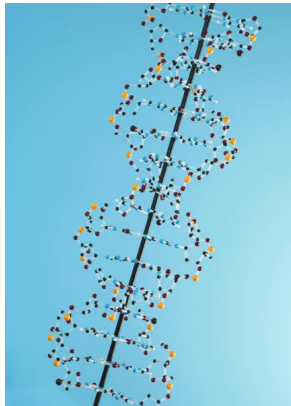


Apport des techniques à haut débit pour l'identification des gènes et des protéines impliqués dans un processus physiologique

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'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

STAGE ?

L'œuf de poule

Au niveau mondial en 2012

- ❑ 66,4 millions de tonnes par an (>1200 milliards d'œufs)
- ❑ Accroissement du marché de 2.2 %
- ❑ Premier producteur est la Chine (24,5 MT – 37 % de la production mondiale)
- ❑ Union européenne second producteur mondial (6 MT- 9 % de la production mondiale)

Filière française en 2013

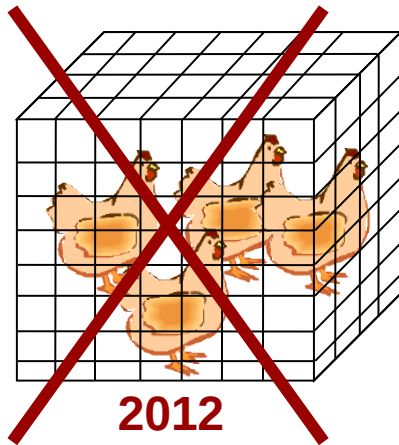
- ❑ 15,2 milliards d'œufs (47 millions de poules pondeuses)
- ❑ 1.37 milliards d'Euros
- ❑ 4 % de la valeur des productions animales
- ❑ 1.7 % de la valeur des productions agricoles

Consommation

- ❑ 145 œufs par an et par habitant dans le monde
- ❑ 216 œufs par an et par personne en France
- ❑ 60% sous forme d'œufs en coquille
- ❑ 40% sous forme d'ovoproduits

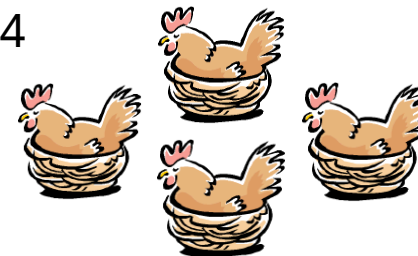
Source ITAVI

Le contexte européen



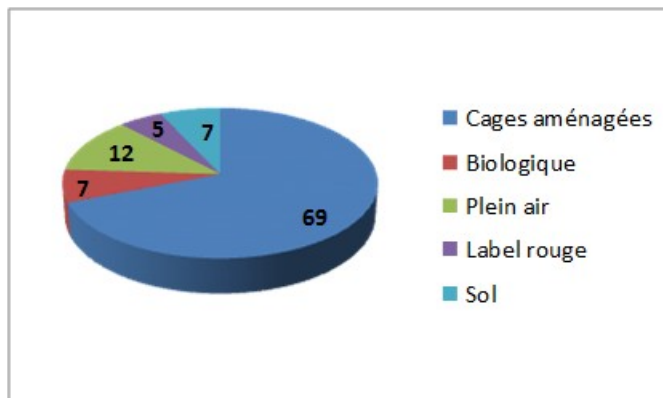
2012
Interdiction des cages conventionnelles

Directive EU 1999/74
Animal welfare



Cages aménagées, volières
ou autres systèmes au sol

Segmentation du marché de l'œuf (source ITAVI)



Consommation en France 2012

Cages aménagées (50 %)

Autres systèmes (50 %)

Impact sur la qualité hygiénique de l'œuf ?

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)

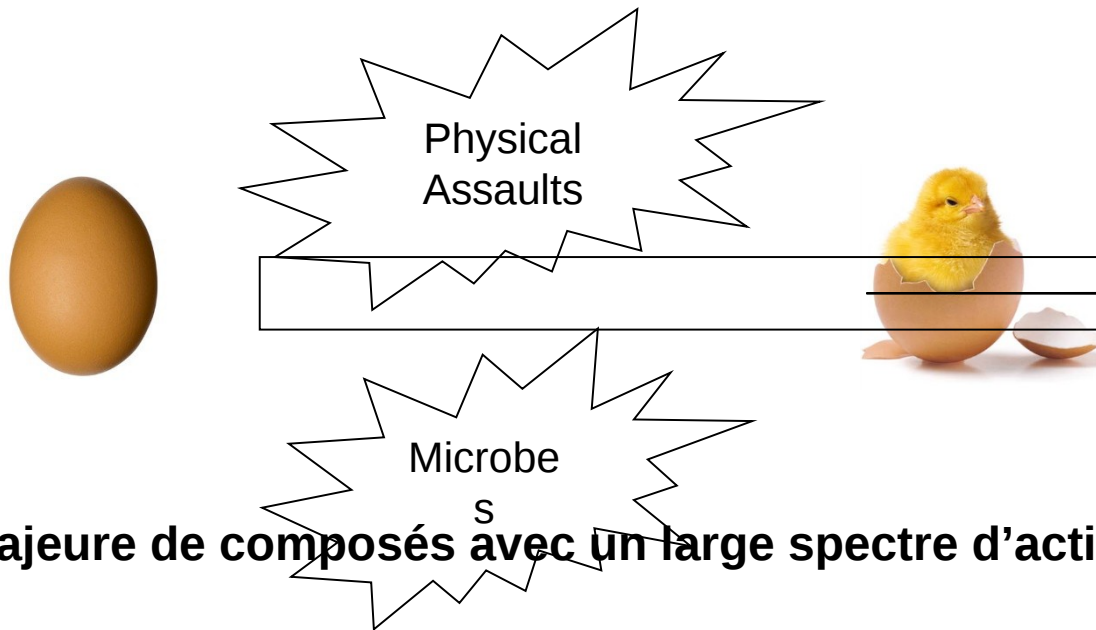
Le risque de contamination par les microorganismes et notamment *Salmonella* est donc une préoccupation pour la filière œufs et ovoproduits

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

- **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

Microbe

S

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
 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

Identification des protéines de l'œuf

Les techniques classiques

➤ Biochimie (Fractionnement des composés de l'œuf par chromatographie, électrophorèses...) et biologie moléculaire

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

Les développements récents

✓ 2004, Publication de la séquence génomique de la poule



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



NCBI UniGene Gallus gallus

PubMed Protein Genome Structure PopSet Taxonomy OMIM

Search UniGene Gallus gallus[organism] Go Clear

Gallus gallus: UniGene Build #46

Lineage: cellular organisms; Eukaryota; Fungi/Metazoa group; Metazoa; Eumetazoa; Bilateria; Coelomata; Deuterostomia; Chordata; Craniata; Vertebrata; Gnathostomata; Teleostomi; Euteleostomi; Sarcopterygii; Tetrapoda; Amniota; Sauropsida; Sauria; Archosauria; Aves; Neognathae; Galliformes; Phasianidae; Phasianinae; Gallus; Gallus gallus

Sequences included in UniGene

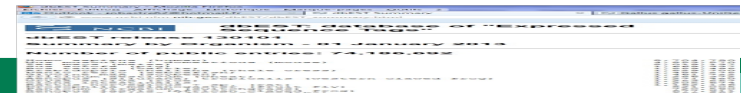
Known genes are from GenBank 18 Aug 2012
ESTs are from dbEST through 18 Aug 2012

33,838	mRNAs
683	Models
0	HTC
11,088	EST, 3reads
418,700	EST, 5reads
79,390	EST, 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

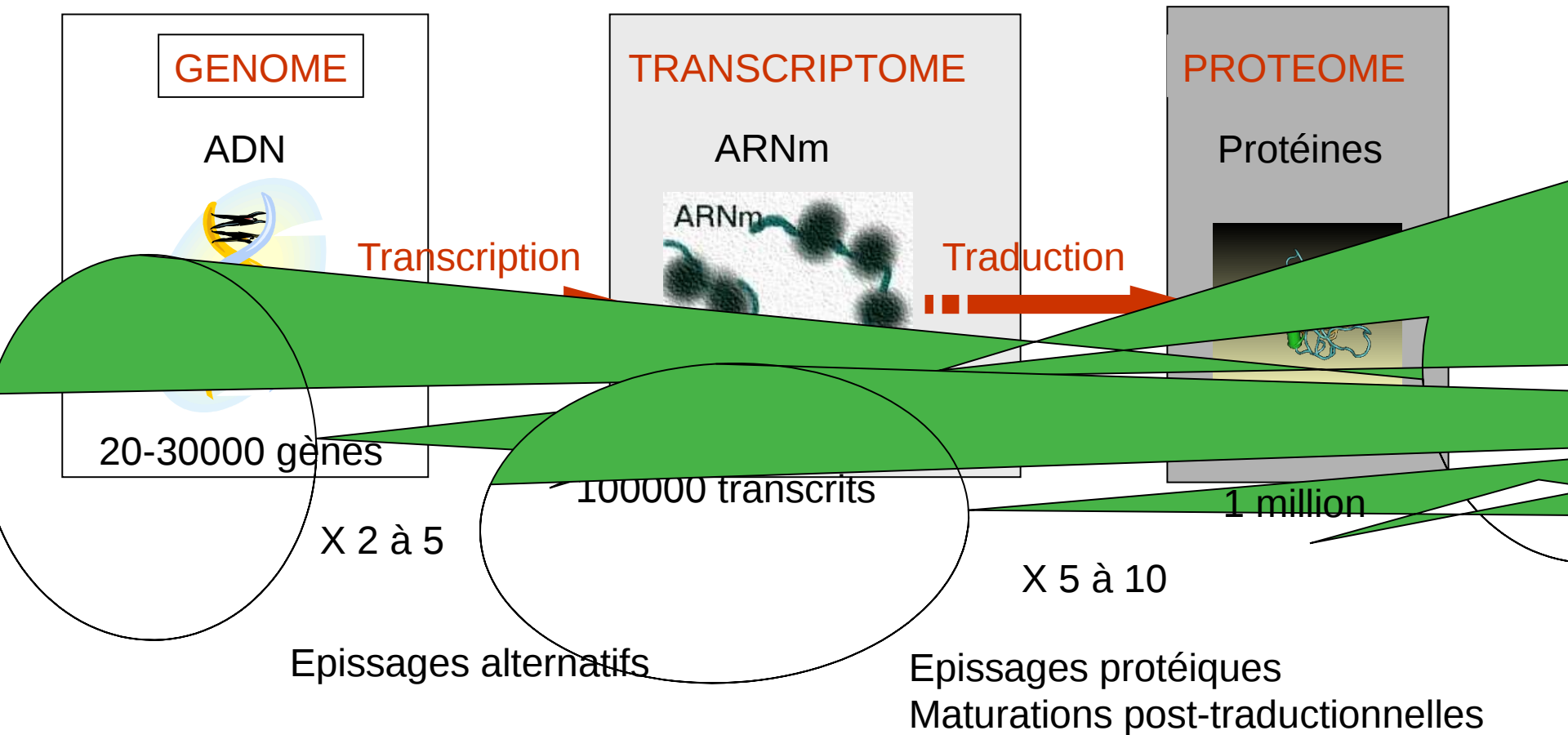
✓ cDNA and ESTs libraries (Identification of 600 434 functional genes in chickens)



Les banques cDNA et EST

Le but

* Identifier les gènes fonctionnels



Les banques EST

Le but

- * Identifier les gènes fonctionnels

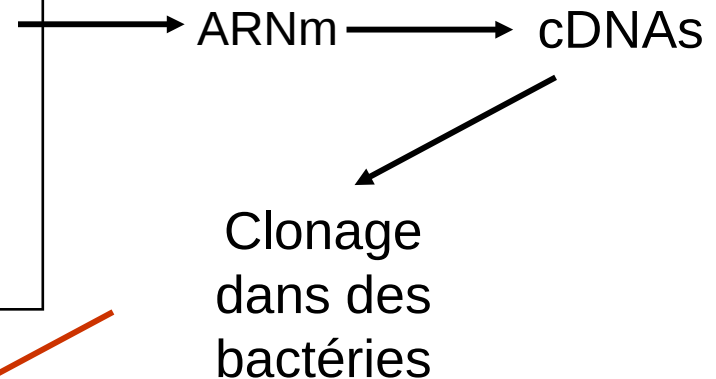
Méthode

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

Recueil des tissus:

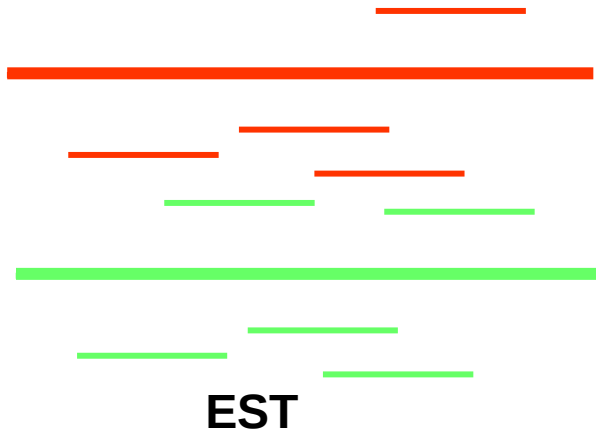
Nombreuses fonctions biologiques :
(Tissus reproducteurs, système digestif,
Système nerveux central, foie, intestin, rate,
...)

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



**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) **pour 260 460 contigs et 129 842 singlets** (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 spécifique de la matrice organique de la coquille

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 282, NO. 8, pp. 5273–5286, February 23, 2007
© 2007 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

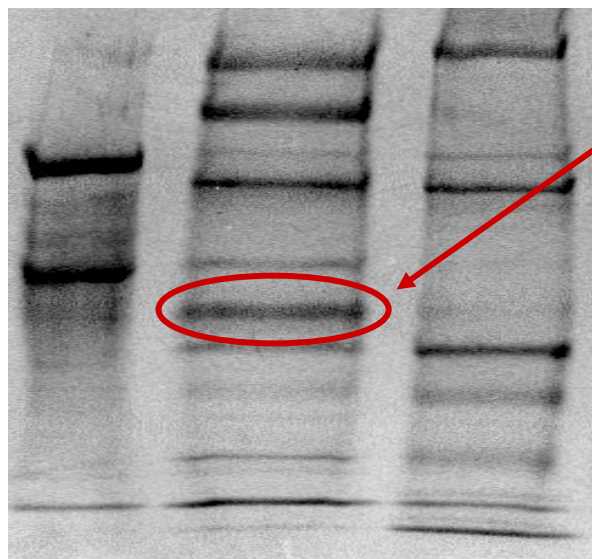
Cloning of Ovocalyxin-36, a Novel Chicken Eggshell Protein Related to Lipopolysaccharide-binding Proteins, Bactericidal Permeability-increasing Proteins, and Plunc Family Proteins*

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

Joël Gautron^{†1}, Emi Murayama[§], Alain Vignal[¶], Mireille Morisson[¶], Marc D. McKee^{||}, Sophie Réhault[‡],
Valérie Labas^{**}, Maya Belghazi^{**}, Mary-Laure Vidal[‡], Yves Nys[‡], and Maxwell T. Hincke^{††}

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

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

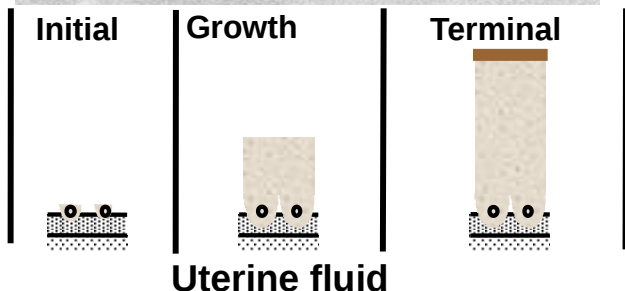


36 kDa Band

N-terminal Amino acid sequencing :
VLGSGLSCAISPRAMQQVLSDAIIQTGGL

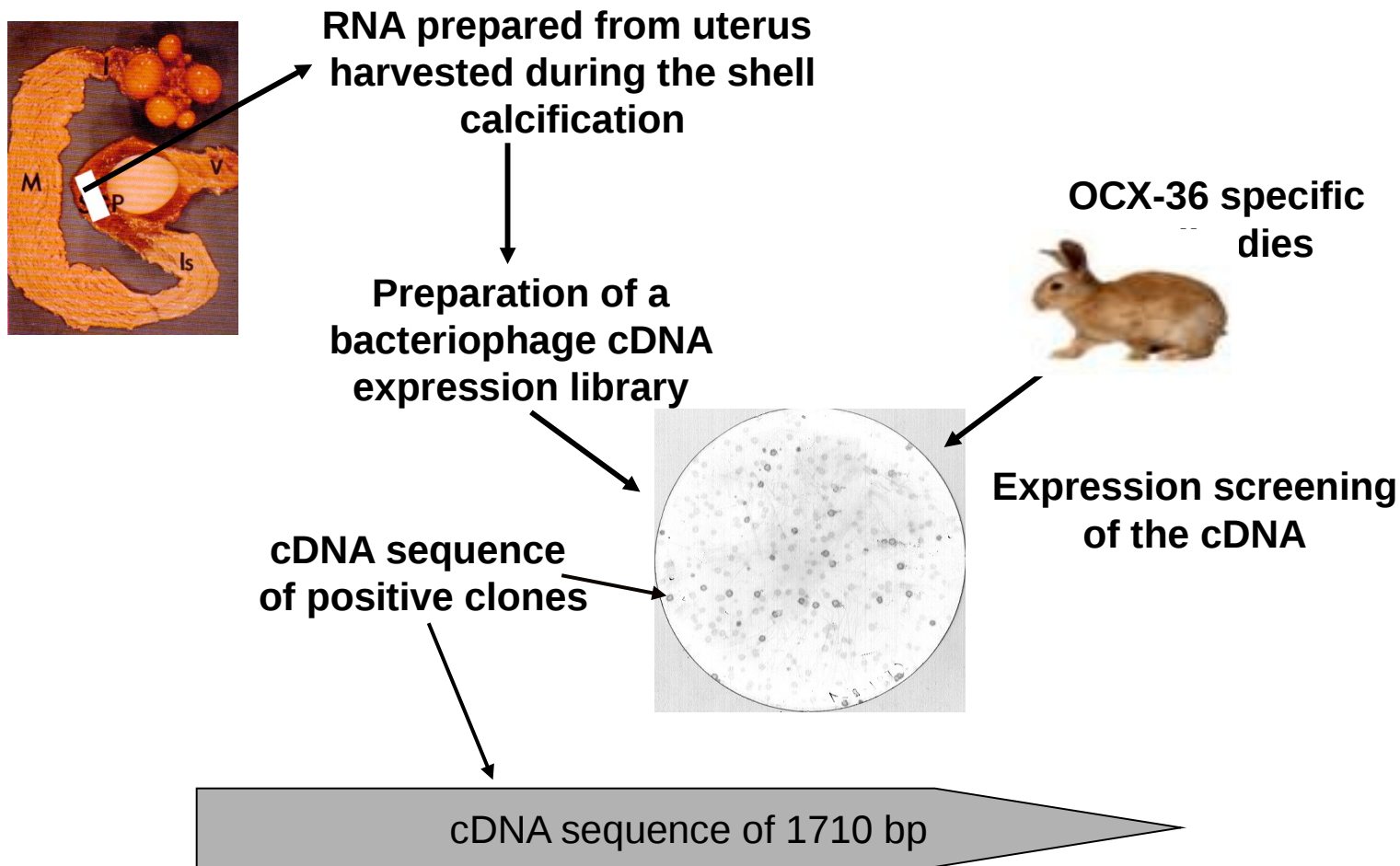
No correspondences in databases

Specific antibodies



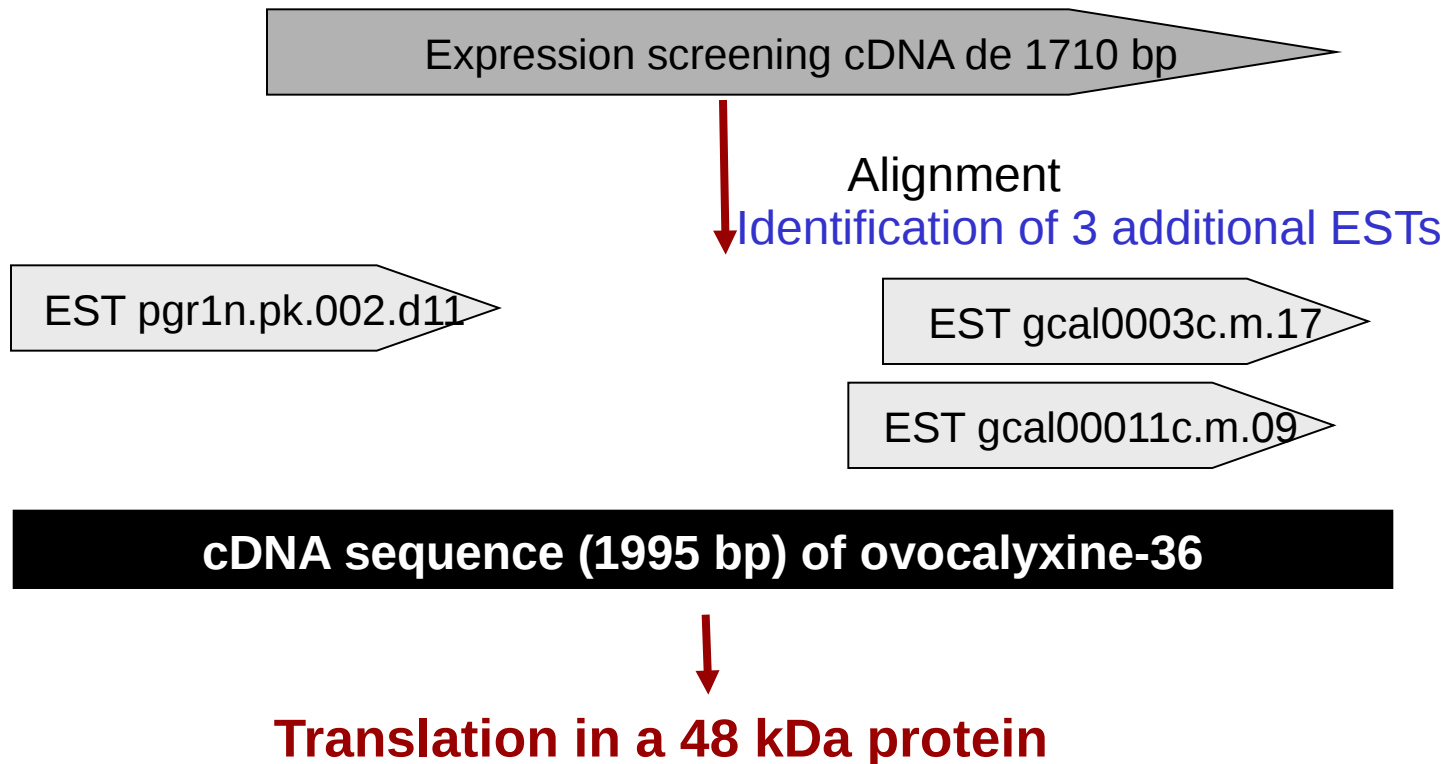
Utilisation combinée des banques cDNA, EST, génomique et des outils de bioinformatique

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

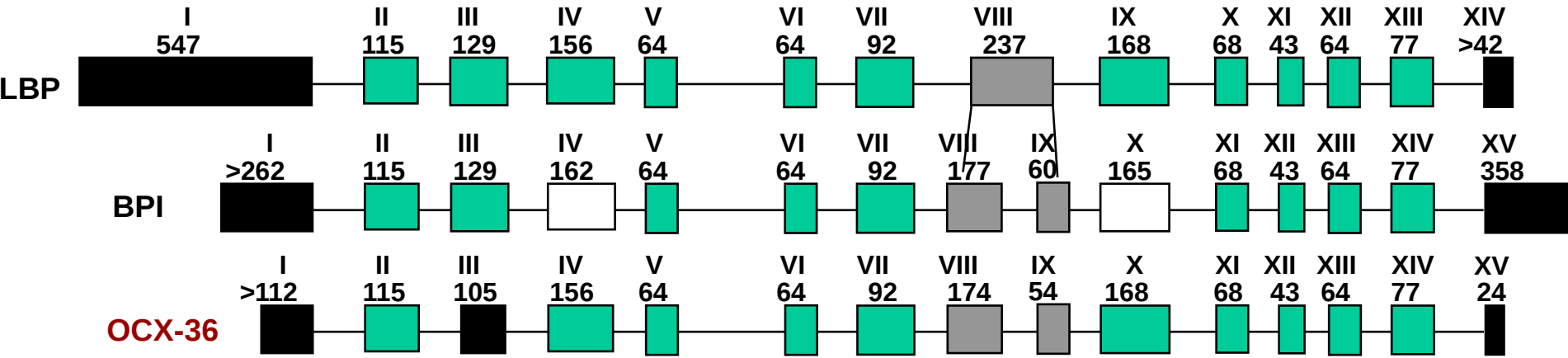
5' Séquence cDNA (1995 bp) de l'ARNm de l'Ovocalyxin-36 3'

Identification de la séquence génomique de l'Ovocalyxin-36
Chromosome 20
Position 141 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

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

Minireview

What Makes an Egg Unique? Clues from Evolutionary Scenarios of Egg-Specific Genes¹

Xin Tian,^{3,4,5,6} Joel Gautron,⁷ Philippe Monget,^{3,4,5,6} and Géraldine Pascal^{2,3,4,5,6}

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

Developmental and Comparative Immunology xxx (2010) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Developmental and Comparative Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dci

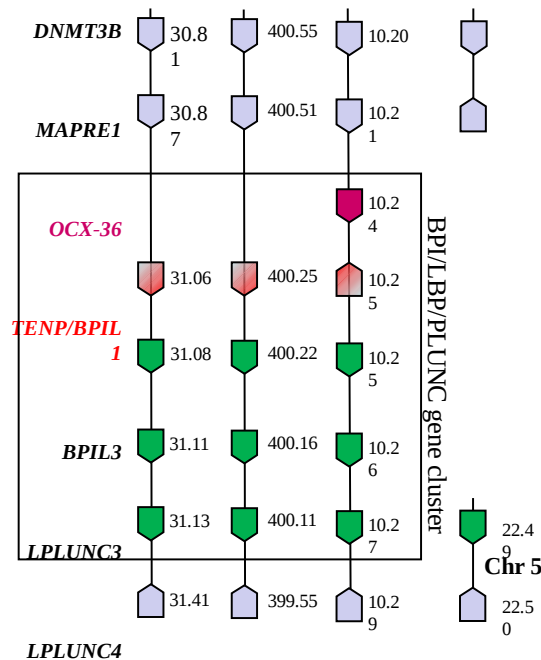


Identification and characterisation of the BPI/LBP/PLUNC-like gene repertoire in chickens reveals the absence of a LBP gene^{*}

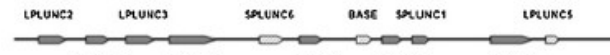
Shih-Chieh Chiang^{a,1}, Edwin J.A. Veldhuizen^b, Frances A. Barnes^a, C. Jeremy Craven^c,
Henk P. Haagsman^b, Colin D. Bingle^{a,*}

^a Academic Unit of Respiratory Medicine, Department of Infection and Immunity, University of Sheffield, Sheffield S10 2JF, UK
^b Department of Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, P.O. Box 80 165, 3508 TD Utrecht, The Netherlands
^c Krebs Institute for Biomolecular Research, Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, Sheffield S10 2TN, UK

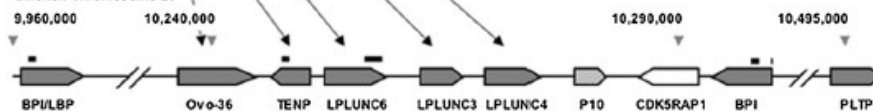
H. sapiens Chr 20
M. domestica Chr 1
G. Gallus Chr 20
O. latipes Ultra90



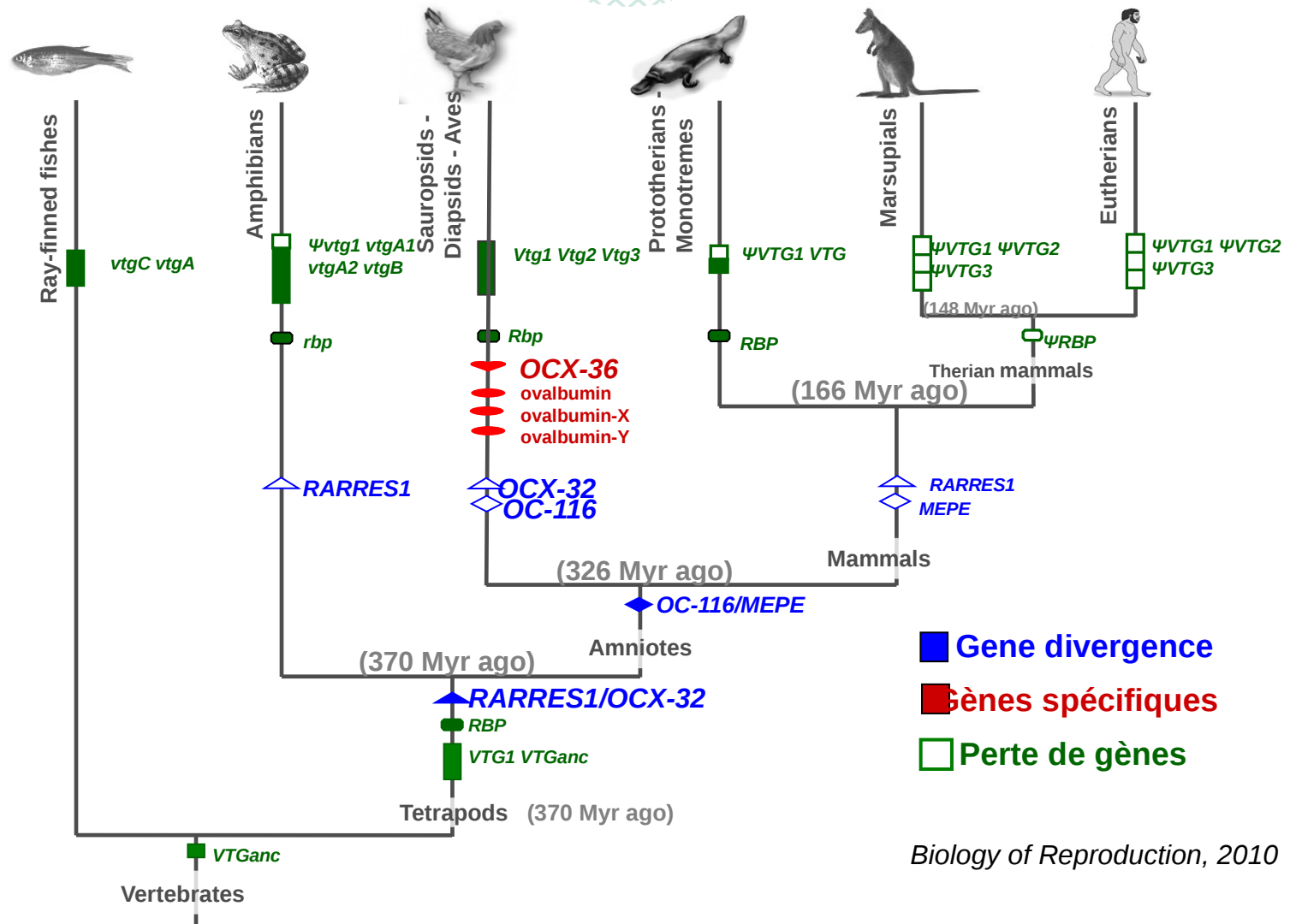
Human Chromosome 20



Chicken Chromosome 20



Evolution des gènes

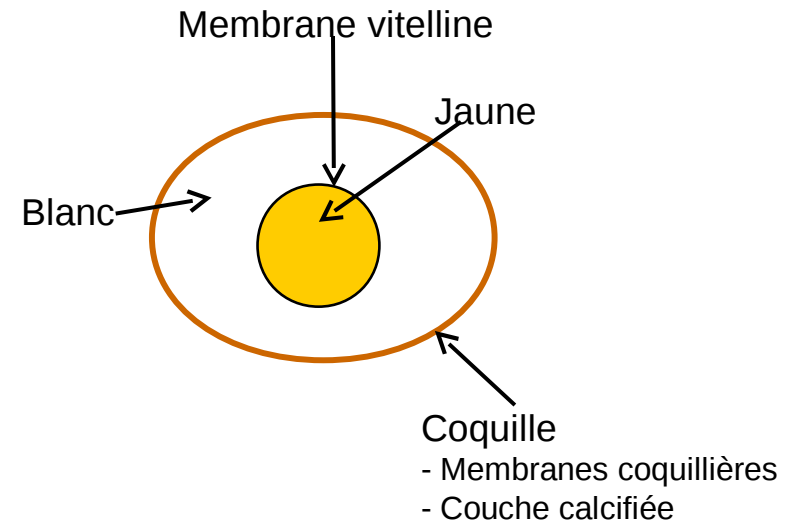
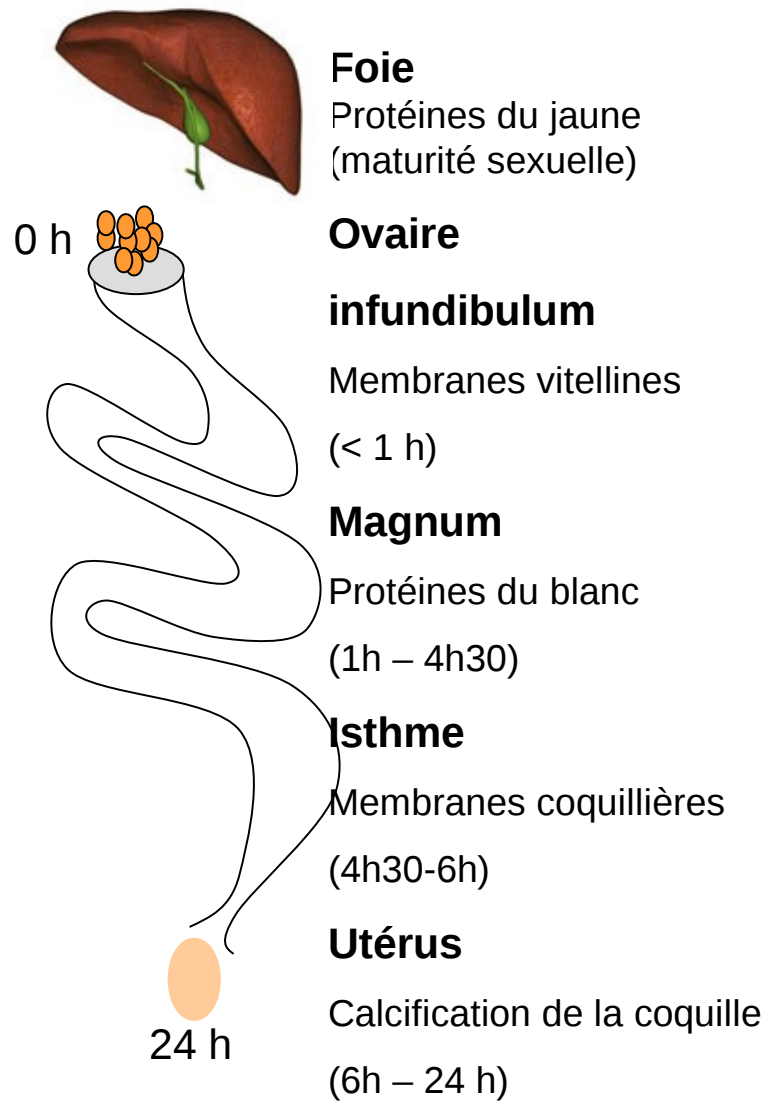


Biology of Reproduction, 2010

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
 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

La formation de l'œuf



Stratégie

→ **Formation de l'œuf**

→ **Analyse intégrative des activités biologiques des constituants de l'œuf**

Transcriptomique

Foie
Infundibulum
Magnum
Isthme
Utérus



Protéomique

Jaune
Membranes vitellines
Blanc
Coquille

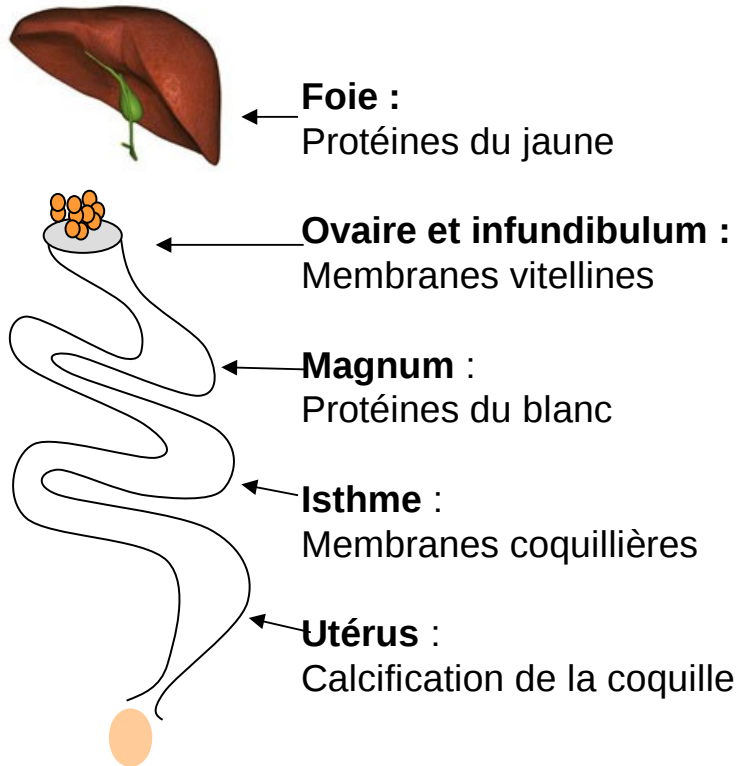


Analyse bioinformatique des séquences protéiques
(Homologie avec des protéines de mammifères, domaines conservés, réseaux d'interactions moléculaires, analyse intégrative des données de la littérature)

Etablir une liste de protéines fonctionnelles

Validation biologique et étude de leur potentiel de valorisation

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



Foie :
Protéines du jaune



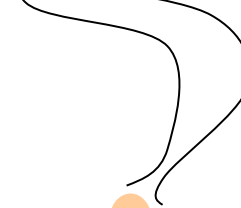
Ovaire et infundibulum :
Membranes vitellines



Magnum :
Protéines du blanc



Isthme :
Membranes coquillières



Utérus :
Calcification de la coquille

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


I- Foie (Jaune d'œuf)

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

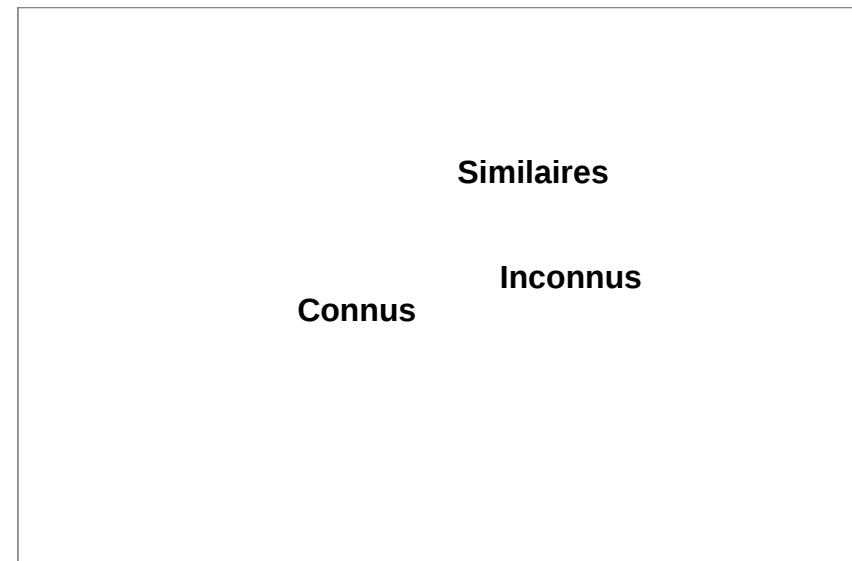
Marie Bourin, Joël Gautron, Magali Berges, Christelle Hennequet-Antier, Cédric Cabau, Yves Nys and Sophie Réhault-Godbert*



Les constituants du jaune ont pour origine le foie

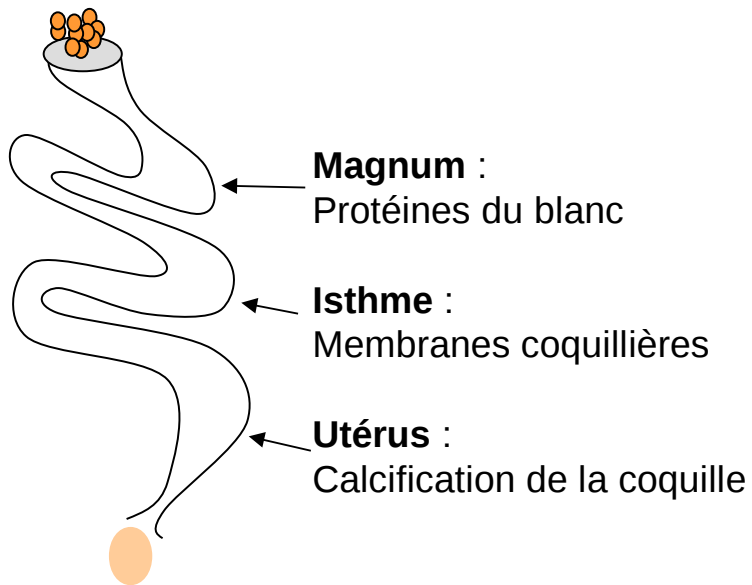
Comparaison de l'expression des gènes du foie avant maturité sexuelle (absence d'œuf) et après maturité sexuelle (dépôt de jaune).

➤ **582 transcrits surexprimés (ratio 1,3 à 65)**



La transcriptomique

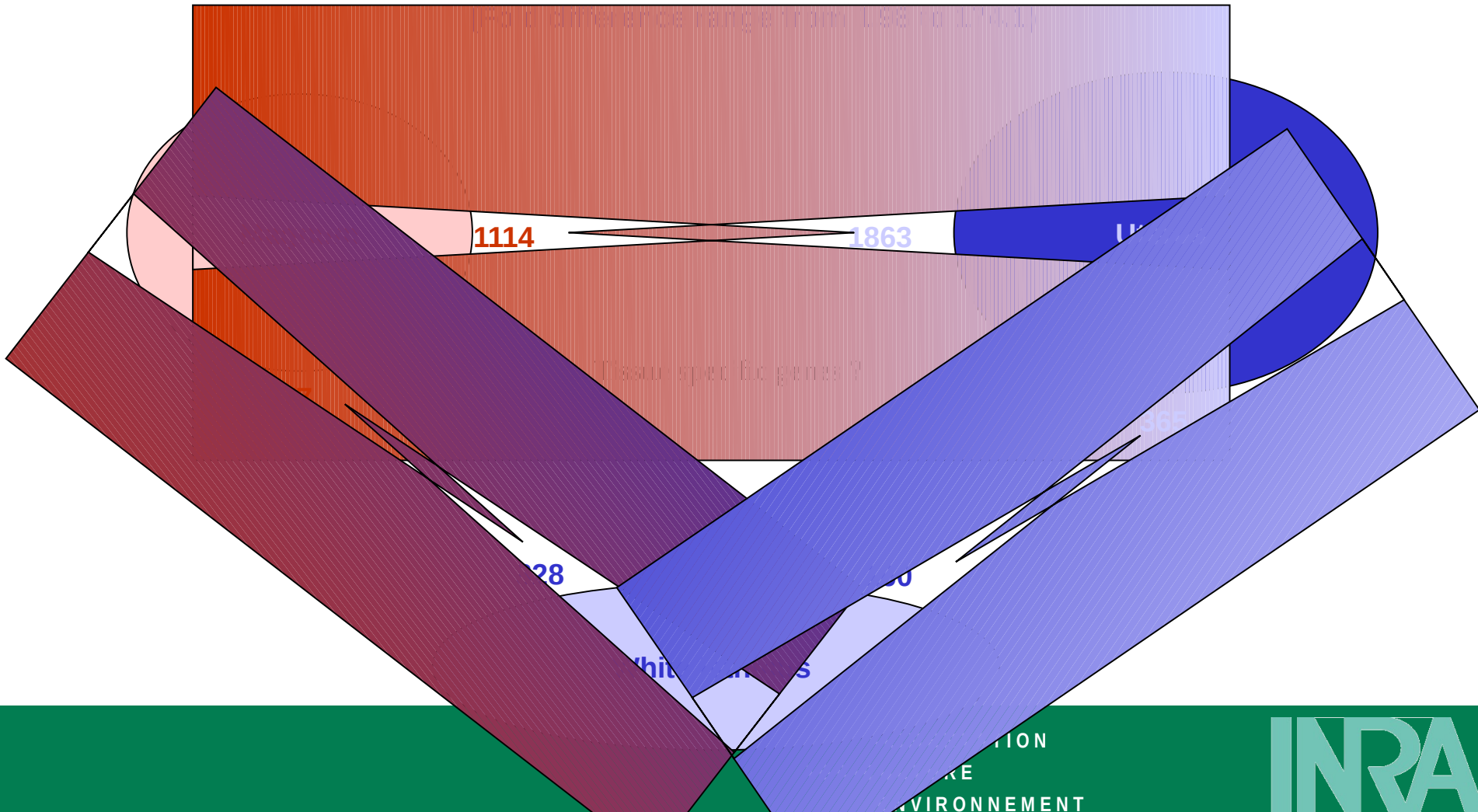
Identification des gènes spécifiquement impliqués dans la synthèse du blanc, des membranes coquillières et la calcification de la coquille



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

La transcriptomique

Several differentially expressed genes



La transcriptomique

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

Magnum

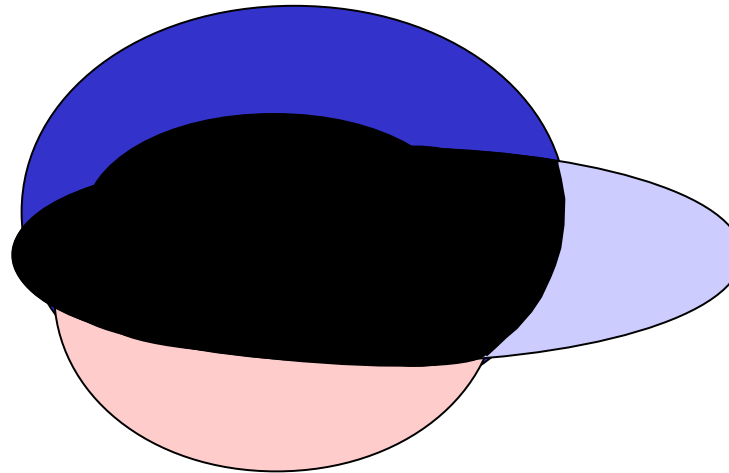
Uterus

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)

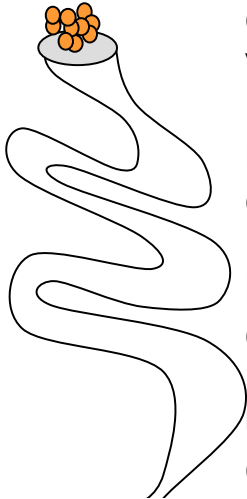
Uterus (eggshell calcification)

La transcriptomique

✓ Transcriptomics (microarrays, RNA-seq)



Liver: 582 ←
Egg yolk proteins (several weeks)



Ovary and infundibulum:
Vitelline membranes (less 1 h)

Magnum: 828 ←
egg white proteins (1 to 4 h 30)

Isthmus: 135 ←
eggshell membranes (4h30 to 6 h)

Uterus: 605 ←
eggshell calcification (6 to 24 h)

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



RESEARCH ARTICLE

Open Access

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

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

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

EggMeat symposia 2011 - Leipzig

Joël Gautron¹, Aurélien Brionne¹, Christelle Hennequet-Antier¹, Cédric Cabau¹, Nicolas Guyot¹, Larry Coghburn², Sophie Réhault-Godbert¹, Yves Nys¹

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

Jingwen Du^a, Maxwell Hincke^{a, d}, Aurelien Brionne^b, Christelle hennequet -Antier^b, Larry A. Coghburn^c, Yves Nys^b, Joel Gautron^b

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



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Hen uterine gene expression profiling during eggshell formation reveals putative proteins involved in the supply of minerals or in the shell mineralization process

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

Jonchère et al. *BMC Genomics* 2010, 11:57
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/57>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

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

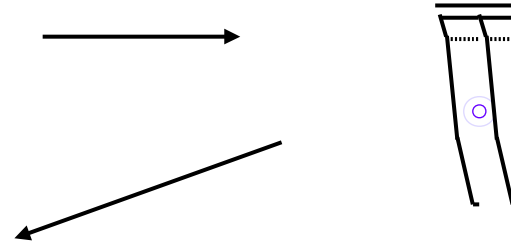
Vincent Jonchère¹, Sophie Réhault-Godbert¹, Christelle Hennequet-Antier¹, Cédric Cabau¹, Vonick Sibut^{1,3}, Larry A Coghburn², Yves Nys¹, Joel Gautron^{1*}

La protéomique

(Mass spectrometry-based methods for protein identification)

Digestion protéique (trypsine)

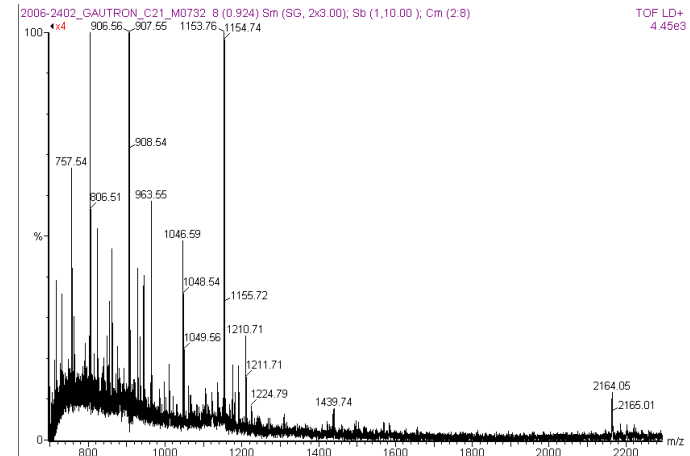
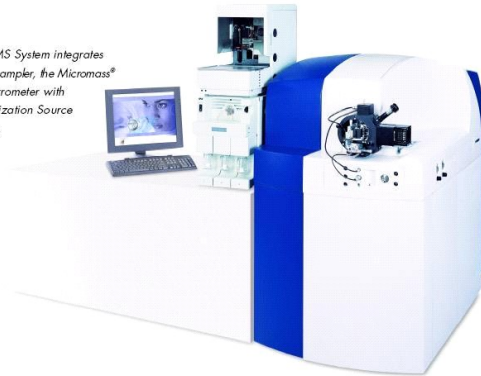
Séparation des protéines
(Chromatographie 2D, Electrophorèse 2D)



Fragments peptidiques des protéines



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 peptide

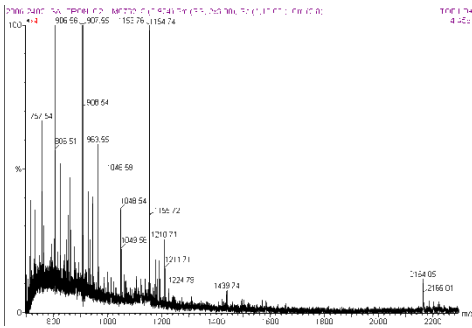
La protéomique

Séquences génomiques
Séquences cDNA et ESTs



Digestion *in Silico* des protéines

Masse virtuelle des peptides



Masse expérimentale des peptides

Comparaison

MEPSPLLLLLLLLLLAPCGRGWAVSGR**APAETARTDGR/SVLPEKDDFHPR**TDTDPTTNC
VNNCRDDGNCGRGSRKCCHIRCPFR**CPQVVPARPDTPK**KKKVPHIIGCCNSTCSSDADF
PNHLRCCQPMRRSSR**ITVALSLLGLGC**WWCSDPEKLCR**LIPEHR**LCRGRAYCYACIPAL
RSCR**VFVHSSCGGNANFR**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

The chicken egg yolk plasma and granule proteomes

Karlheinz Mann and Matthias Mann

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

RESEARCH ARTICLE

Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane

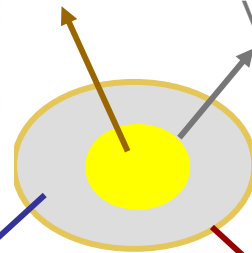
Karlheinz Mann

yolk

Vitelline membranes

egg white

shell



Proteomics 2006, 6, 3801–3810

DOI 10.1002/pmic.200600120

3801

RESEARCH ARTICLE

Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer

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

Pauline Marie^a, Valérie Labas^b, Aurélien Brionne^a, Grégoire Harichaux^b, Christelle Hennequet-Antier^a, Alejandro I

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

Pauline Marie^a, Valérie Labas^b, Aurélien Brionne^a, Grégoire Harichaux^b, Christelle Hennequet-Antier^a, Yves Nys^a, Joël Gautron^{a,*}

^aINRA, UR83 Recherches Avicoles, Fonction et Régulation des Protéines de l'œuf, F-37380 Nouzilly, France

^bINRA, 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



CrossMark



CrossMark

proteins

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

Journal of
research articles **proteome**
research
2008, 7, 3461–3474

Exploring the Chicken Egg White Proteome with Combinatorial Peptide Ligand Libraries

Chiara D'Ambrosio,[†] Simona Arena,[†] Andrea Scalonì,[†] Luc Guerrier,[†] Egisto Boschetti,[†] Martha Elena Mendeta,[§] Attilio Citterio,[§] and Pier Giorgio Righetti^{†,§}



ALIMENTATION

AGRICULTURE

ENVIRONNEMENT



« 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



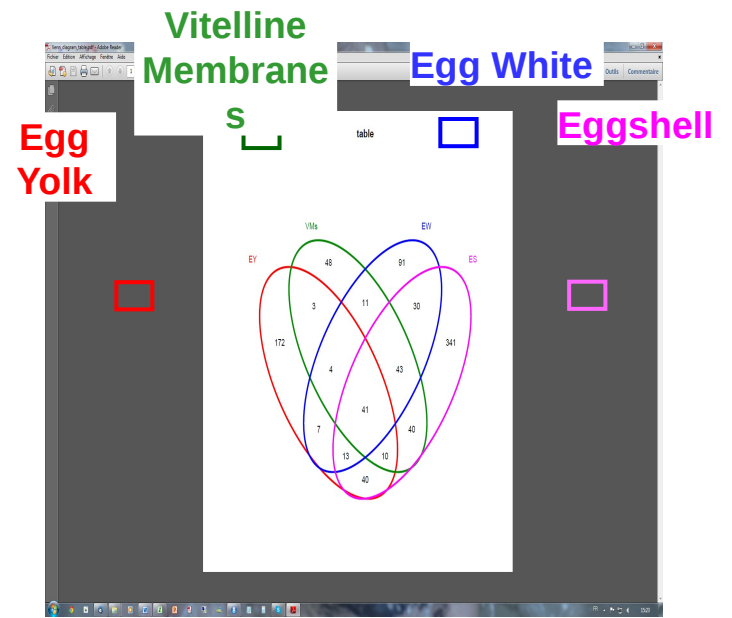
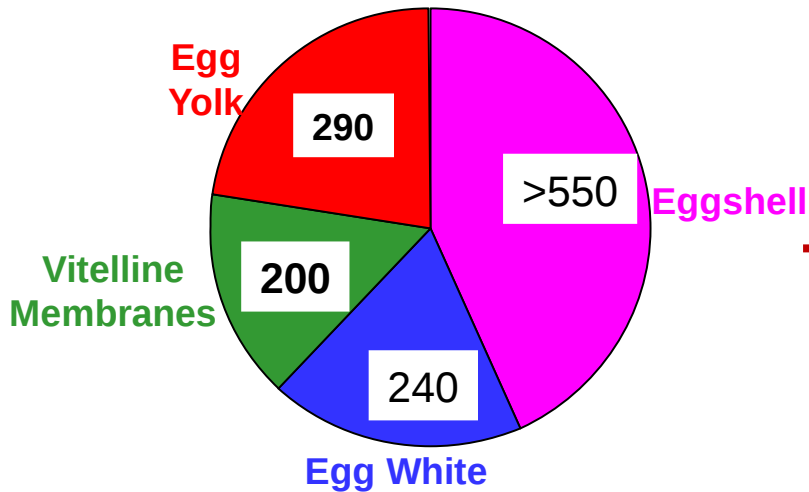
894 genes encode egg proteins

Protein variants and isoforms

1174 non redundant proteins in the egg

Common, shared and specific proteins

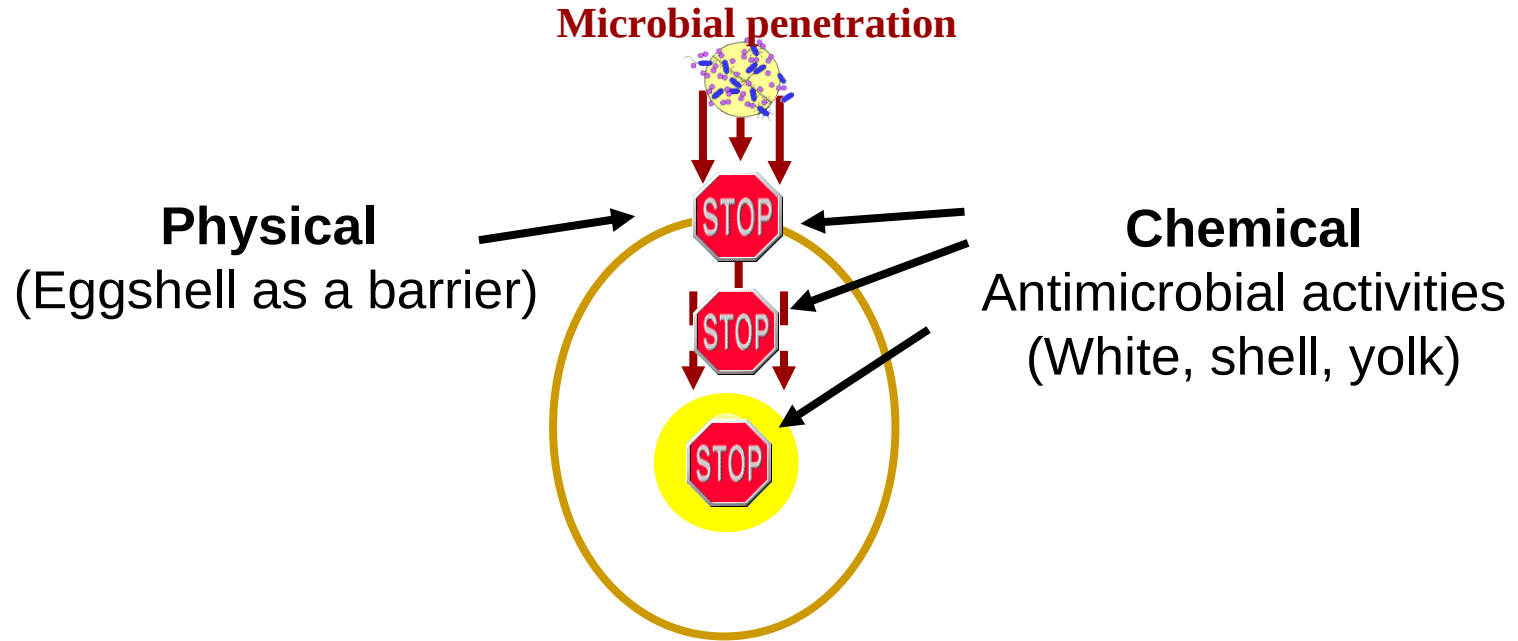
Repartition in egg compartments



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
 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

Egg defences



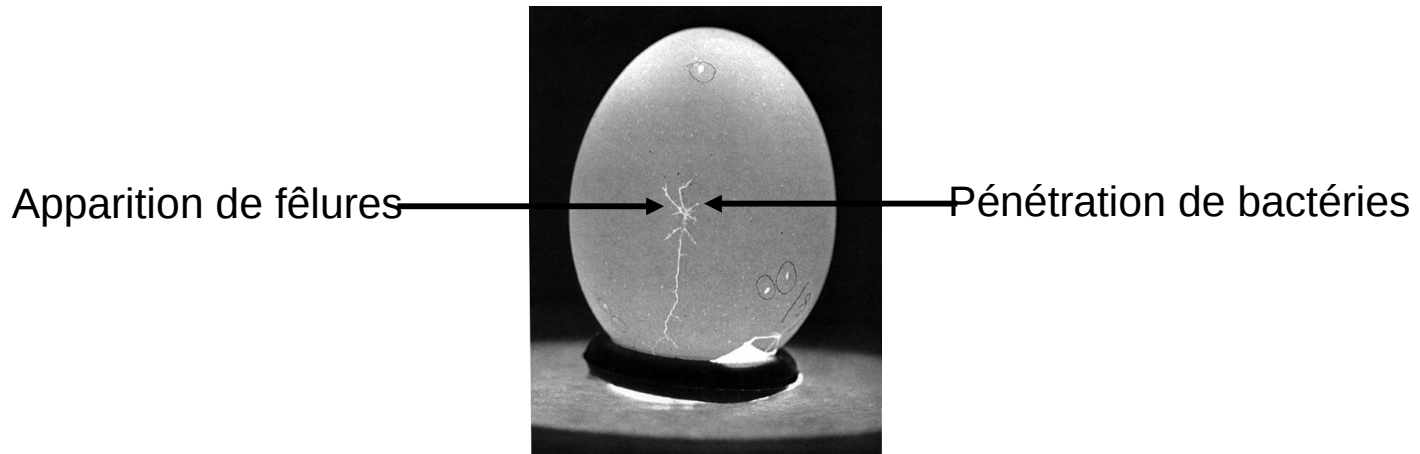
Microbial quality of eggs ?



Humans toxi-infections

La coquille : une barrière physique contre la pénétration bactérienne

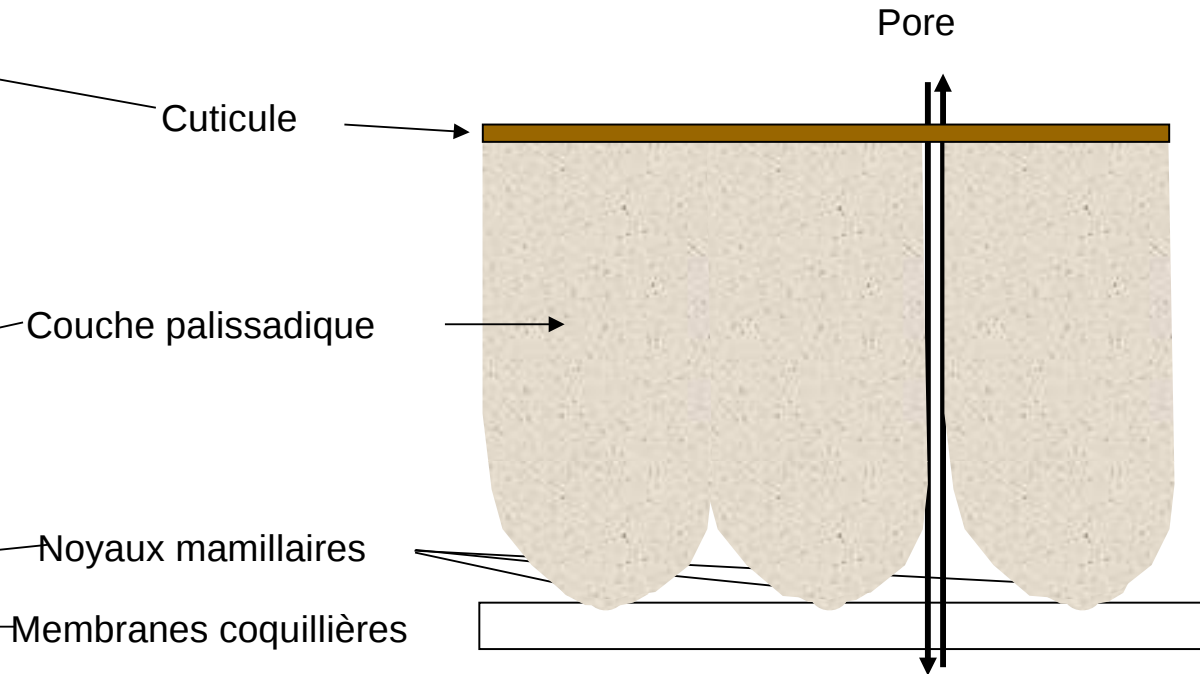
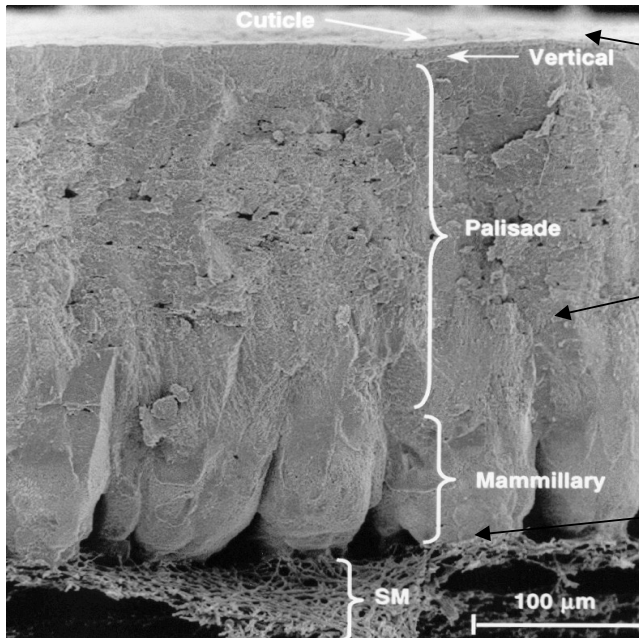
- L'intégrité de la coquille est cruciale pour la sécurité alimentaire du consommateur



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

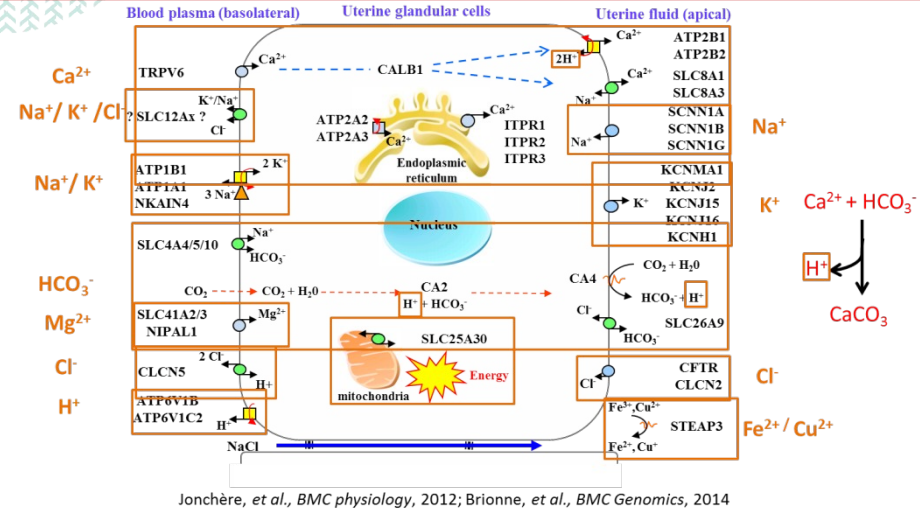
Développer de nouveaux outils pour la sélection

La coquille (défense physique)

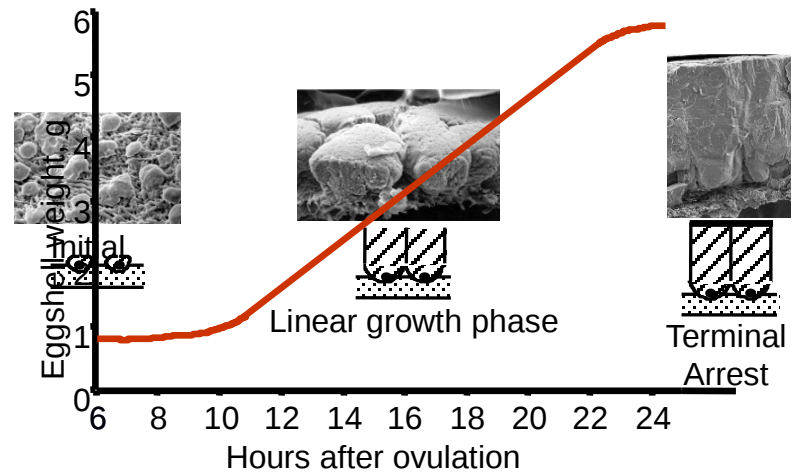


Eggshell biomineralization in uterus

Supply of minerals for shell mineralization



3 main phases in the uterine fluid (acellular milieu)



La Biominéralisation

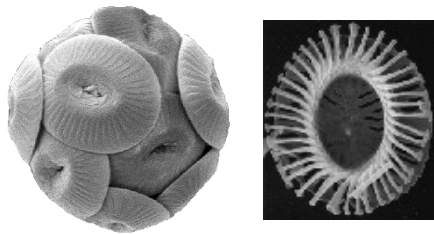
□ PROCESSUS UNIVERSEL ET CONSERVE SUR TERRE

* 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



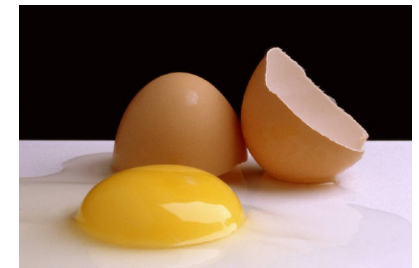
Perle



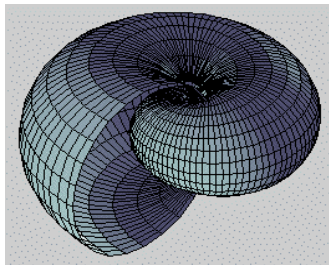
Coccolithes



Corail



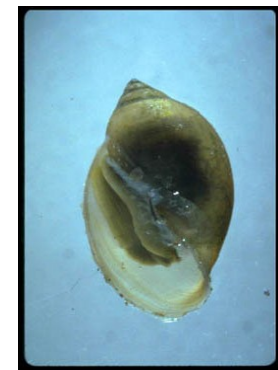
Coquilles d'oiseaux



Coquilles de mollusques



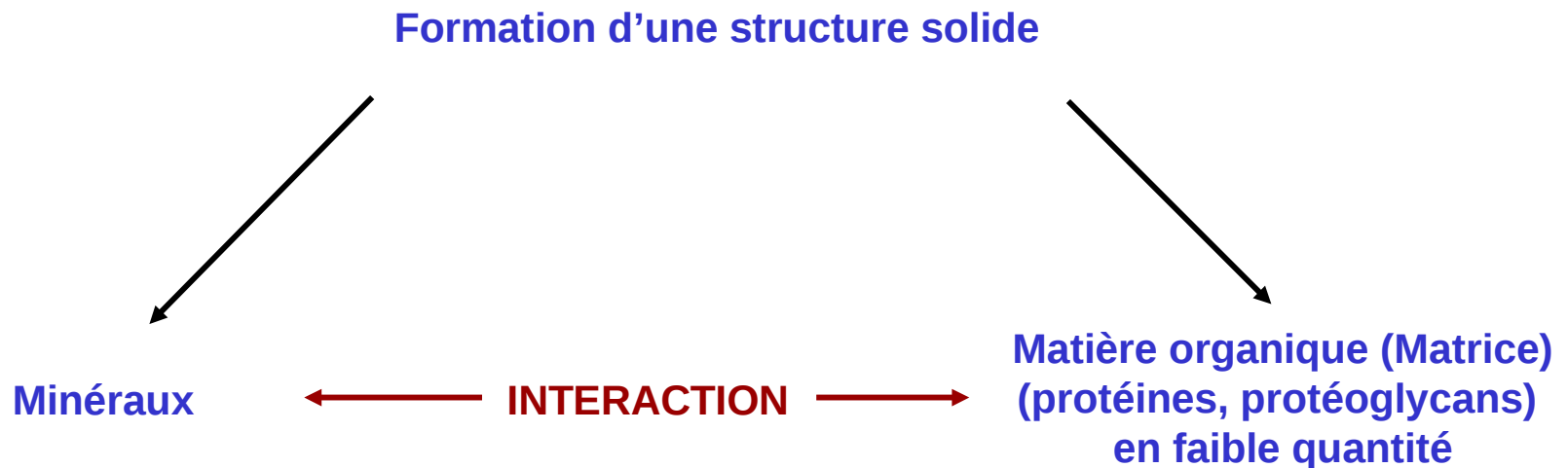
gastéropodes



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



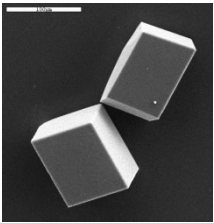
La Biominéralisation

□ PROCESSUS UNIVERSEL ET CONSERVE SUR TERRE

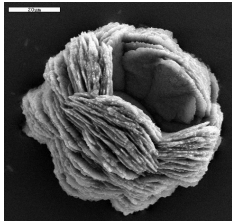
Malgré la diversité de formes et de fonctions, les structures biominérales se forment toujours selon les mêmes principes

□ 95% de carbonate de calcium sous forme de calcite

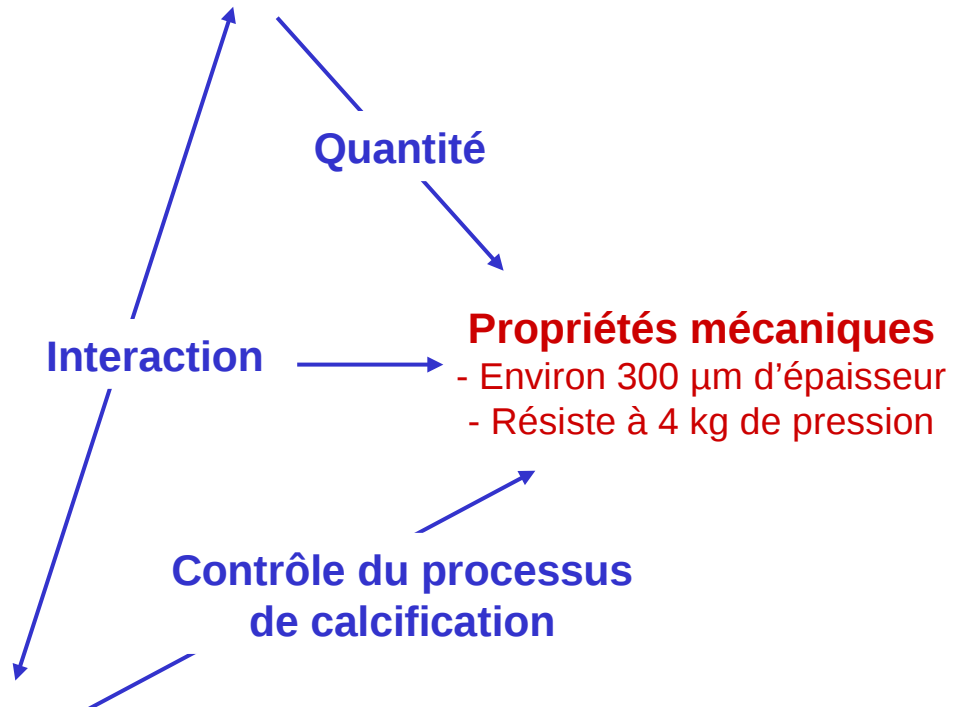
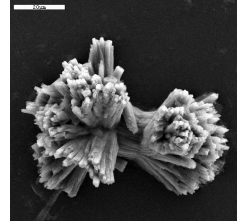
Calcite



Aragonite



Vatérite



□ 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

Définir un espace biologiquement compartimenté (utérus pour la poule)

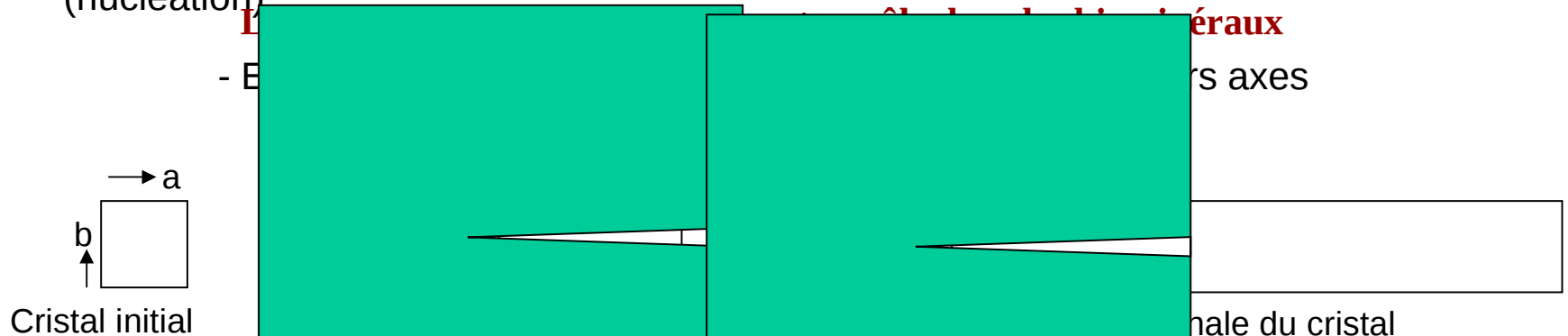
C'est dans cet espace que les entrées ioniques et organiques sont contrôlées pour atteindre les conditions physico-chimiques précises

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 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

Definir 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

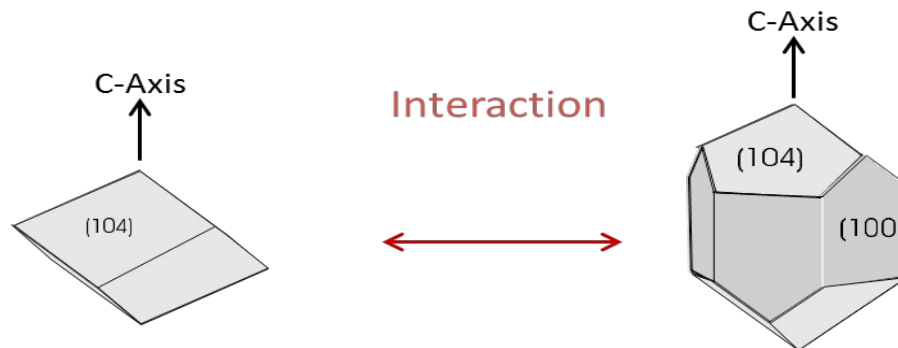
- Les ions constitutifs du minéral doivent se trouver en conditions saturantes

La nucléation et la croissance du minéral

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

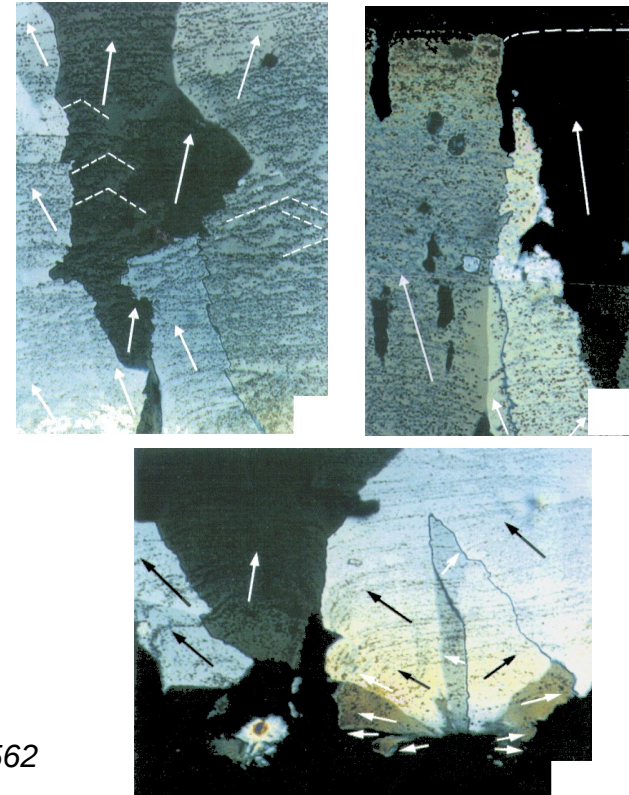
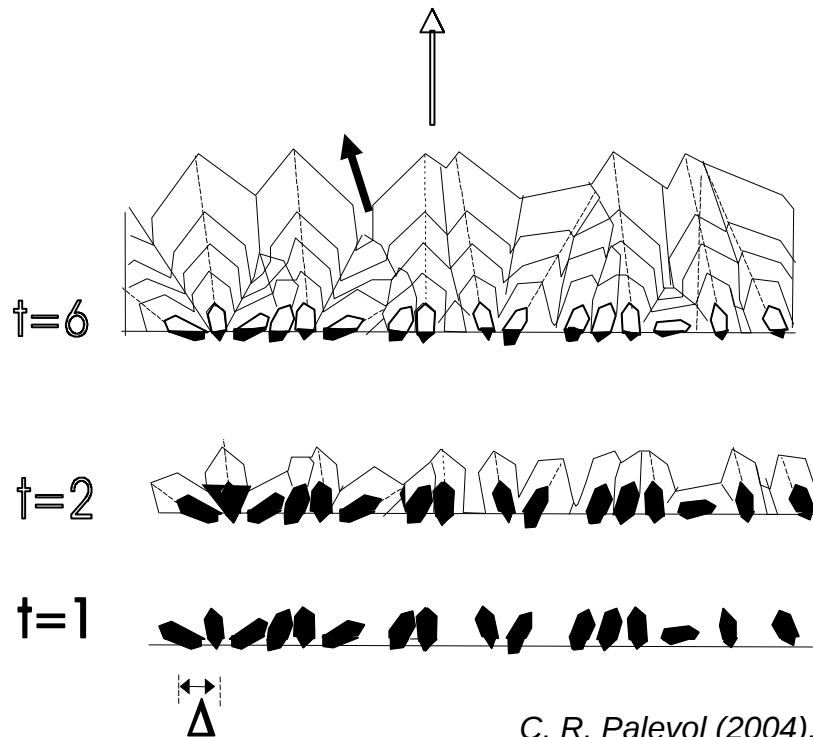
La matrice organique joue souvent ce rôle dans les biominéraux

- 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**

Eggshell matrix proteins

- › 11 eggshell proteins were identified in 2006
- › Major advances came recently

Eggshell matrix proteins

- ✓ More than 670 proteins
- ✓ More than 700 specific transcripts



Functions and biological activities of the eggshell proteins ?

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
proteins

Functions of eggshell matrix proteins

□ Proteins associated to shell mineralization process

- ✓ Proteins involved in the **biomineralization** of shell or other biominerals (bones, molluscan...)
 - *Ovocleidins, ovocalyxins, lysozyme, ovotransferrin, DMP4*
- ✓ **Calcium binding proteins (CaBPs)** interact with calcium to favour crystal nucleation or drive the morphology of crystals
 - Identification of numerous novel CaBPs
 - Numerous proteins with EF-hand and EGF-like calcium binding domains are present in the shell*
- ✓ **Proteoglycans** et proteoglycan binding proteins
 - proteoglycans have a negative charge to attract Ca²⁺ ions
- ✓ **Eggshell membranes** proteins
 - Collagens and collagens-like proteins, CREMP...

Functions of eggshell matrix proteins

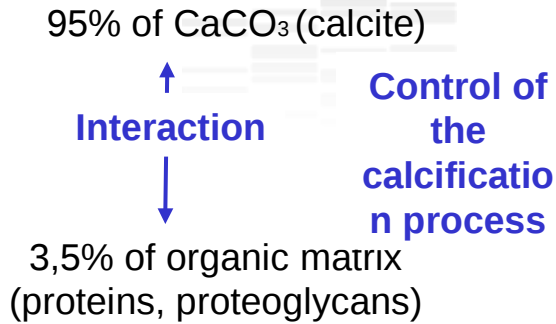
- **Proteins involved in the regulation of activity of proteins driving mineralisation**
 - ✓ Proteins involved in the **proper folding of the eggshell matrix**
 - *An appropriate conformation of proteins is required to ensure calcium and mineral interactions and to ensure template to the mineralized structure*
 - *Molecular chaperone*
 - *Protein assisting folding*
 - *Proteins with interactive properties related to proteoglycans*
 - ✓ **Regulation of the activity of proteins** related to the shell deposit
 - *Shell mineralisation occurs in a non cellular milieu*
 - *Direct action of proteins to inhibit or activate the molecular actors present in the milieu.*
 - *Molecular chaperone interact with proteins driving mineralisation*
 - *Proteases and protease inhibitors (specific and controlled role during calcification process, either by degrading proteins or regulating processing of proteins into their mature forms)*
 - ✓ Mineralisation depends of the **degree of protein phosphorylation** (Osteopontin, Hincke et al.)
 - *Kinases*
 - *Phosphatases*

Functions of eggshell matrix proteins

- Antimicrobial proteins

Presence of numerous antimicrobial proteins to keep the egg sterile

Eggshell biomineralization



Global and non hierarchical approaches

- ✓ More than 670 proteins
- ✓ More than 700 specific transcripts

Only a few numbers are abundant and active on calcification process

Determine the molecular actors with a pivotal role during the mineralisation process



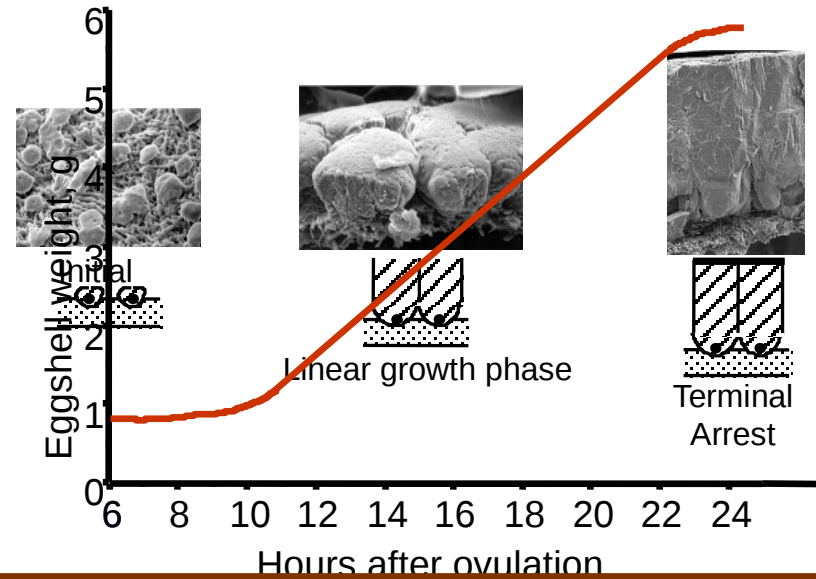
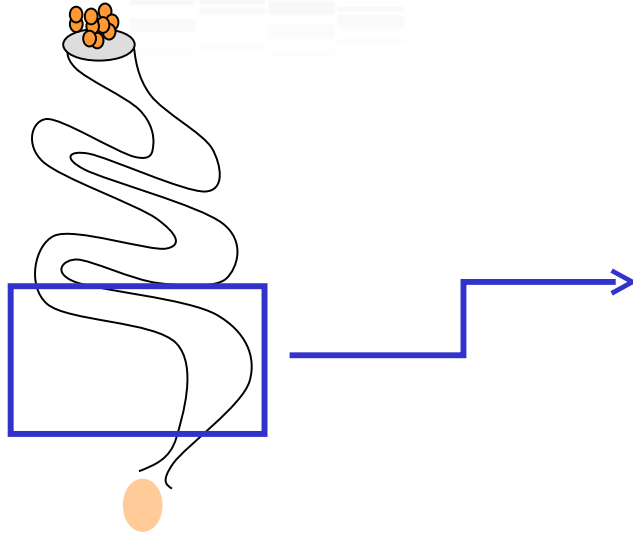
Identify eggshell matrix proteins and their variation at key points of shell calcification process

Proteomics

RNA-Seq

Eggshell Biomineralisation in uterus

3 main phases in the uterine fluid



Identify and quantify proteins involved in each particular phase

Establish a list of the most relevant proteins at different time points of mineralisation

Identification and quantification of uterine fluid proteins

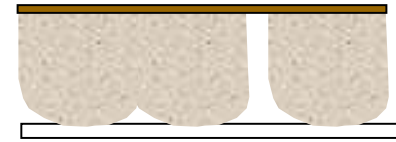
Uterine fluid sampled at the three stages of eggshell calcification



Initial (7 hours p.o.)



Growth (14 hours p.o.)



Terminal (22 hours p.o.)

Identification and quantification of uterine fluid proteins
at the three stages (mass spectrometry)

Statistical analysis at the three stages

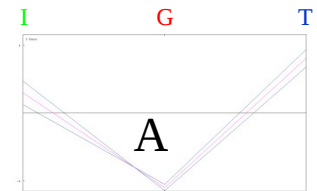
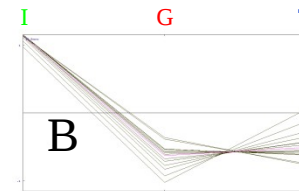
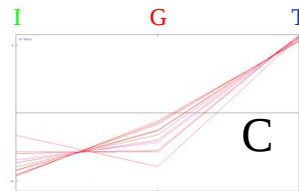
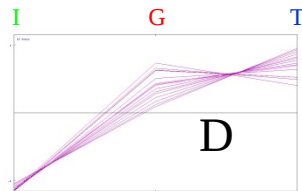
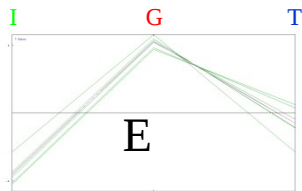
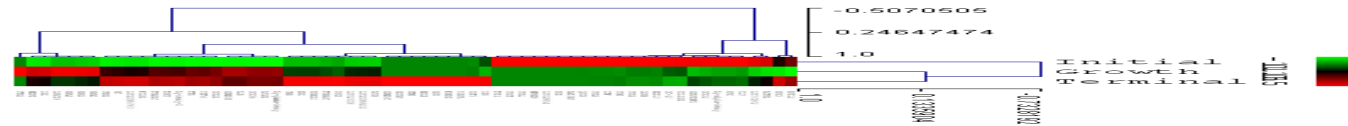
In silico functional analysis of identified proteins

Identification and quantification of uterine fluid proteins

96 proteins were quantified at the 3 stages of shell calcification (I, G, T)

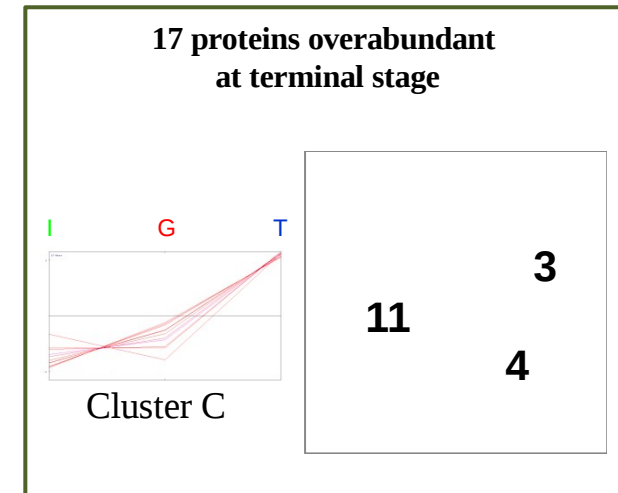
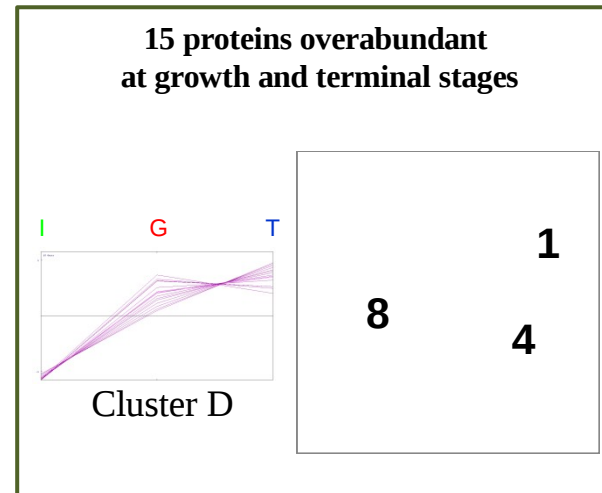
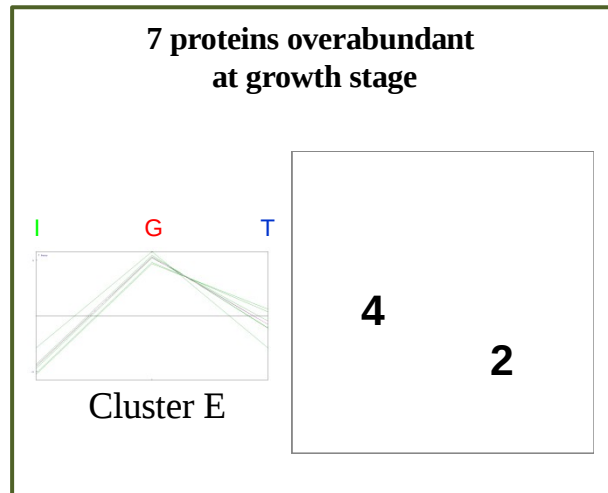
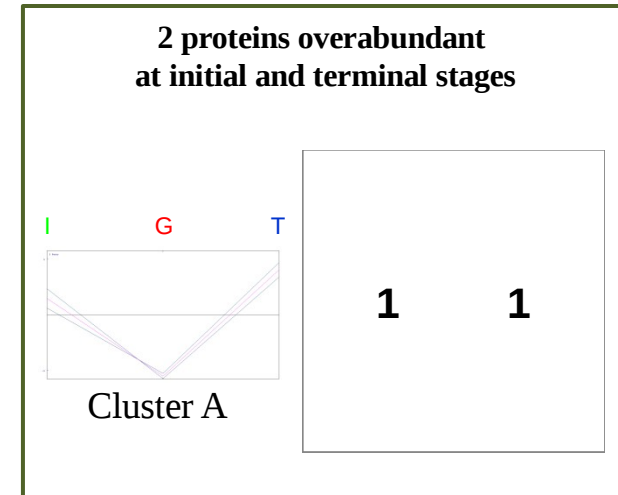
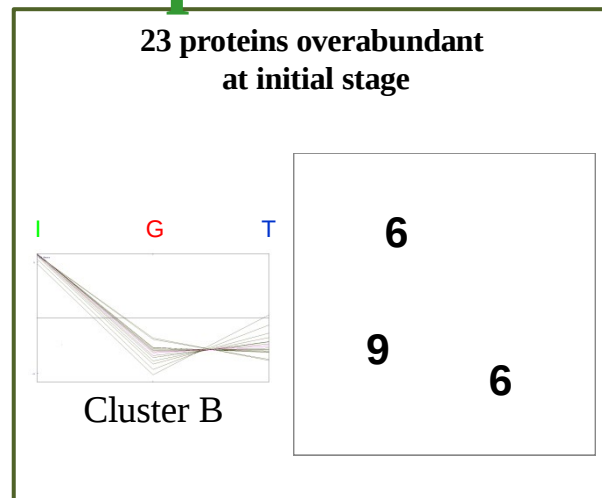
Protein classification according to their abundance

- Hierarchical cluster analysis
- 5 groups



Identification and quantification of uterine fluid proteins

- Proteins associated to mineralisation
- Proteins involved in the regulation of activity of proteins driving mineralisation
- Antimicrobial proteins
- Others or unknown roles



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

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



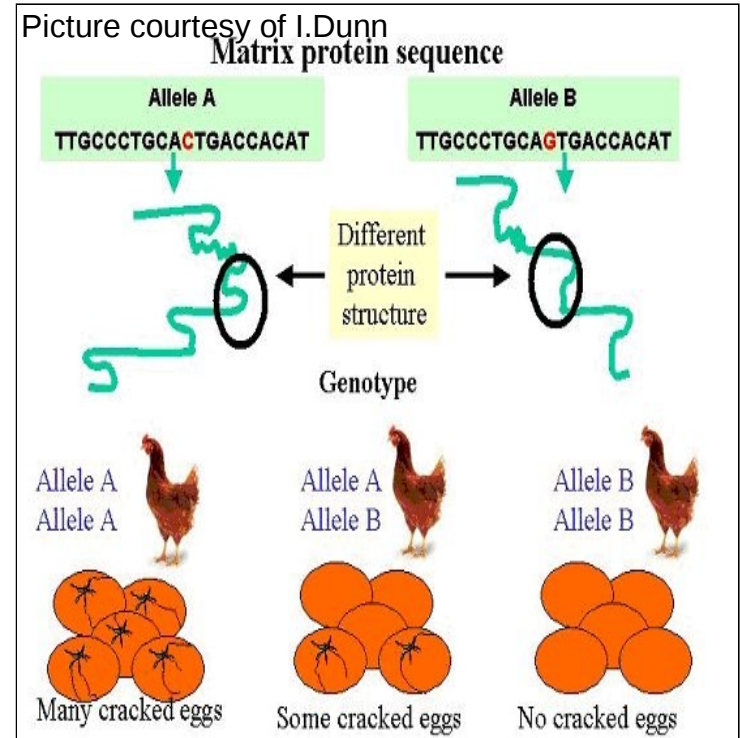
Ian Dunn, Maureen Bain
Roslin Institute, University of Glasgow

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 assistée par marqueurs (MAS)

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



Optimisation 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

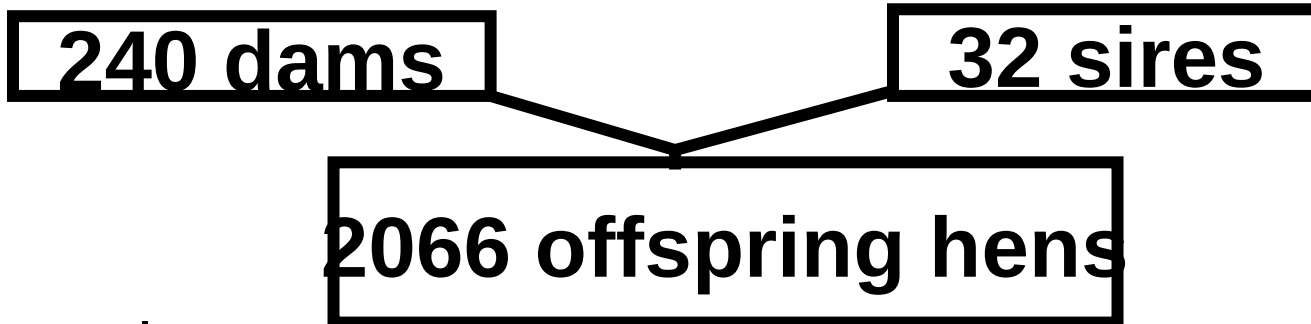


Ian Dunn, Maureen Bain
Roslin Institute, University of Glasgow



Sélection assistée par marqueurs (MAS)

- * Sélectionner des gènes candidats
- * Identifier des marqueurs génétiques (e.g. Single nucleotide polymorphism)



Optimisation 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



Sélection assistée par marqueurs (MAS)

- * Sélectionner des gènes candidats
- * Identifier des marqueurs génétiques (e.g. Single nucleotide polymorphism)

Gene	position	From (bp)	To (bp)	Potential SNPs	Number of polymorphisms detected and verified	Number genotyped	Position	Effect	Frequency %
Ovalbumin	chr2:	67443891	67449174	7	2 (linked)	1	3' untranslated		63
Ovotransferrin	chr9:	9002347	9010408	17	2 (linked)	1	Coding exon	synonomous	83
Ovocalyxin 32	chr9:	21894117	21901605	8	2	2	Coding exon	Non-synonomous	75
							Intron		76
Ovocleidin 116	chr4:	46253588	46257102	4	2	2	Promoter		62
							Exon	Non-synonomous	69
Osteopontin	chr4:	46242099	46245071	23	3 (linked)	1	Promoter/introns	none	64
Ovocalyxin 36	chr20:	9812283	9844646	14	4	1	Intron/exon	synonomous	61
Ovocalyxin 21	chr22:	258000	261000	0					

Optimisation 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



Sélection assistée par marqueurs (MAS)

- * Sélectionner des gènes candidats
- * Identifier des marqueurs génétiques (e.g. Single nucleotide polymorphism)
- * Recueillir des données phénotypiques

240 dams

32 sires

2066 offspring hens

Phenotypes mesurés :

Breaking strength, Static stiffness, Acoustic resonance, Elastic modulus, Fracture toughness
Total thickness, Effective thickness, Mammillary thickness

- * Association analysis of genotype and phenotype

Optimisation 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



Sélection assistée par marqueurs (MAS)

Approche gènes candidats

(Environ 16000 génotypages pour 8 gènes et 2066 descendants)

Tests d'association	P value
<i>Ovocleidin-116</i> Module élastique	P= 0.0004
<i>Ovocalyxin 32</i> Déformation à la fracture	P= 0.006
<i>Ovocalyxin 32</i> 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

Egg antimicrobial proteins (chemical defence)



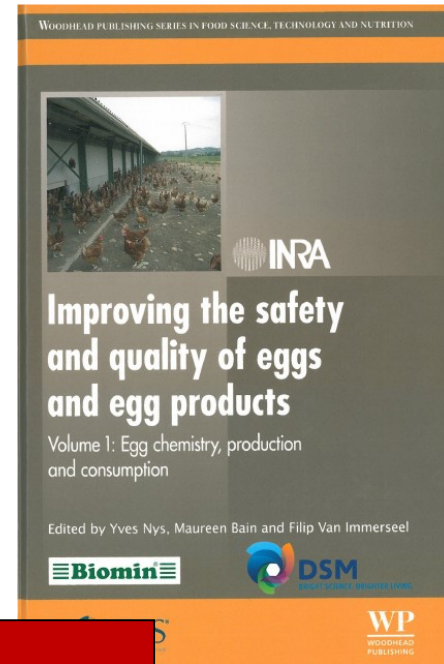
Analyse bioinformatique des protéines antimicrobiennes

9

Molécules impliquées dans la défense chimique de l'œuf de poule

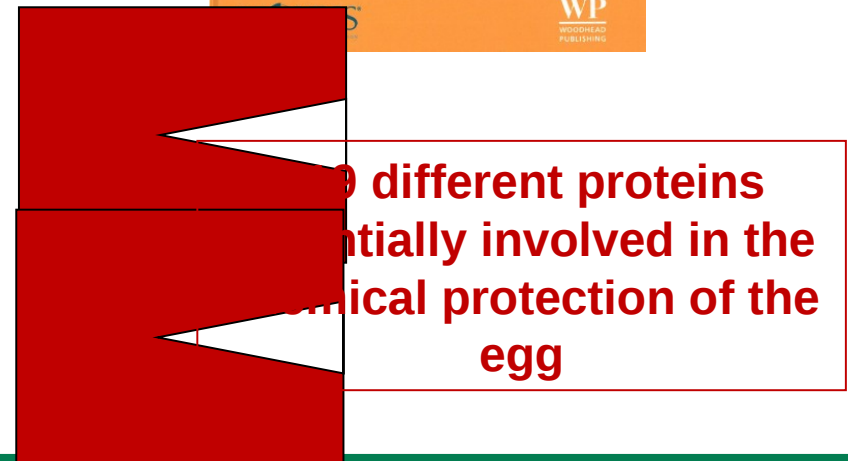
S. Réhault-Godbert, V. Hervé-Grépinet, J. Gautron, C. Cabau and Y. Nys, Institut National de la Recherche Agronomique, France and M. Hincke, University of Ottawa, Canada

- Examen des séquences de protéines de l'œuf pour des domaines spécifiques liés à la défense moléculaire
- Identification de 142 molécules qui pourraient potentiellement dégrader des composants microbiens

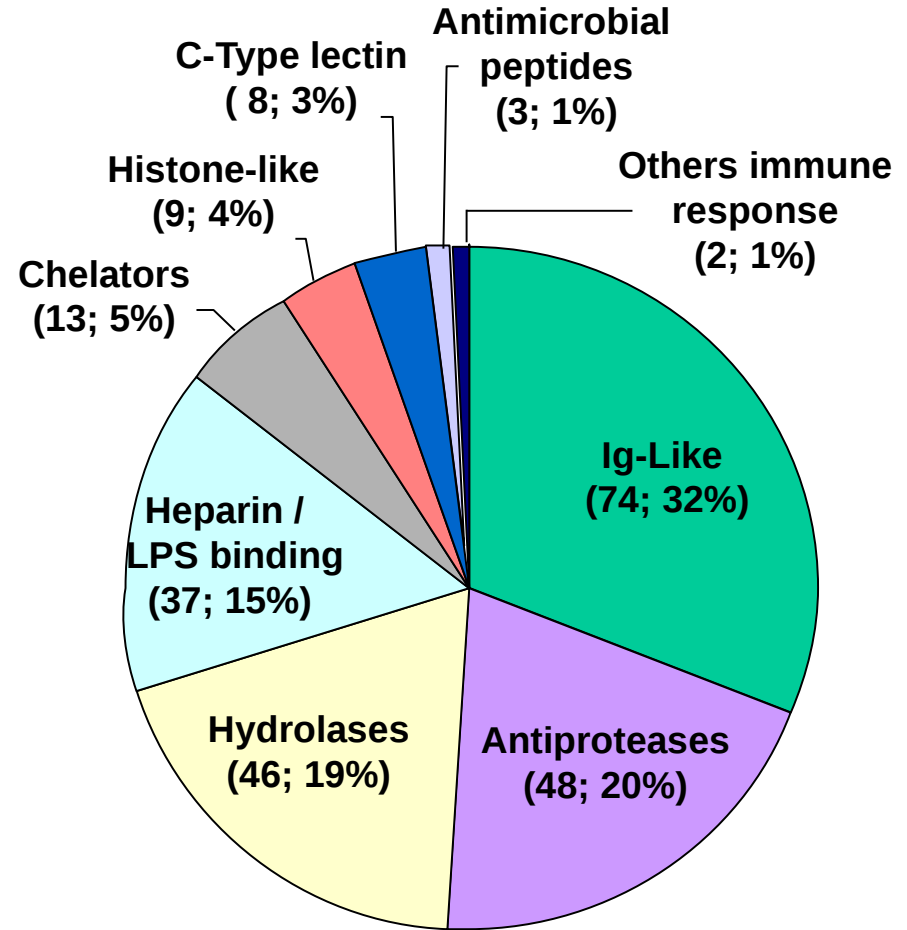
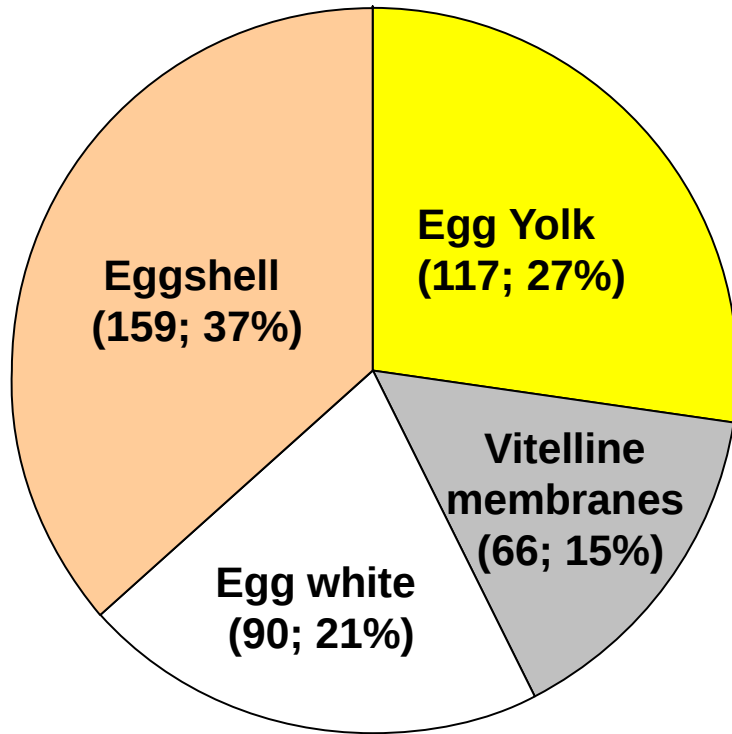


Use of InterPro domains and signature
149 fonctionnels domaines groupés en 9 familles

Use of the most recent egg protein inventory
1174 séquences protéiques



Egg antimicrobial proteins (chemical defence)



Egg antimicrobial proteins (chemical defence)



Immunoglobulins superfamily (74

in egg) Immunoglobulins

Yolk IgY most predominant in egg (>1mg/ml). Also IgM and IgA in yolk (20 µg/ml).

IgY, IgM and IgA in egg white (10 µg/ml). Evidences for IgD and IgE.

Proteins with Ig-like Domains

Widespread domain. Ig fold : antiparallel b-strands arranged into two sheets linked by a disulfide bond

Various tissue distribution.

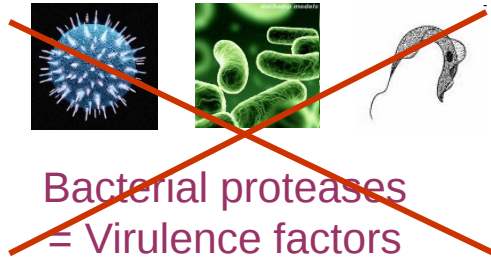
Protein name	Localization
CEPU- α alpha 2 isoform	EW, VM, ES
CEPU-1	EW, VM, ES
Protein CEPU-1	ES
Neogenin	ES
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	ES
Neuroplastin	Ut
Pro-neuregulin-1, membrane-bound isoform	EW
Semaphorin-3C	VM, ES
Muscle, skeletal receptor tyrosine protein kinase	EW
Butyrophilin subfamily 1 member A1	Ut
Basigin	ES
VH1 protein	ES
ICOSligand	Ut
Beta-2-microglobulin (I β)	ES, Ut
T-cell surface glycoprotein CD1b4	EW

Egg antimicrobial proteins (chemical defence)



Protease inhibitors

·Highly represented in egg (48)



~~Bacterial proteases
= Virulence factors~~

Inactivation/hydrolysis of host proteins

Characterization of Ovoinhibitor

JOURNAL OF
**AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY** | *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 12368–12374 pubs.acs.org/JAFC **ARTICLE**

Antimicrobial Potential of Egg Yolk Ovoinhibitor, a Multidomain Kazal-like Inhibitor of Chicken Egg

Marie Bourin,^{*,†} Joël Gautron,[†] Magali Berges,[†] Sylvie Attucci,[§] Gwenaelle Le Blay,[¶] Valérie Labas,[△] Yves Nys,[†] and Sophie Rehaalt-Godbert^{*,†}

Antimicrobial activity

Activity against *Bacillus thuringiensis*

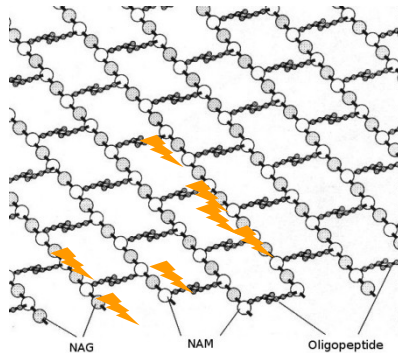
Egg antimicrobial proteins (chemical defence)



Hydrolases (46 egg proteins)

Lysozyme

Similar to acyloxyhydrolase (Egg white)
Hydrolyze bacterial peptidoglycan

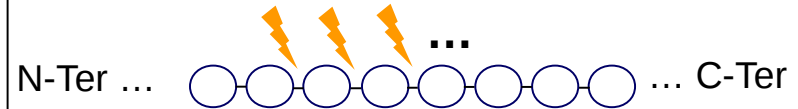


Food preservative E1105 (Cheese, wine...)

Tablets for pain and inflammation of sore thro



Proteases



Several proteases in eggs

Antimicrobial activities already demonstrated in other species. No experimental evidences for chickens

Direct action (Degradation of antimicrobial proteins)

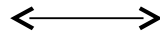
Indirect action (Activation of antimicrobial precursors, production of antimicrobial peptides)

Egg antimicrobial proteins (chemical defence)



Heparin and Lipopolysaccharide binding proteins

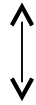
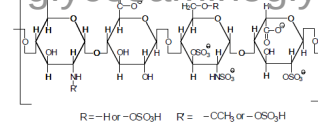
Heparin-binding proteins
Cluster (s) of exposed
positives charges



proteins

Heparin

Negatively charged
glycosaminoglycan



Other negatively charged surfaces

Bacterial lipopolysaccharide
Peptidoglycan

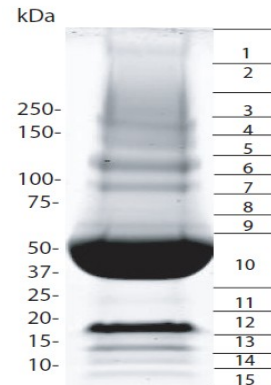
Eur. J. Biochem. 271, 1218-1226 (2004) © FEBS 2004

doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04035.x

Antimicrobial activities of heparin-binding peptides

Emma Andersson¹, Victoria Rydengård¹, Andreas Sonesson¹, Matthias Mörgelin², Lars Björck²
and Artur Schmidtchen¹

Heparin-binding proteins from egg



✓15 proteins identified
✓5 new antimicrobial candidates

Rehault-Godbert, S. et al. (2011). *Patent "Fraction of proteins and peptides derived from egg white and protein derived from egg white and use thereof as antilisteria agents."* WO 2011/151407 A1.

Egg antimicrobial proteins (chemical defence)



Heparin and Lipopolysaccharide binding proteins

Ovalbumin-related protein X (*Réhault-Godbert et al. 2013*)

Table 1 Minimal Active Concentration (MAC) of purified OVAX, Ovalbumin and Av-BD11 (positive control)

Bacterial group, strains	MAC (μM) \pm std		
	AvBD11	Ovalbumin	OVAX
<i>L. monocytogenes</i> (Gram +)	0.58 ± 0.36	> 28	2.31 ± 0.00
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076 (Gram -)	0.50 ± 0.20	> 51	10.04 ± 0.02
<i>S. aureus</i> ATCC 29740 (Gram +)	7.73	> 37	> 37
<i>E. Coli</i> ATCC 25922 (Gram -)	1.6	> 37	> 37

MAC, Minimum Active Concentration (corresponding to a 0.5 mm-clear zone)

Egg antimicrobial proteins (chemical defence)



Heparin and Lipopolysaccharide binding

Lipopolysac proteins

(BPI) proteins

of inflammation upon infection etc.)

➢ Ovocalyxin-36 (*Gautron et al., 2007*) (eggshell and vitelline membrane)

• Identity and similarity with LBP/BPI and Plunc families proteins

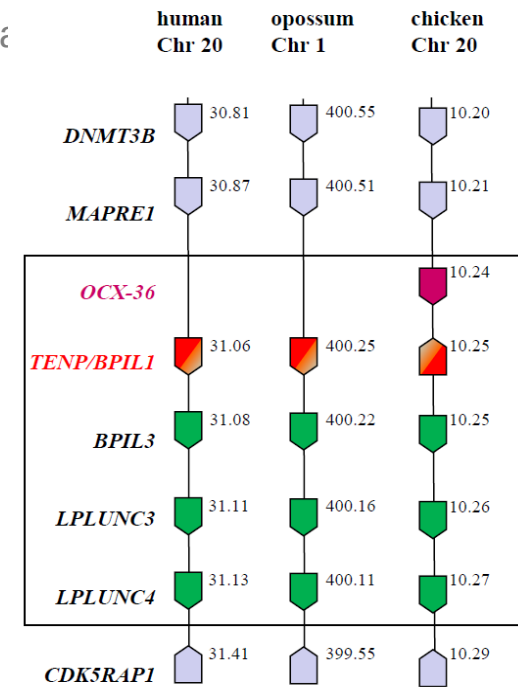
• Binds to the lipopolysaccharide (LPS) cell wall of the gram negative bacteria (death of bacteria)

• Early recognition of bacterial product

• OCX-36 binds to E. Coli LPS (*Correiro, Hincke et al., 2010*)

• Modestly inhibit the bacterial growth of *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *E. Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*

Genetic Diversity Increasing



(*Tian et al., 2010*)

➢ Other candidates (*Réhault-Godbert et al., 2011, Gautron et al., 2011*)

TENP (all compartments)

BPIL2 (Egg White, Vitelline membrane)

Similar to *BPI* (Egg white)

Egg antimicrobial proteins (chemical defence)



Chelators

Molecules decreasing bioavailability of irons and vitamins

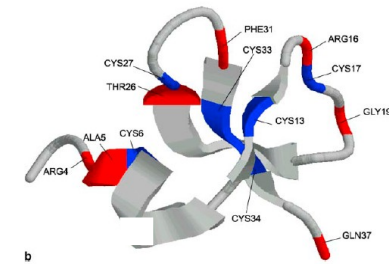
- Diminish bioavailability for microbes
- Affect growth and survival of bacteria

Name	Localization	Antimicrobial activity
Ovotransferrin	ES, EW, MV, EY	+
RBP	ES, EW, MV, EY	+
Avidin	ES, EW, MV	+
Similar to avidin	EY	?
Vitellogenin 1	EY	
?		
Vitellogenin 2	EY	
?		

Antimicrobial peptides

Avian beta-defensins

Cationic peptides
Broad spectrum of antimicrobial activity



Characterization of AvBD-11 (Hervé-Grépinet et al., 2010)

Bacterial group, species	MIC ^a (μM) (95% confidence interval)	
	MSI-94 ^b	AvBD11
Gram positive		
<i>S. aureus</i> ATCC 29740	0.33 (0.19–0.48)	0.90 (0.27–1.7)
<i>L. monocytogenes</i>	0.28 (0.13–0.43)	0.18 (0.08–0.27)
Gram negative		
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	0.31 (0.25–0.35)	0.35 (0.27–0.46)
<i>S. Enteritidis</i> LA5	0.15 (0.10–0.21)	0.40 (0.29–0.49)
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	0.25 (0.11–0.40)	0.32 (0.31–0.32)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.37 (0.23–0.52)	0.05 (0.04–0.05)

Egg antimicrobial proteins (chemical defence)



Chelators

Molecules decreasing bioavailability of irons and vitamins

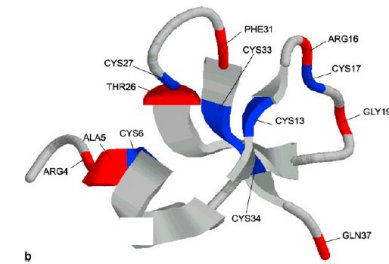
- Diminish bioavailability for microbes
- Affect growth and survival of bacteria

Name	Localization	Antimicrobial activity	
Ovotransferrin	ES, EW, MV, EY	+	+
RBP	ES, EW, MV, EY	+	
Avidin	ES, EW, MV	+	
Similar to avidin	EY		?
Vitellogenin 1		EY	
?			
Vitellogenin 2		EY	
?			

Antimicrobial peptides

Avian beta-defensins

Cationic peptides
Broad spectrum of antimicrobial activity



Histones

Basic proteins from nucleosomes
Agent of innate host defense (Gram + and Gram – strains)

Egg antimicrobial proteins (chemical defence)



C-type lectin-like proteins

Major components of the calcified eggshell of multiple avian species

C-type lectin domain : 110 to 130 residues including four cysteines involved in two disulfide bonds

Ovocleidin 17 (*Hincke et al., 1995*) (eggshell, eggwhite, vitelline membrane)

Bactericidal activity against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* (*Wellman-Labadie et al. 2008*)

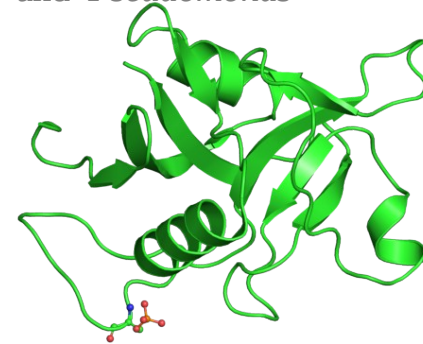
Other candidates (*Jonchere et al., 2009, Bourin et al., 2012*)

Tetranectin (egg yolk)

Collagen XVIII (eggshell)

DEC-205 protein (eggshell)

Mannose binding protein (eggshell, uterus)



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

