

Biominéralisation de la coquille d'œufs d'oiseaux

Joël Gautron
INRA, UR83 Recherches
Avicoles
37380 Nouzilly

L'œuf de poule

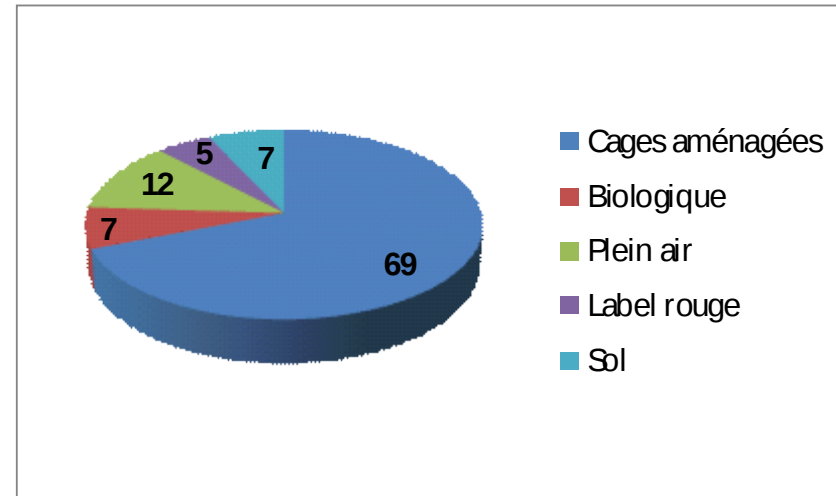
L'Œuf, un produit de base pour l'alimentation humaine

Au niveau mondial en 2012

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

Filière française en 2013

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



Consommation

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

Source ITAVI

Microbiologie de l'œuf et des ovoproduits

- Au moment de la ponte, le contenu des œufs est généralement stérile
- Le pourcentage d'œufs frais contaminés reste souvent inférieur à 1 %
- Contamination verticale est rare

- La contamination horizontale est beaucoup plus fréquente
- Se produit après la ponte par contact avec les microorganismes

- * fientes
- * environnement élevage
- * centre de conditionnement
- * circuit de commercialisation
- * consommateur...

→ Les œufs et produits d'œufs sont consommés crus (mayonnaise...)

→ Impliqués dans 45% des salmonelloses (62 % pour salmonella enteritidis)

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

L'Œuf, un p Chambre is

Doit contenir la totalité des composants nécessaires au développement
embryonnaire

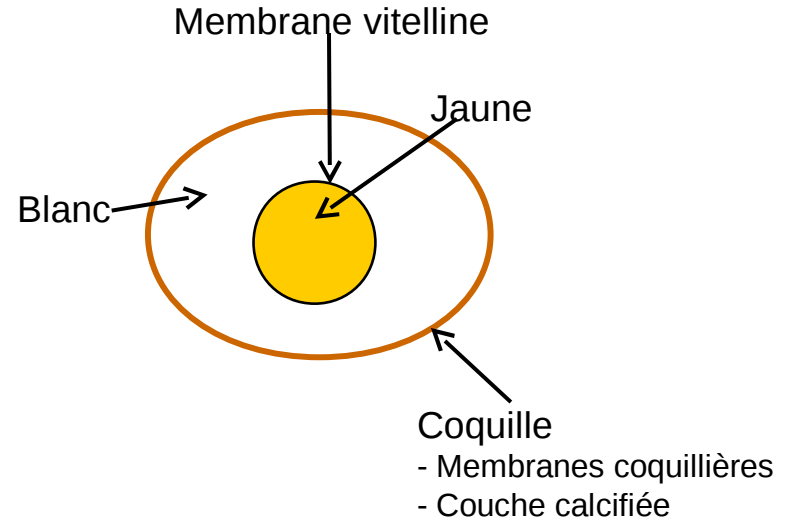
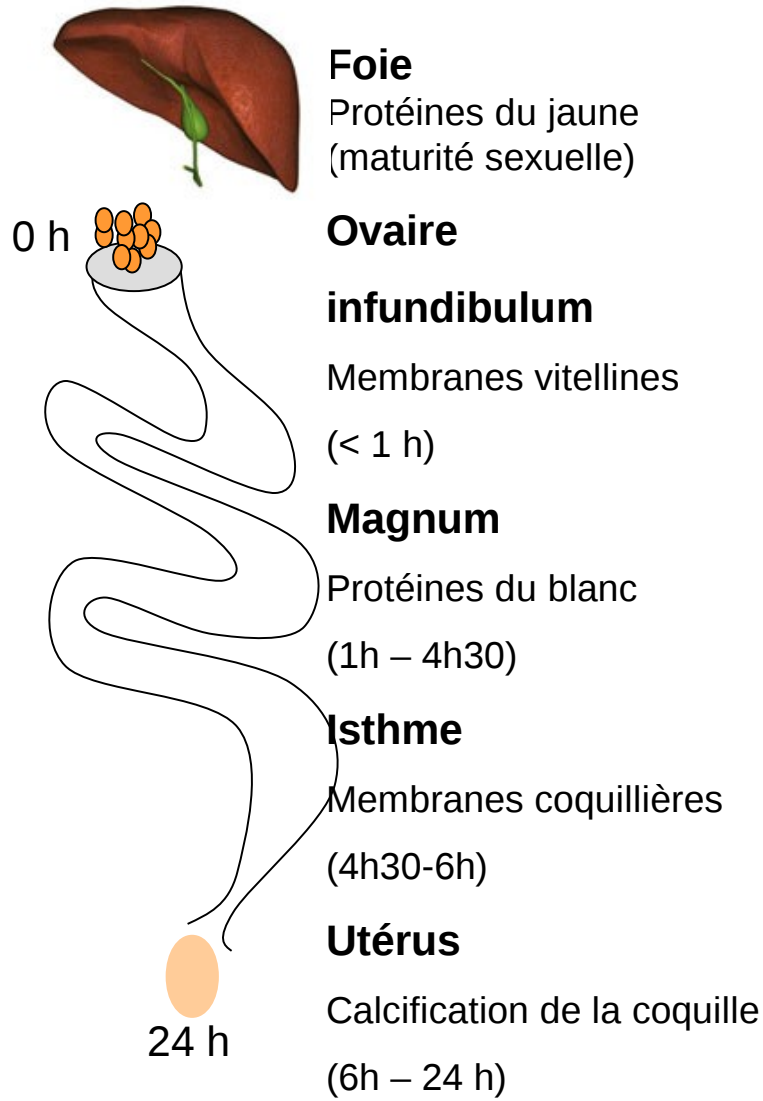


Agressions
physiques

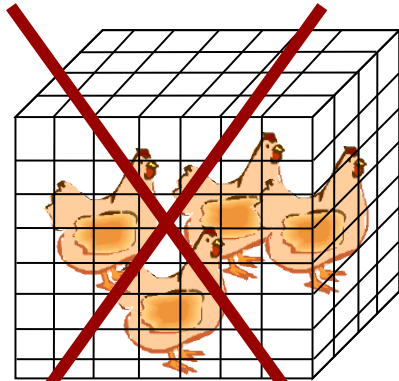
Microbes

- Éléments nutritionnels parfaitement équilibrés
- Nombreux composés avec un large spectre d'activités biologiques
- Systèmes de protection (défenses naturelles)
 - Défense physique (coquille principalement)
 - Défense chimique (activité antimicrobienne des protéines de l'œuf)

La formation de l'œuf



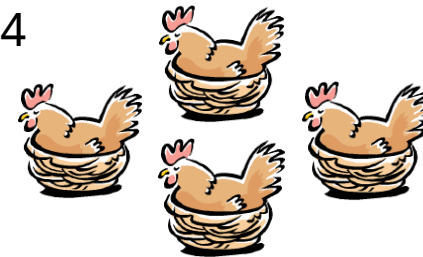
Le contexte européen



2012

Interdiction des cages conventionnelles

Directive EU 1986/609
Animal welfare

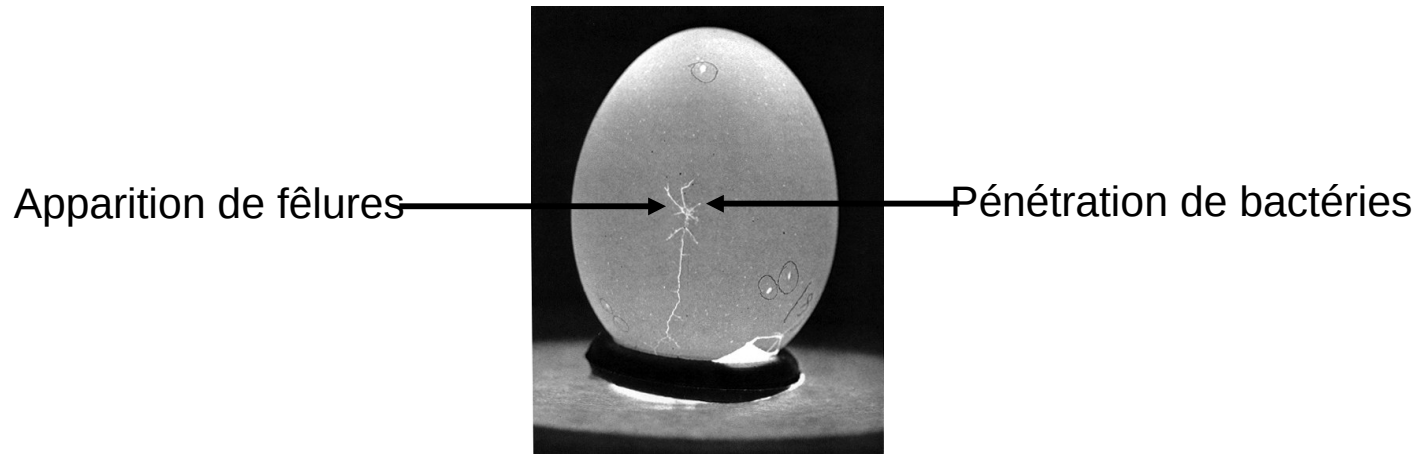


Cages aménagées, volières
ou autres systèmes au sol

Impact sur la qualité hygiénique de l'oeuf ?

La coquille : une barrière physique contre la pénétration bactérienne

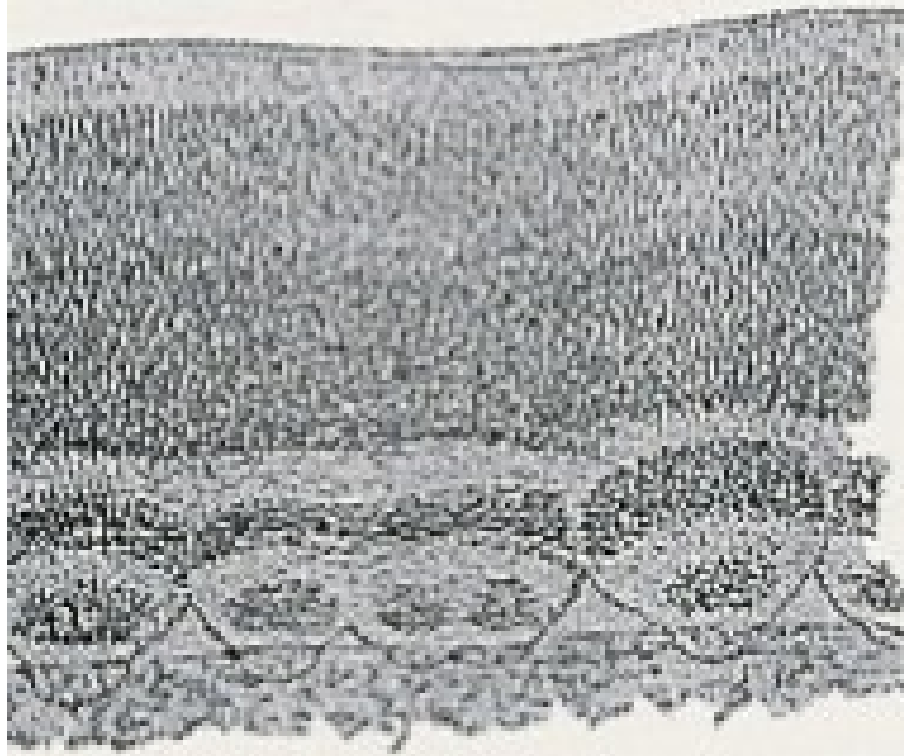
- L'intégrité de la coquille est cruciale pour la sécurité alimentaire du consommateur



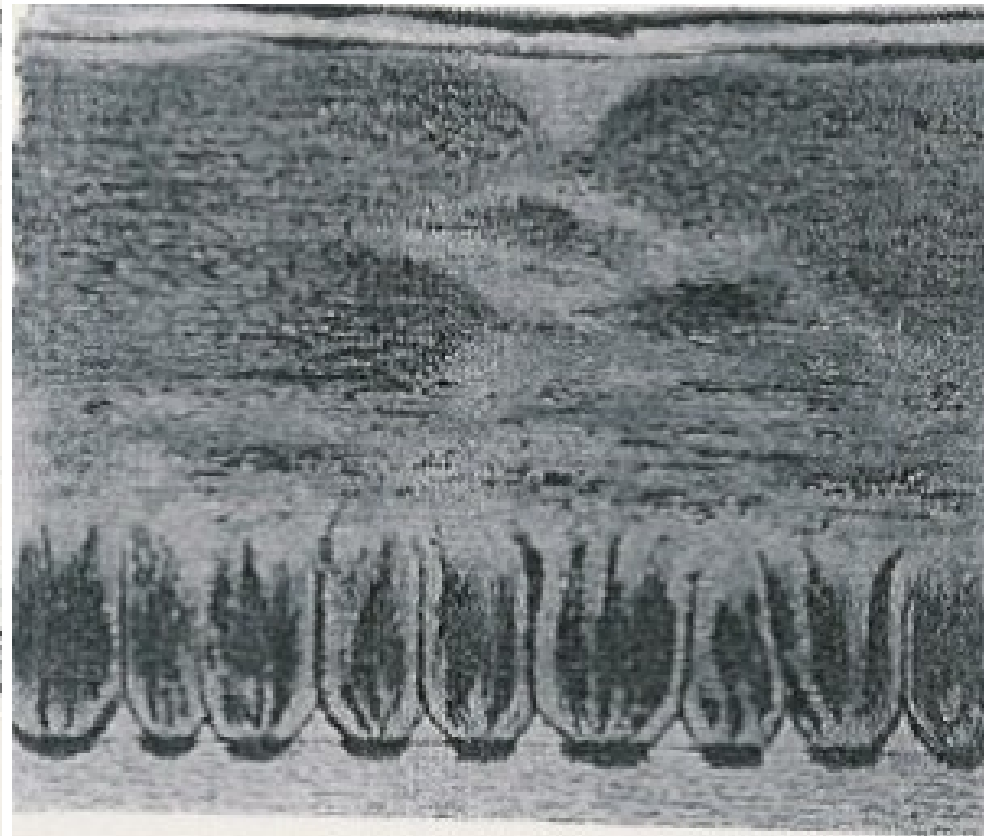
Comprendre les mécanismes de fabrication de la coquille et déterminer l'origine de ses faiblesses

Développer de nouveaux outils pour la sélection

La coquille (défense physique)



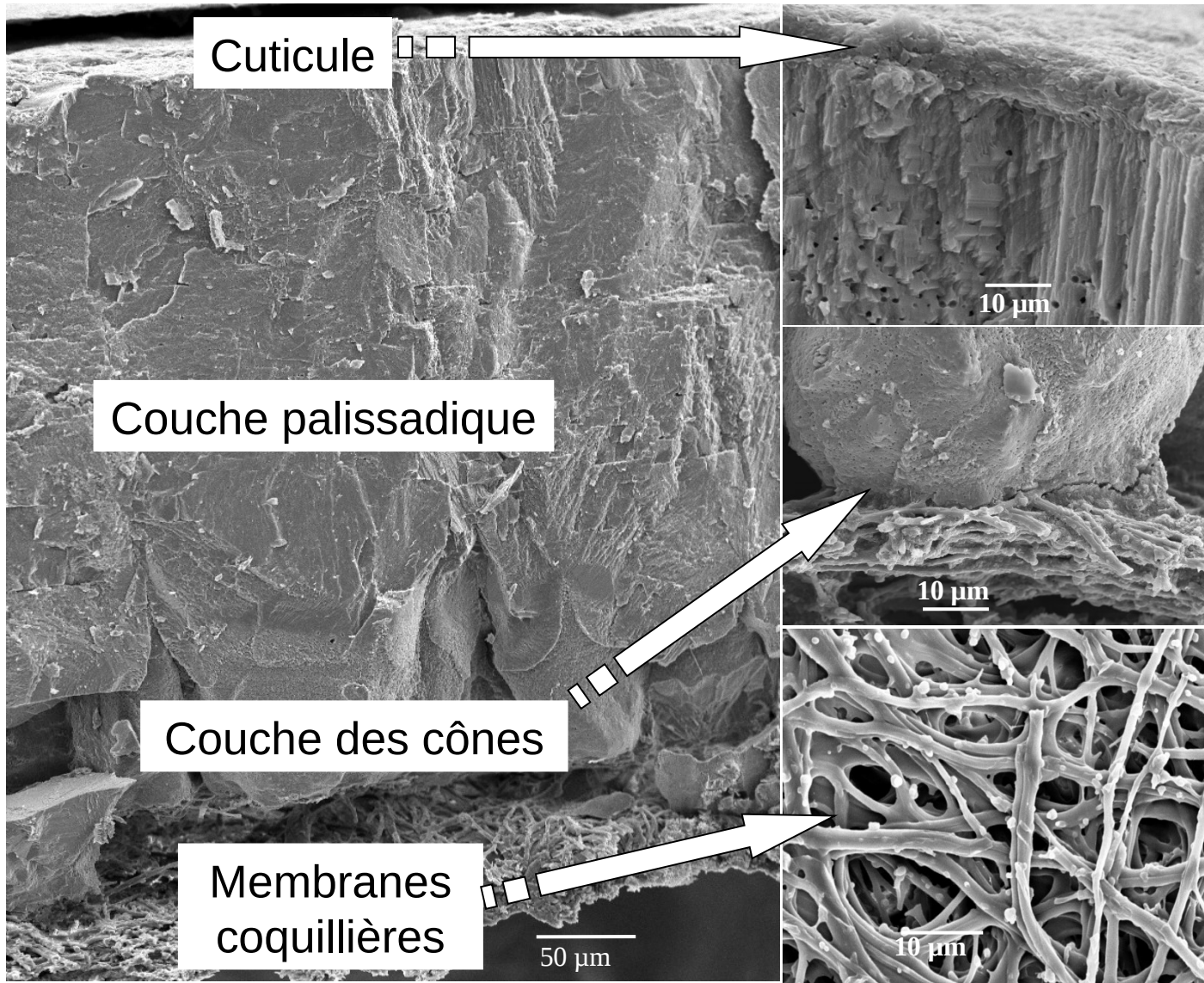
Gallus gallus x 72



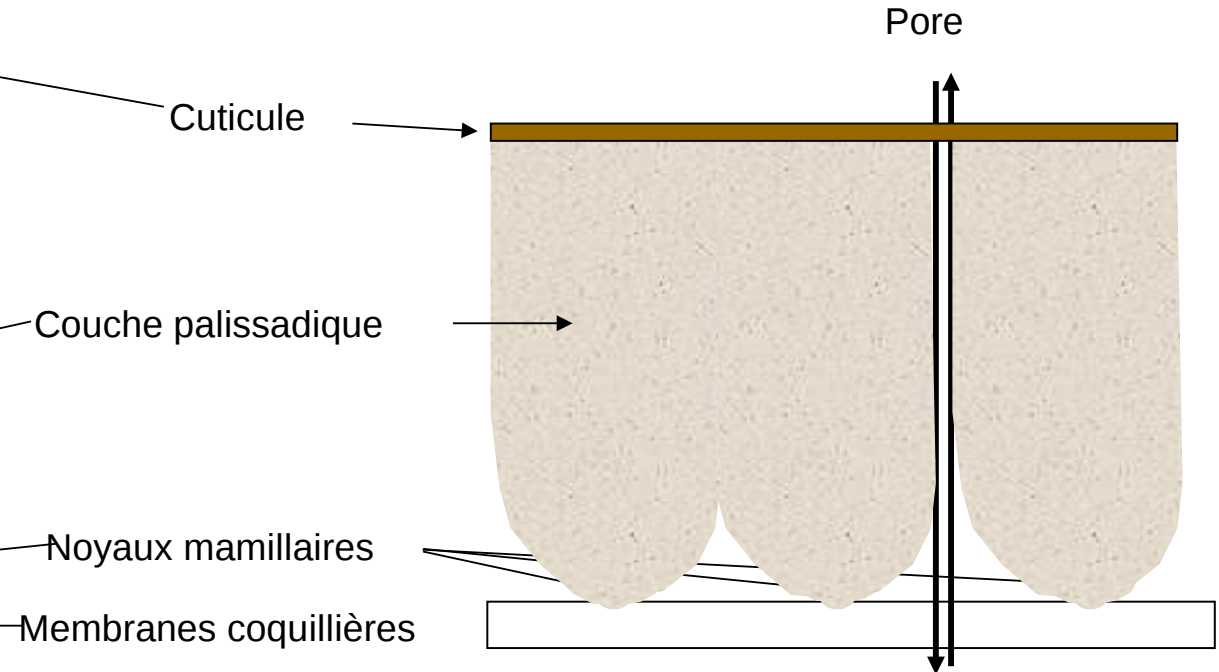
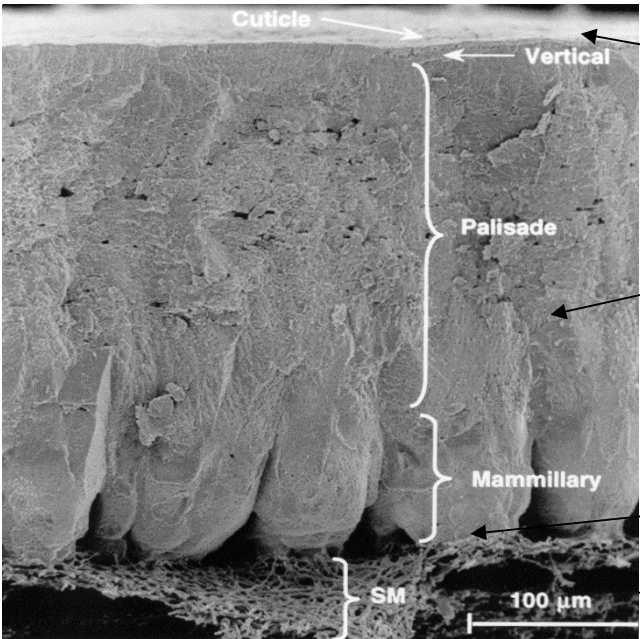
Cygnus x 53

Dessin de Wilhem von Nathusius, 1821-99

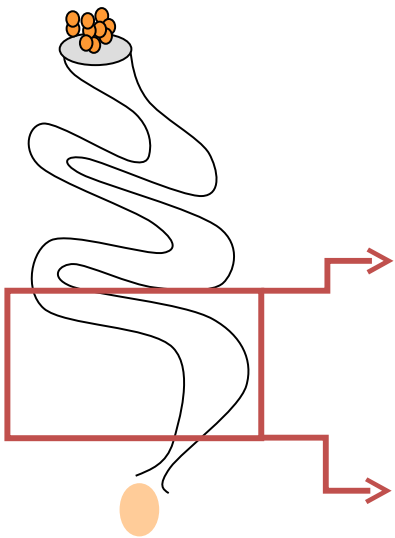
La coquille (défense physique)



La coquille (défense physique)



Eggshell Biomineralisation in uterus

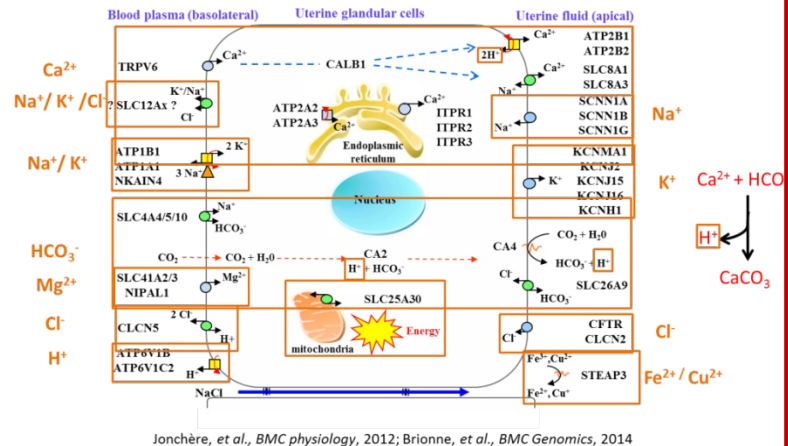


Supply of minerals for shell mineralization

General model describing uterine ion transporters during eggshell calcification

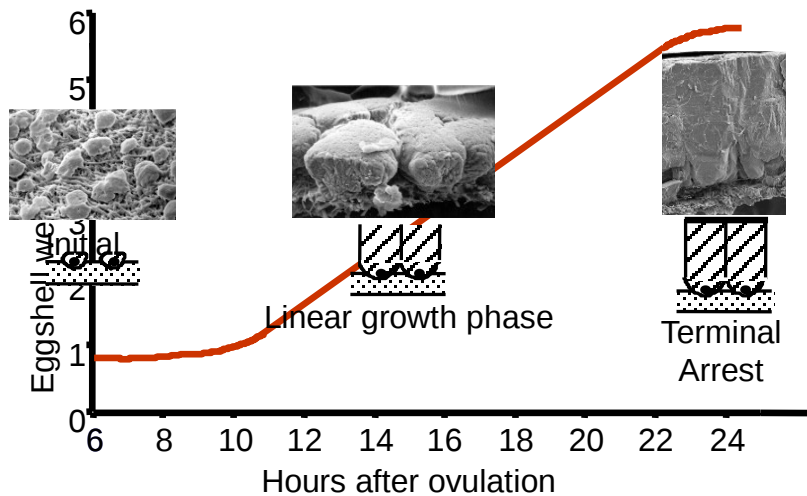
Jonchere et al., 2012, *Bmc physiology*

Brionne et al., 2014, *Bmc Genomics*



Biomineralisation process

3 main phases in the uterine fluid (acellular milieu)

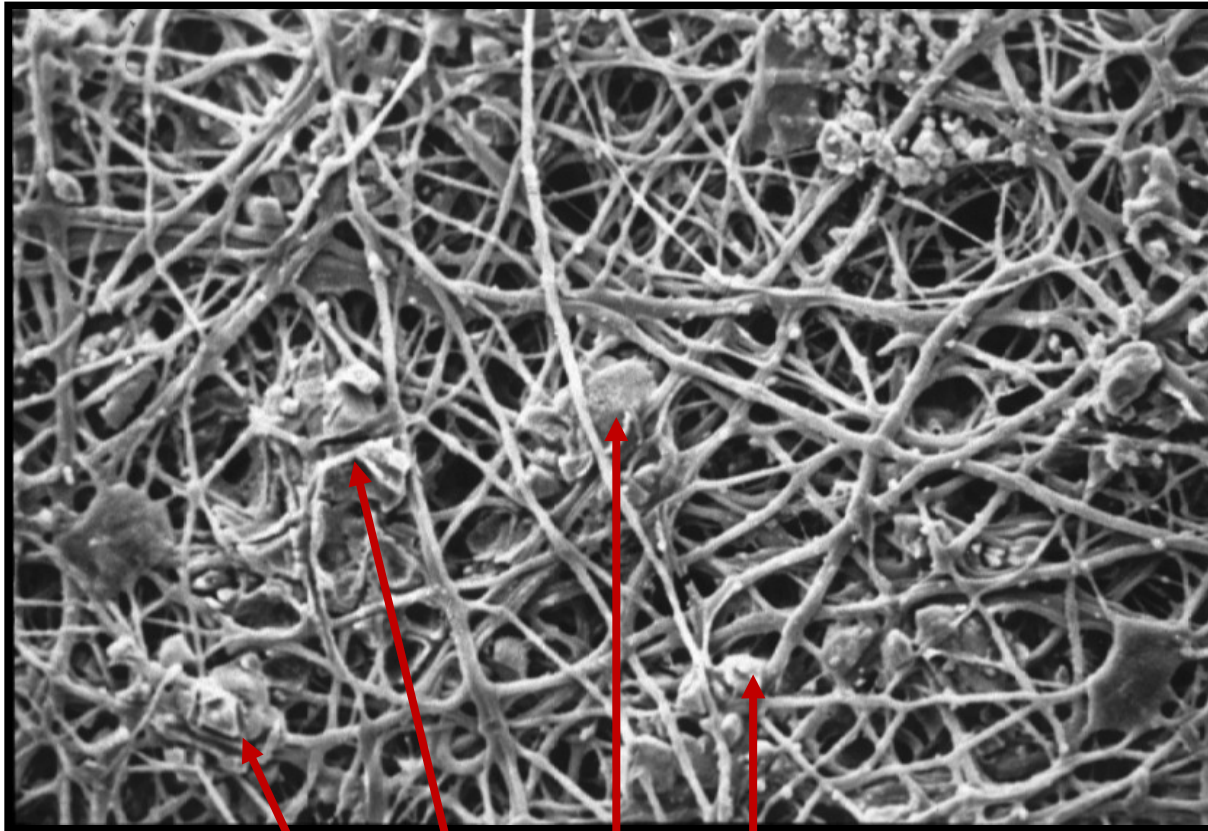
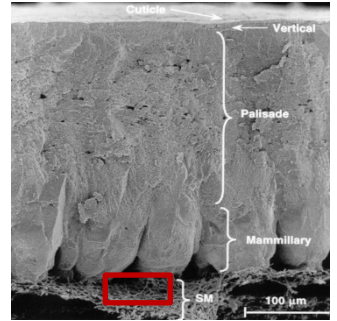


La formation de la coquille des oiseaux, un processus de biominéralisation

- Minéralisation de la coquille se produit dans l'utérus qui constitue un espace compartimenté**
- Les cellules de l'utérus sécrètent un fluide acellulaire (liquide utérin) dans lequel se produit la minéralisation**
- L'ensemble des constituants minéraux et organiques nécessaires à la formation de la coquille sont présents dans ce milieu**
- Le carbonate de calcium précipite à partir du calcium et des bicarbonates du fluide utérin**
- Le calcium et les carbonates se trouvent à des concentrations élevées**
- Le produit de solubilité est dépassé de 100 fois environ**

La formation de la coquille

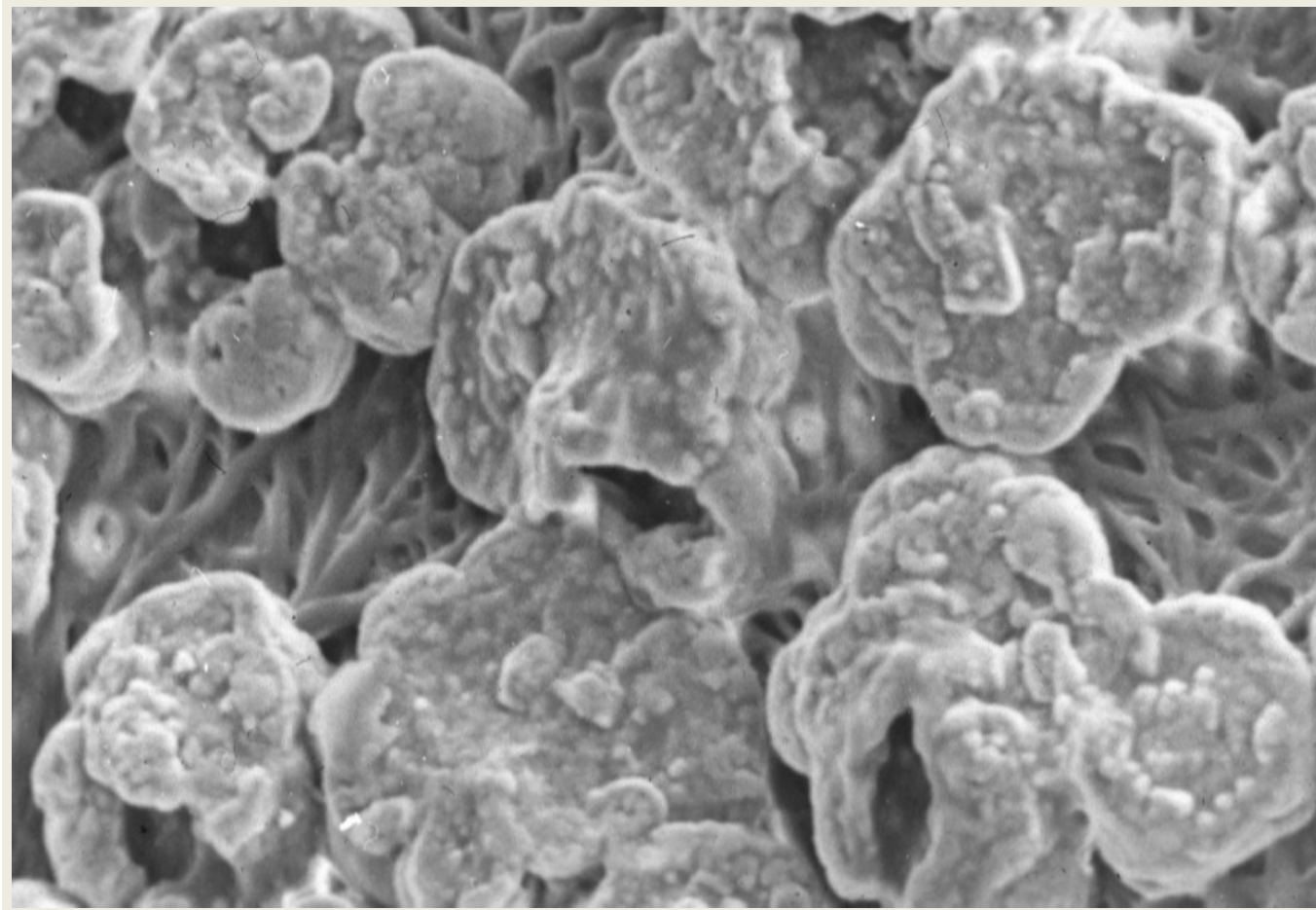
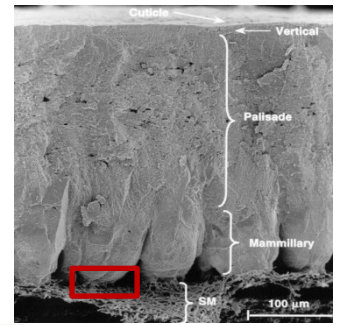
La phase initiale



Le carbonate de calcium se dépose en des sites organiques (noyaux mamillaires) en surface de la membrane de l'œuf

La formation de la coquille

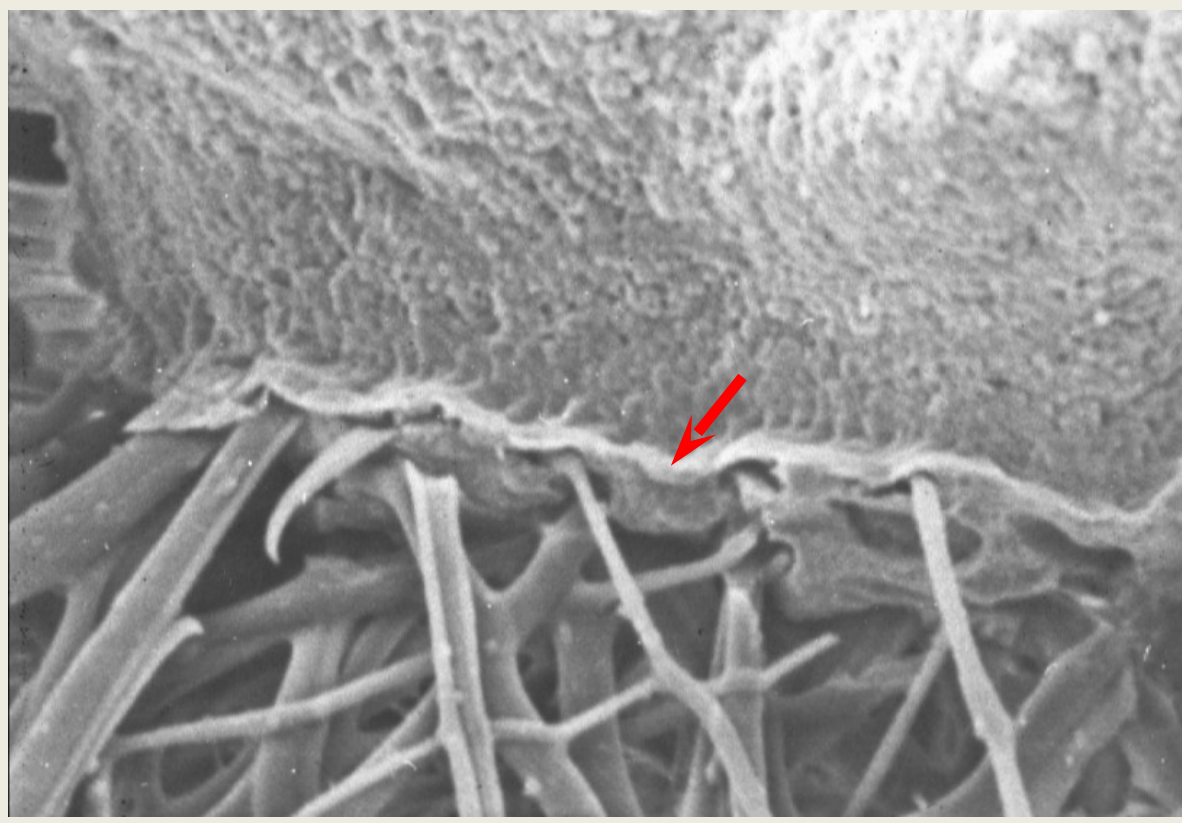
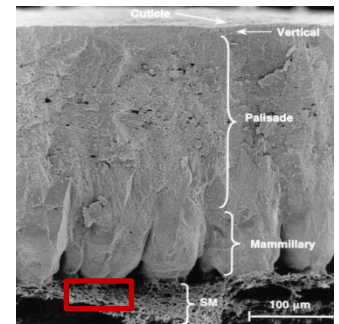
La phase initiale



Peu à peu les noyaux mamillaires sont recouverts de calcite

La formation de la coquille

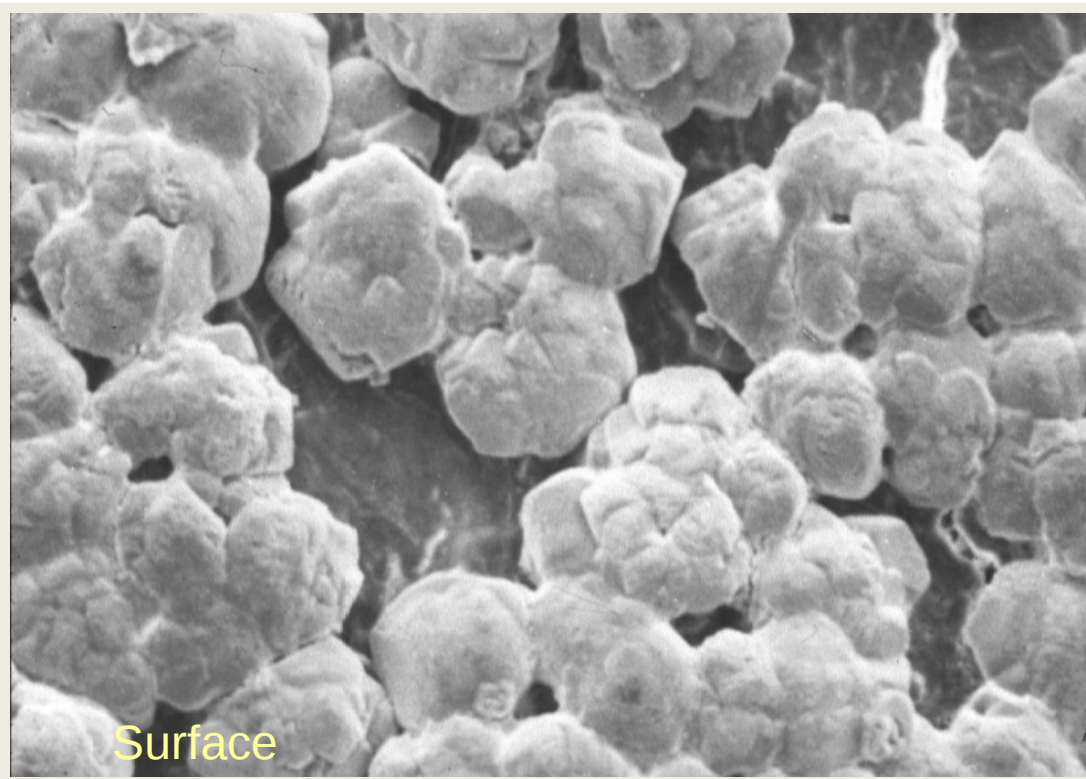
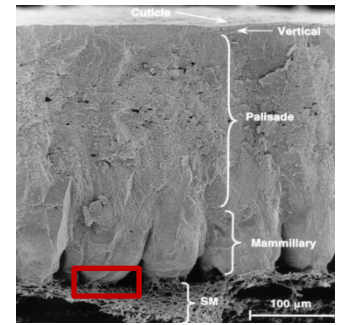
La phase initiale



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

La formation de la coquille

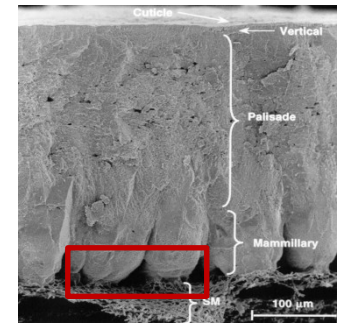
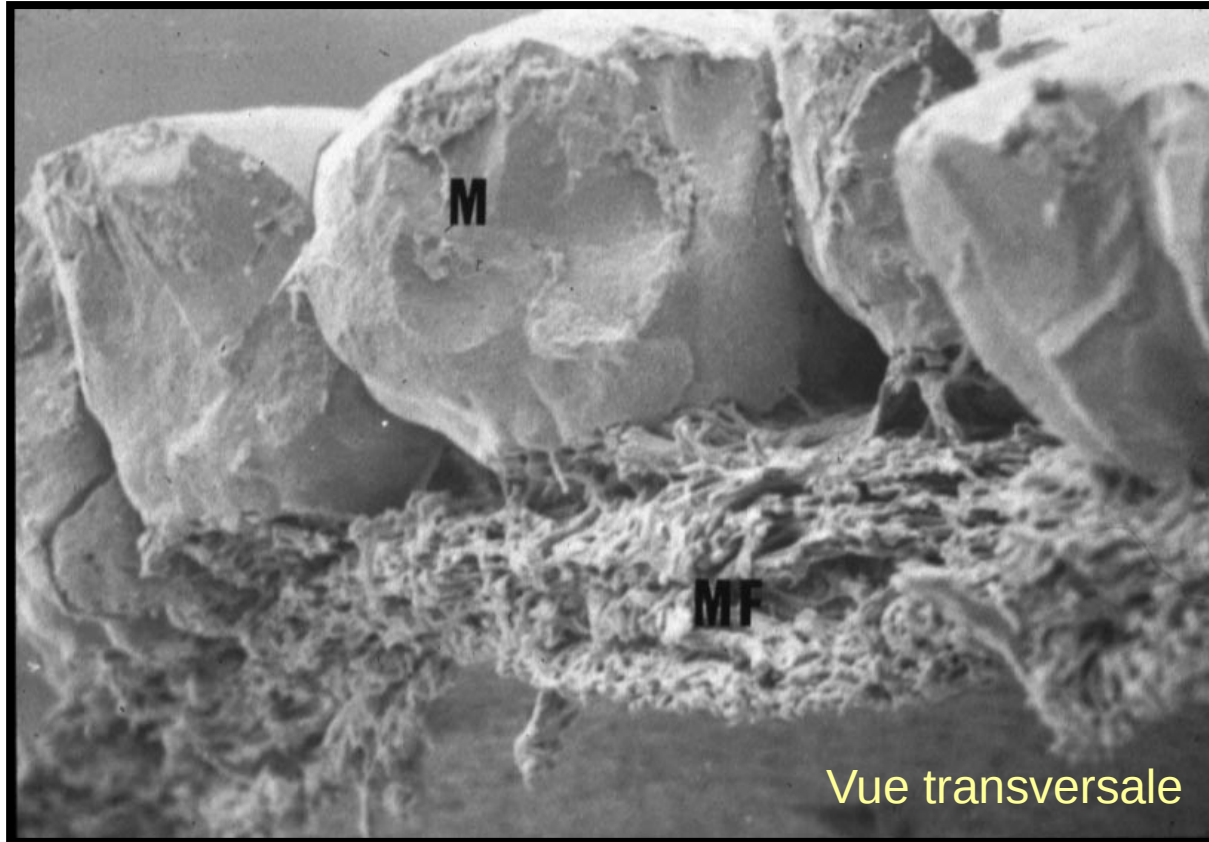
La phase initiale



Les noyaux mamillaires recouverts de carbonate de calcium (calcite) forment des cônes qui fusionnent au fur et à mesure que la

La formation de la coquille

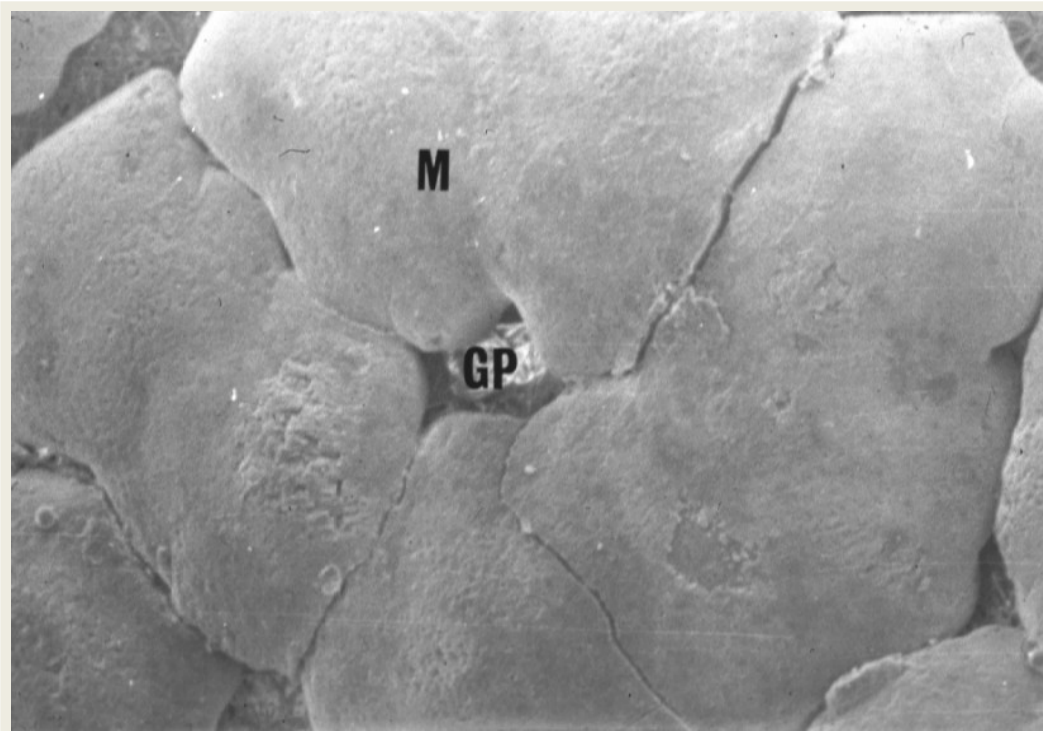
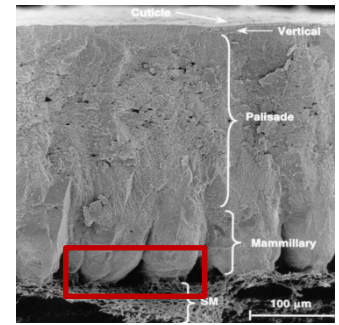
La phase de croissance



Les noyaux mamillaires recouverts de carbonate de calcium (calcite) forment des cônes qui fusionnent au fur et à mesure que la calcification se poursuit

La formation de la coquille

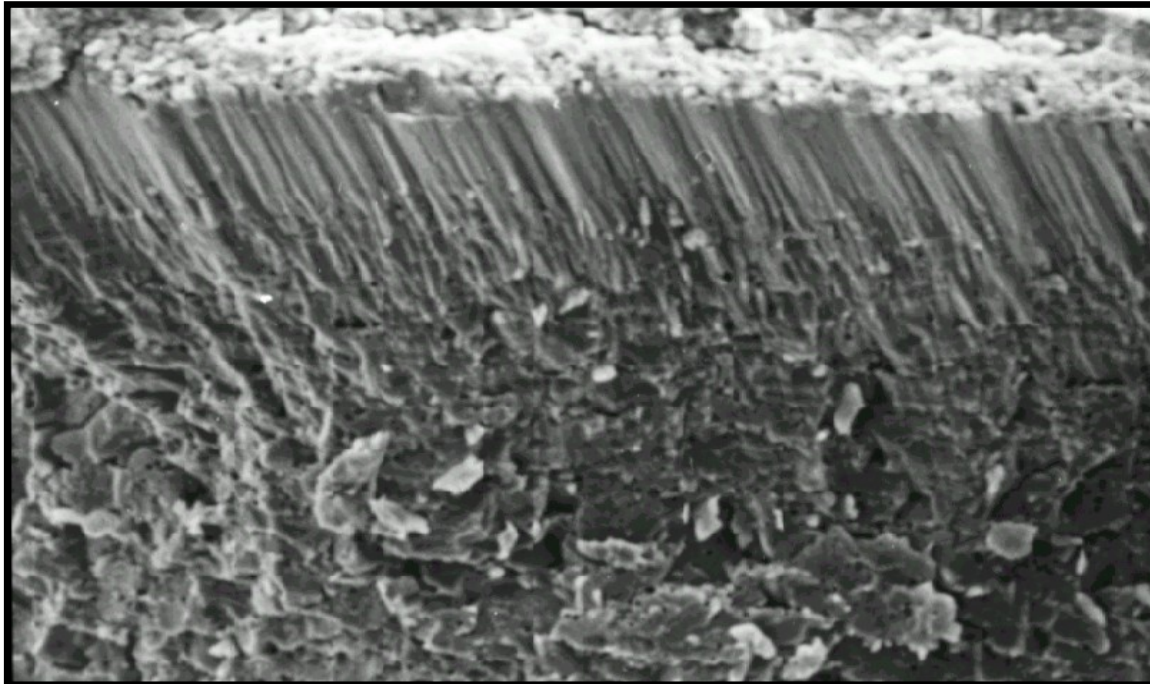
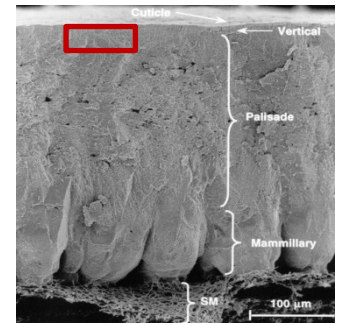
La phase de croissance



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

La formation de la coquille

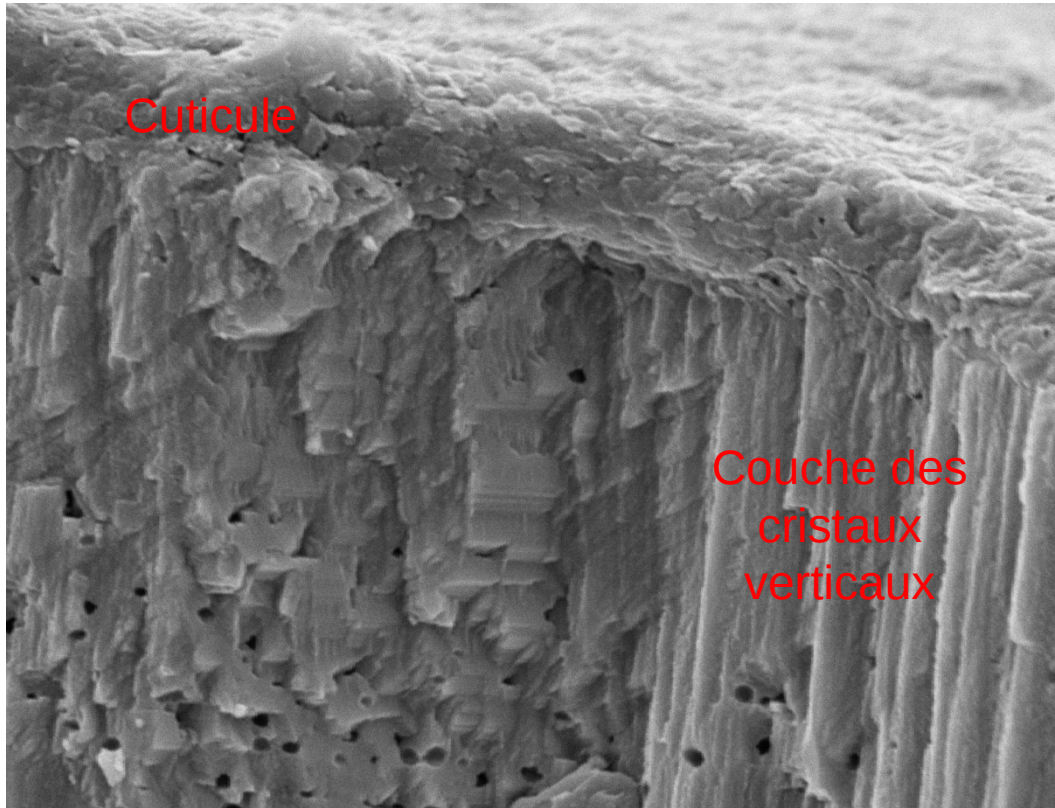
La phase terminale



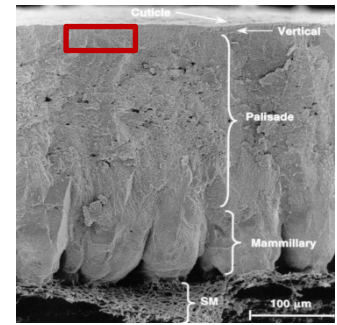
En surface de la couche calcifiée apparaît une couche monocristalline de calcite (Couche des cristaux verticaux)

La formation de la coquille

La phase terminale

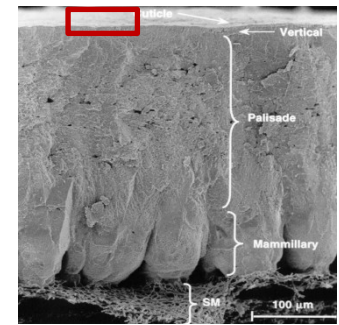
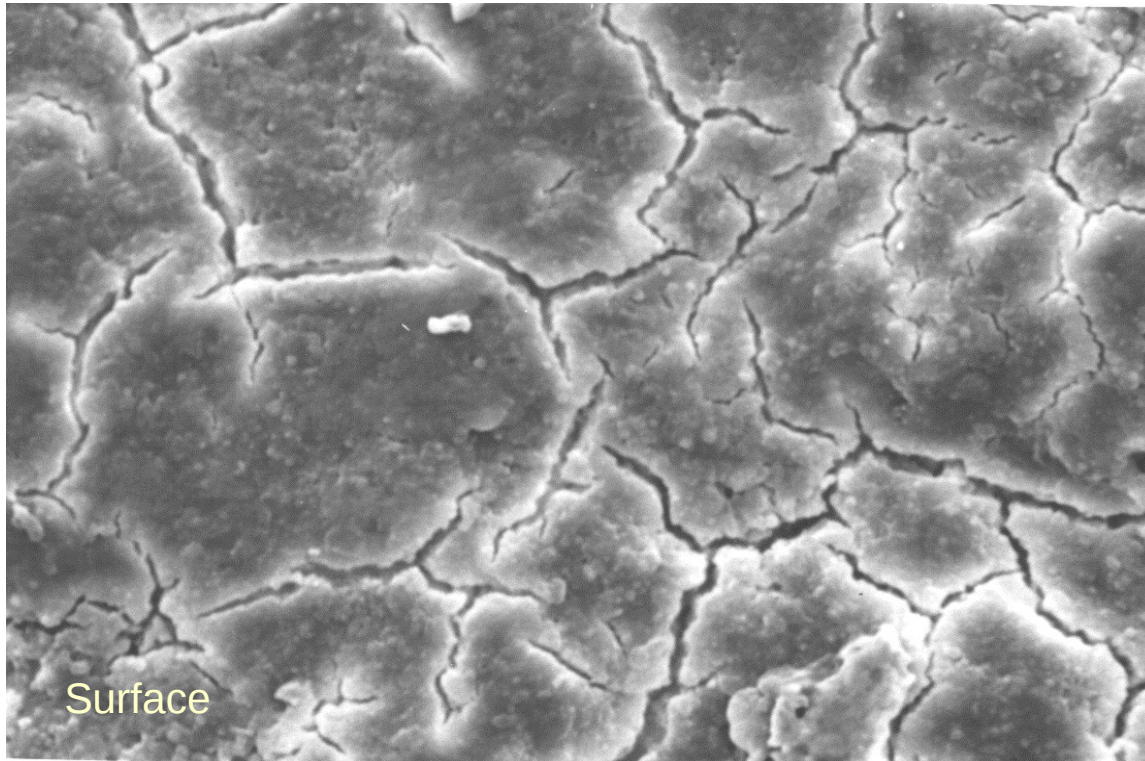


La minéralisation s'arrête. Une fine couche de matière organique vient se déposer en surface (cuticule)



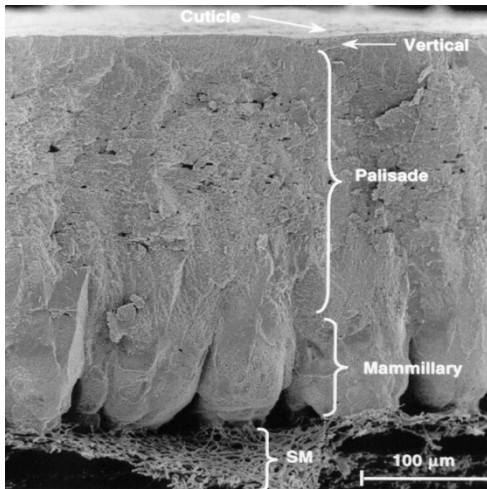
La formation de la coquille

La phase terminale



La cuticule recouvre la totalité de l'œuf. En séchant, elle se fissure pour permettre les échanges gazeux via les pores

Similitude des coquilles d'œufs



Gallus gallus



coturnix japonica



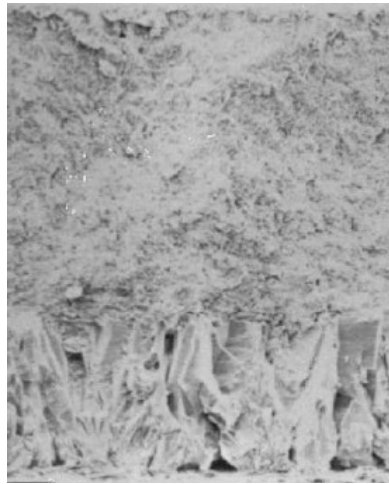
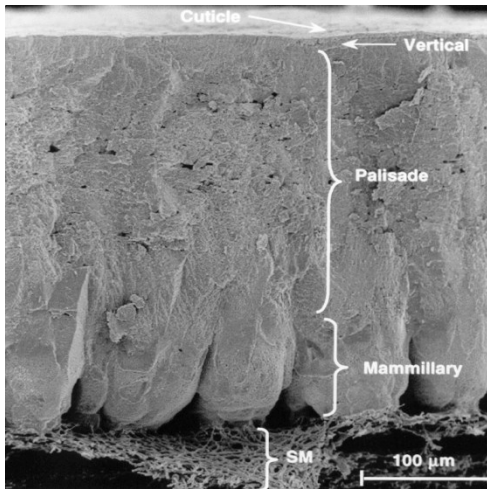
Meleagris gallopavo



Anas platyrhynchos

Similitude des coquilles d'œufs

□ PROCESSUS DE BIOMINÉRALISATION UNIVERSEL



Gallus gallus



Numida meleagris

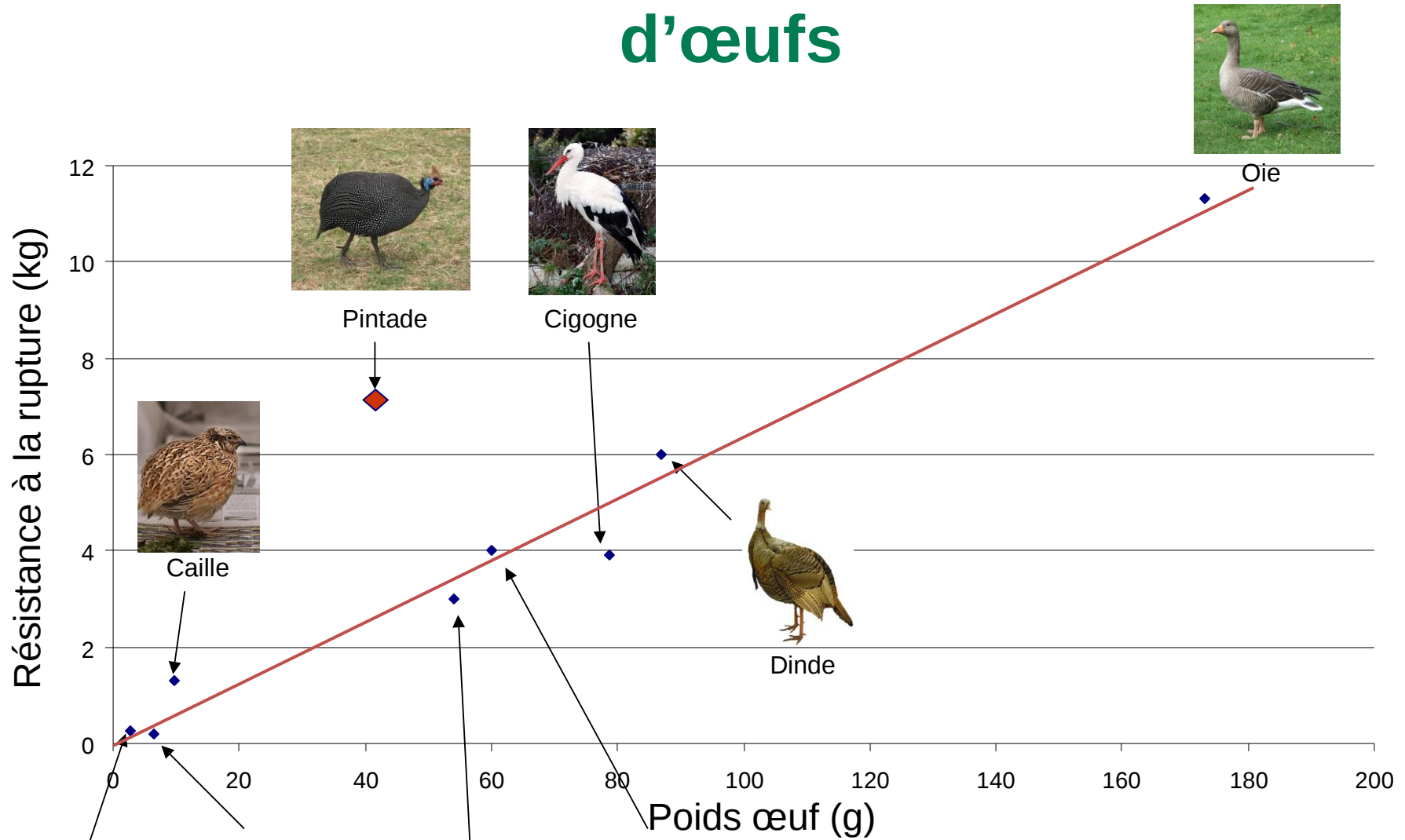


Struthio



Sankofa pyrenaica

Propriétés biomécaniques des coquilles d'œufs



Moineau



Merle noir



Canard



Poule

La formation de la coquille, un processus de biominéralisation

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



Gallus gallus



Meleagris gallopavo



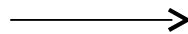
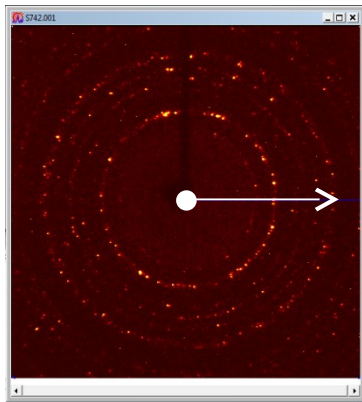
Numida meleagris



Sankofa pyrenaica

La formation de la coquille

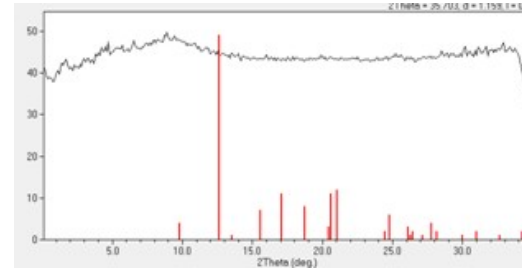
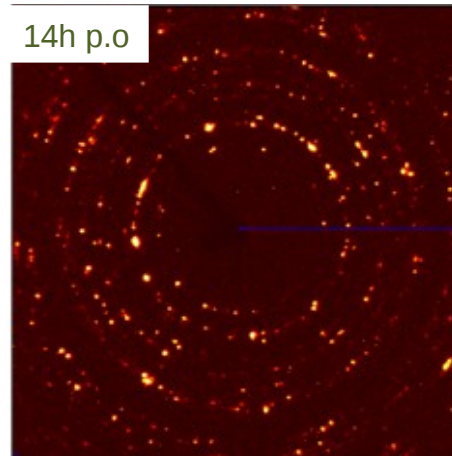
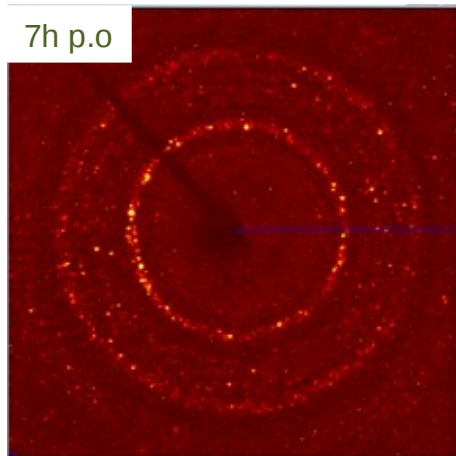
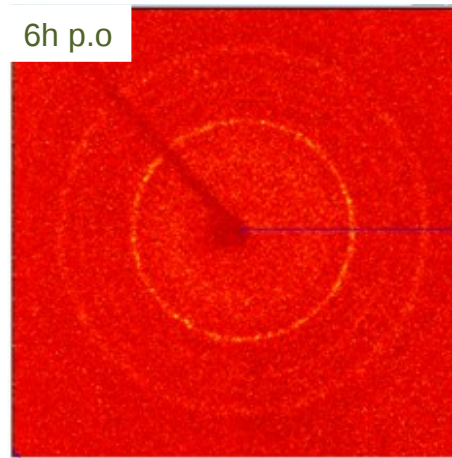
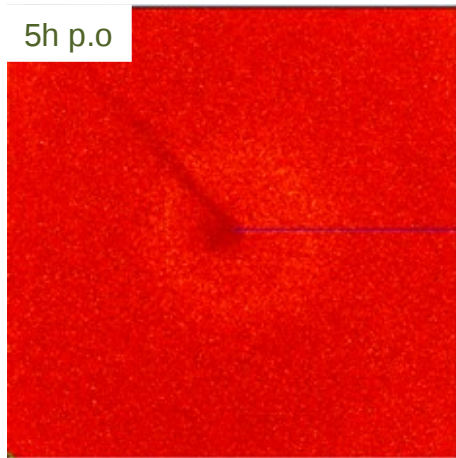
- **XRD 2D (X-Ray Diffraction)** (détermination quantitative du polymorphe cristallin présent)



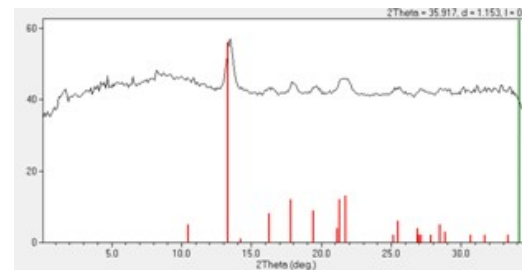
L'angle de diffraction est spécifique du type polymorphique du cristal (ici calcite)

La formation de la coquille

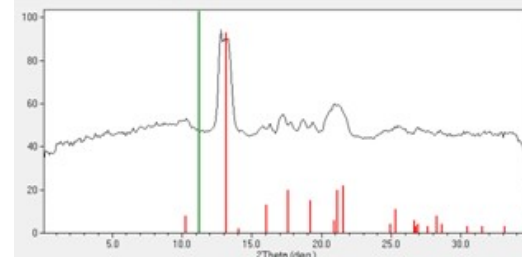
- **XRD 2D (X-Ray Diffraction)** (détermination quantitative du polymorphe cristallin présent)



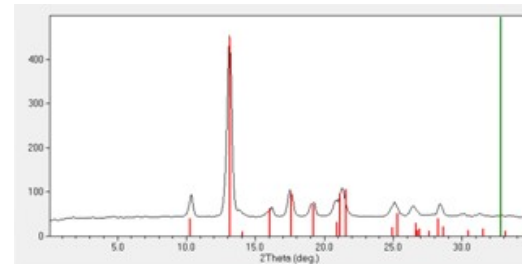
5h p.o :
pas de
cristal



6h p.o :
cristallisation
très faible



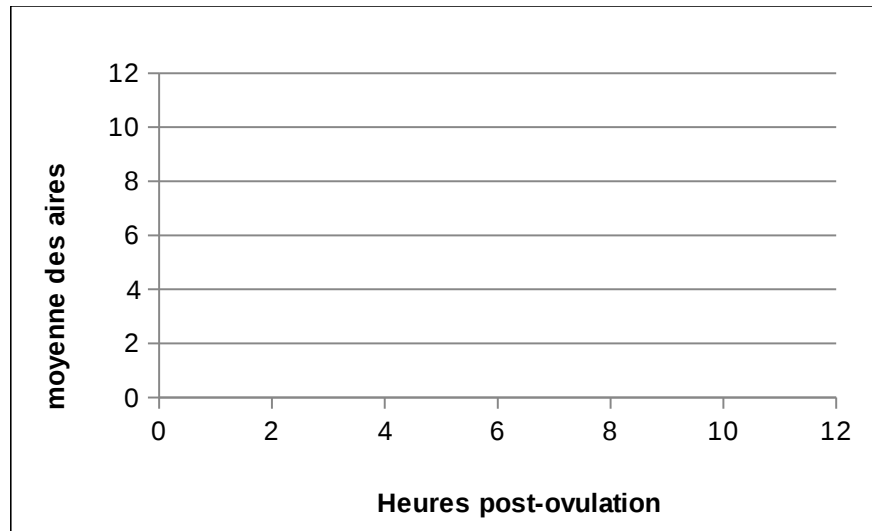
7h p.o :
cristal plus
organisé



14h p.o :
cristal
totalement
organisé

La formation de la coquille

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



- ✓ **Nanocristaux formés aux stades précoces (5-6 heures)**
- ✓ **Accroissement de la taille des cristaux à partir des nanocristaux**
- ✓ **Les plus gros cristaux forment un petit nombre d'unités cristallines orientées** **microstructure en colonne**

La formation de la coquille

- **Contexte**

2 hypothèses possibles pour la formation de la calcite sous influence de la matrice organique

Hypothèse n°1 : calcite formée directement $\text{Ca} + \text{CO}_3 \rightarrow \text{calcite}$

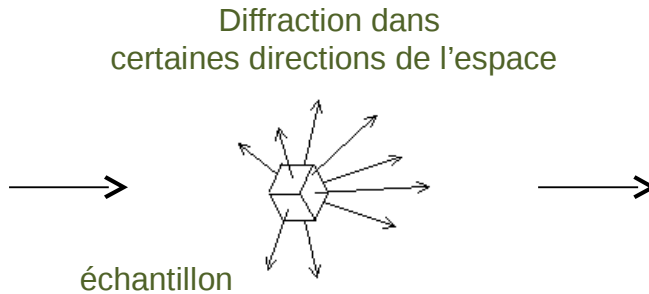
Hypothèse n°2 : passage par du carbonate de calcium amorphe (ACC) dans une phase transitoire avant d'obtenir la calcite $\text{Ca} + \text{CO}_3 \rightarrow \text{ACC} \rightarrow \text{calcite}$

□ Plus soluble, plus réactif, source temporaire de calcium

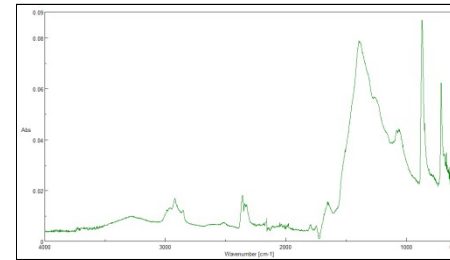
La formation de la coquille

quantification du ratio CaCO_3 cristallin/ CaCO_3 total (FTIR)

Faisceau
IR
incident



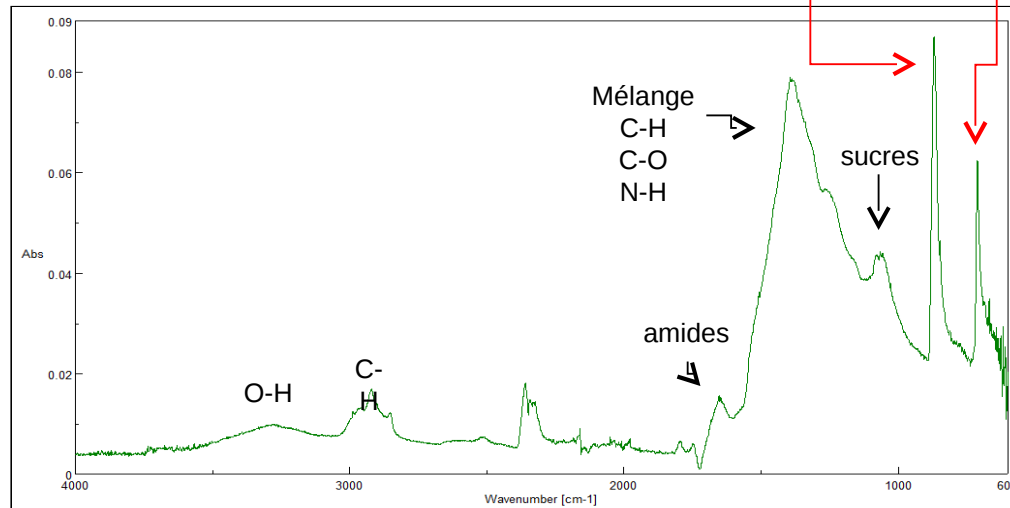
Spectre IR



Diffraction des IR
en fonction
des liaisons
chimiques présentes

carbonate de calcium total
(amorphe et cristallin) T

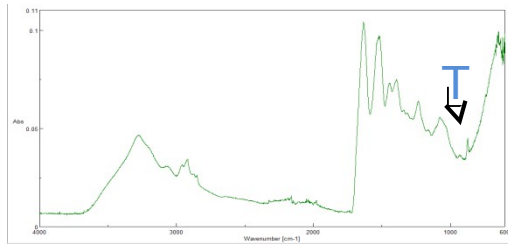
calcite C



La formation de la coquille

quantification du ratio CaCO_3 cristallin/ CaCO_3 total (FTIR)

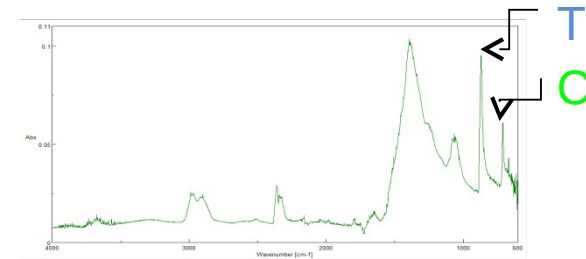
5h p.o



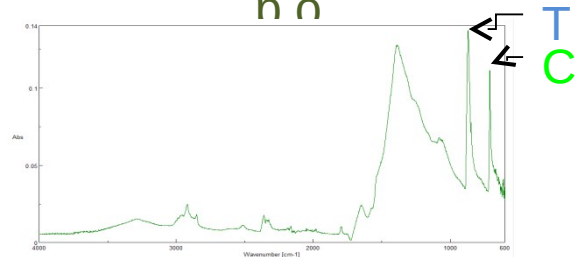
6h p.o



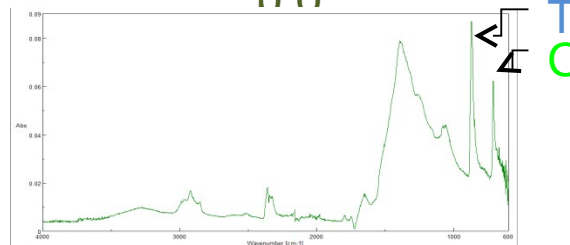
7h p.o



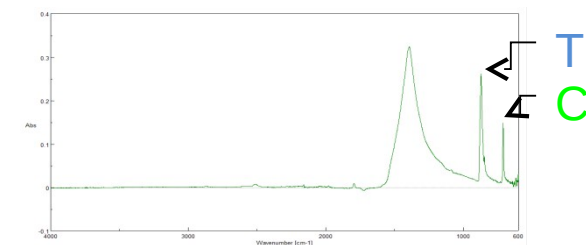
14h
n o



16h
n o

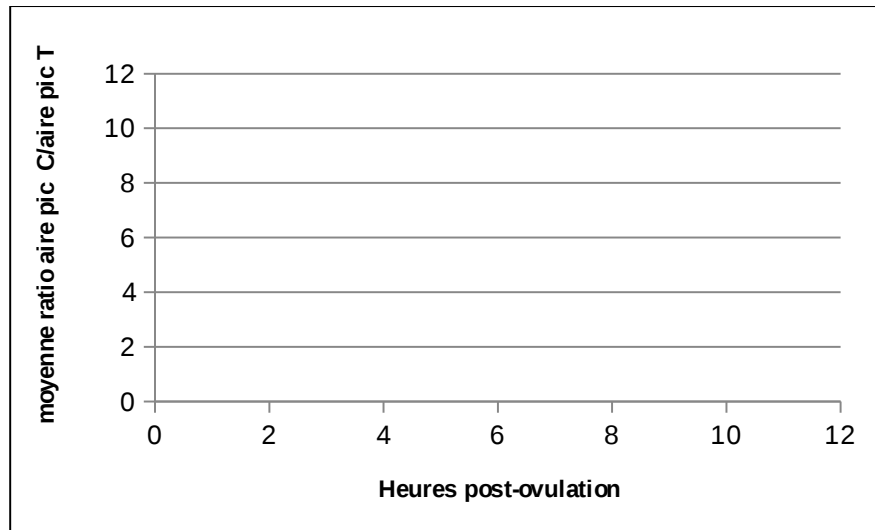


calcite pure



La formation de la coquille

quantification du ratio CaCO_3 cristallin/ CaCO_3 total (FTIR)



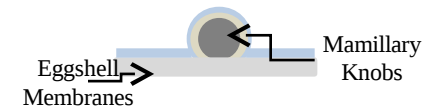
- ✓ CaCO_3 amorphe (ACC) aux stades précoces, mais une certaine orientation (proto-calcite)
- ✓ Augmentation du ratio aire pic C/aire pic T, qui traduit une transformation graduelle de l'ACC en calcite à tous les stades

La formation de la coquille

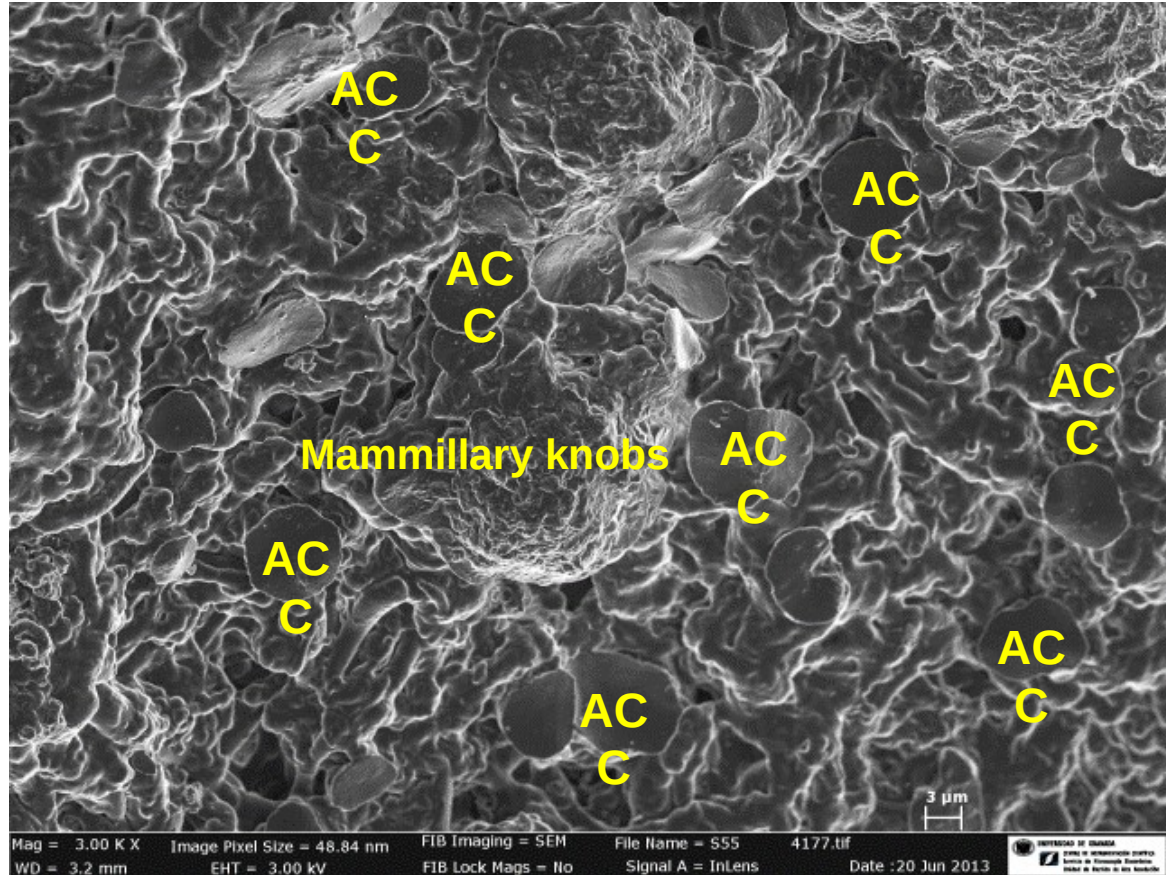
Role of amorphous calcium carbonate (ACC)



First nucleation events



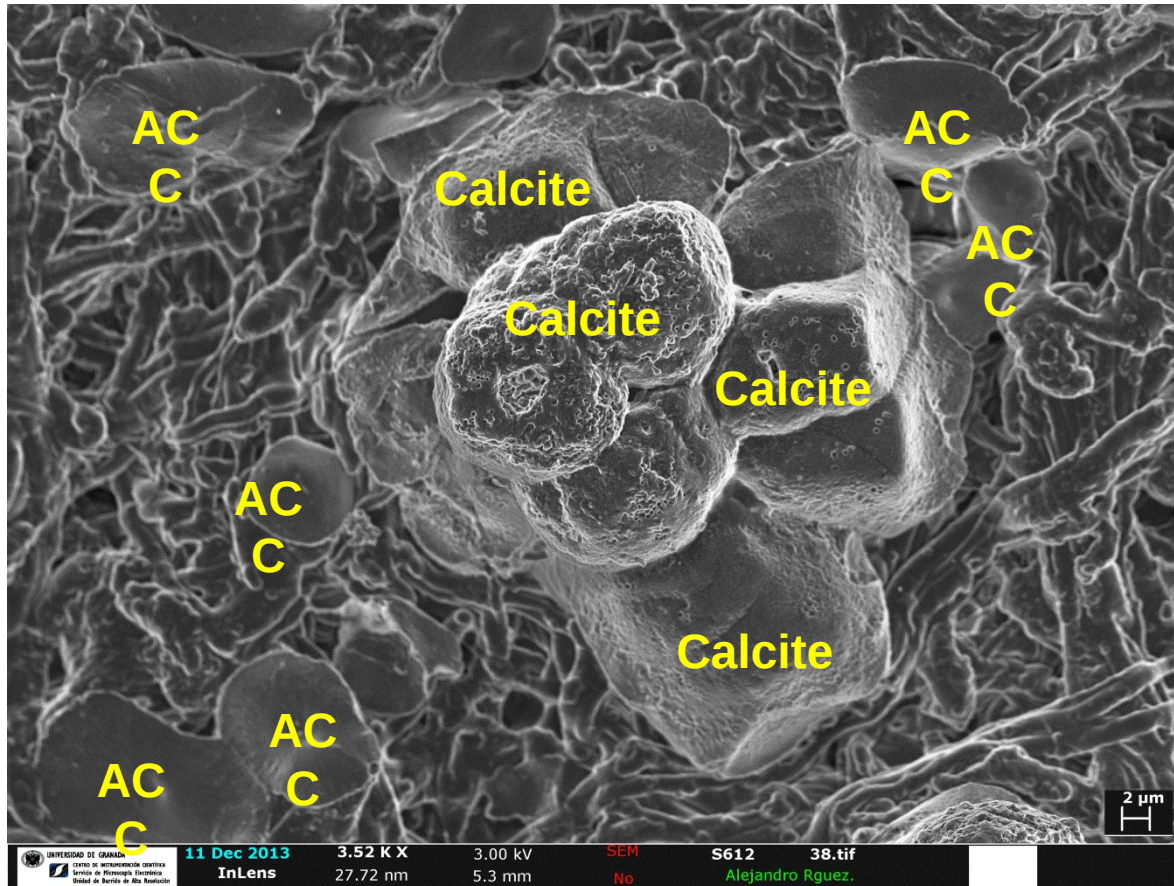
Time 1 (5-6 h Post ovulation):
ACC particles nucleate on the whole eggshell membranes.
Form massive deposits



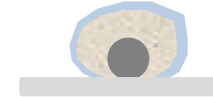
La formation de la coquille

Role of amorphous calcium carbonate (ACC)

ACC
Calcite



Calcite formation

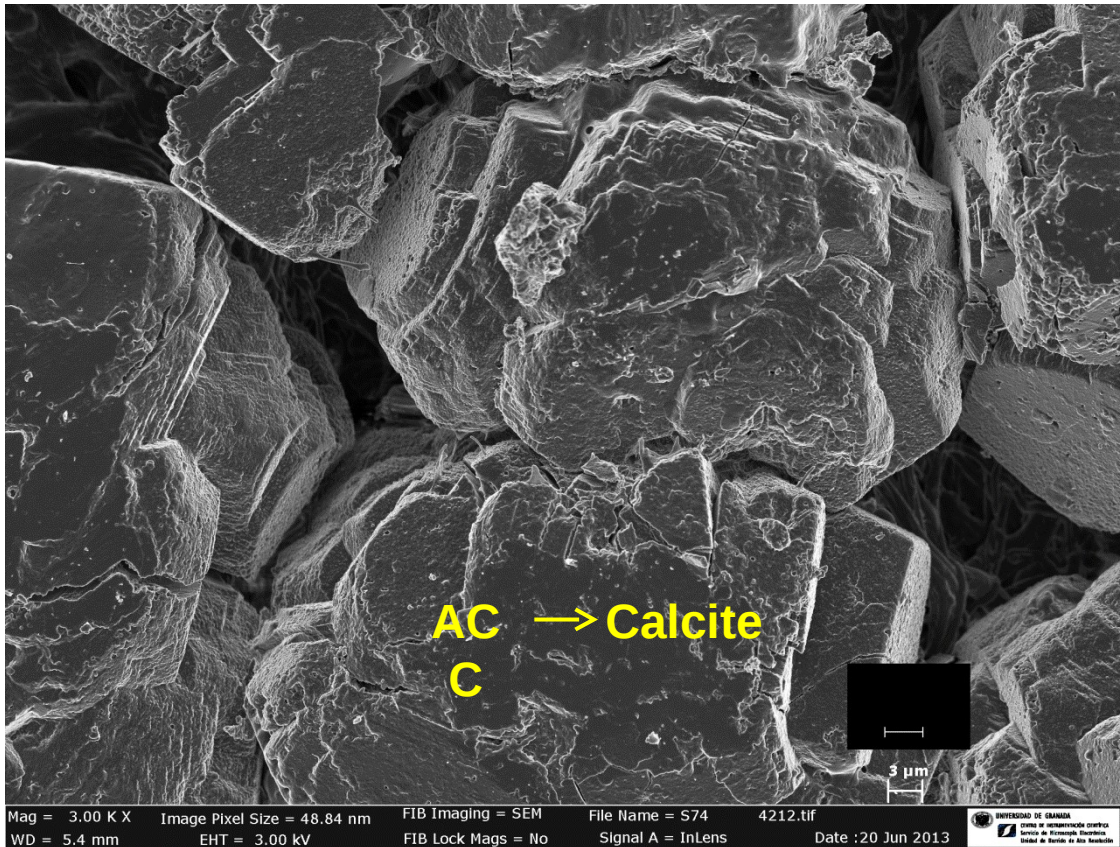


Time 2 (6-7 h post ovulation): Interface-coupled dissolution precipitation process

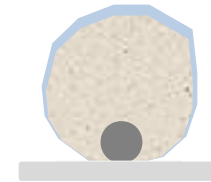
Direct transformation of ACC into calcite aggregates on mammillary knobs

La formation de la coquille

Role of amorphous calcium carbonate (ACC)



Large calcite crystal units deposition

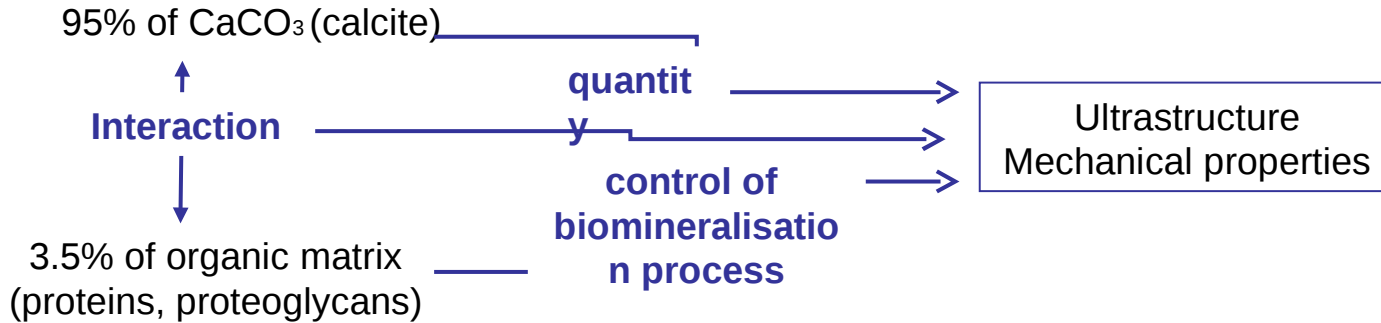


Time 3 (>7h post ovulation):
Additional cristallisation events
on calcite template

La matrice organique

✓ **Organic matrix plays a key role**

determine the texture of the shell and its resulting mechanical properties

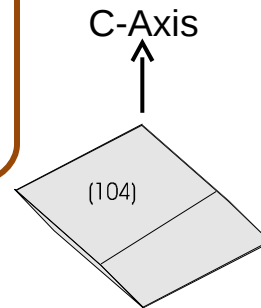


Calcium carbonate (calcite)

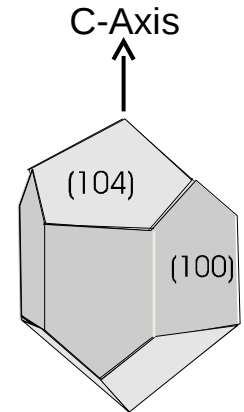


Organic matrix

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



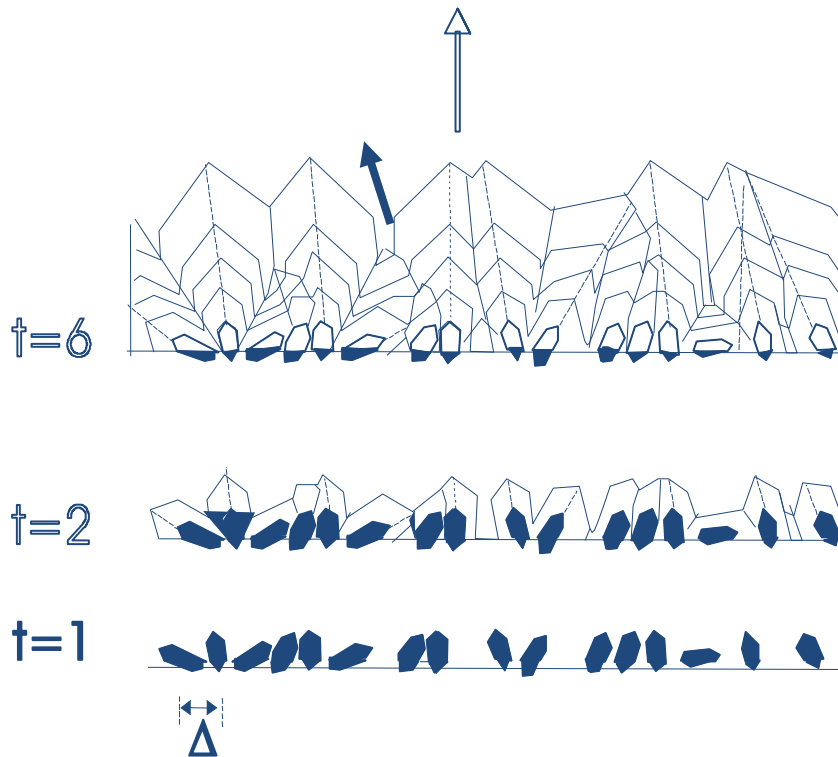
Interaction



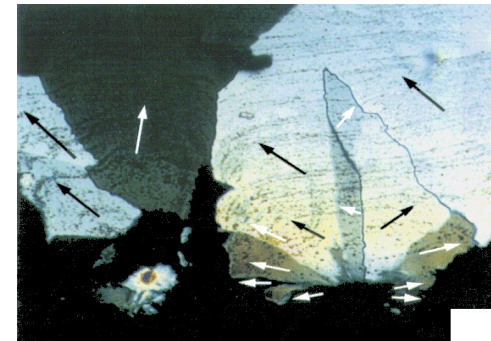
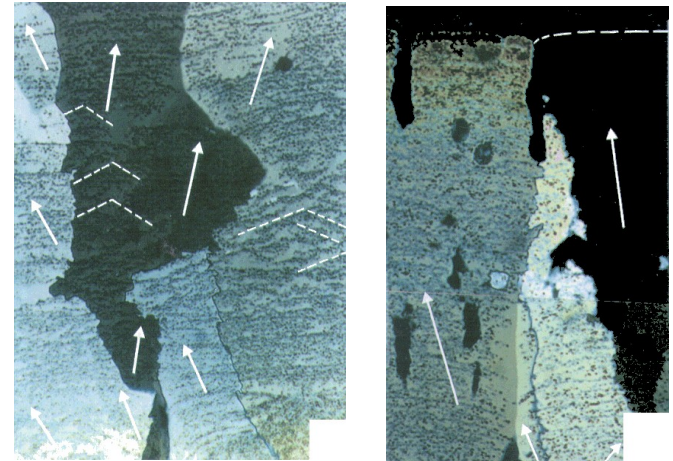
La matrice organique

Détermine la microstructure du biomatériau

- ✓ The avian eggshell is a complex and highly structured calcitic bioceramic
- ✓ Competitive crystal growth
- ✓ Mineral-binding proteins guide crystal growth (organic matrix control)

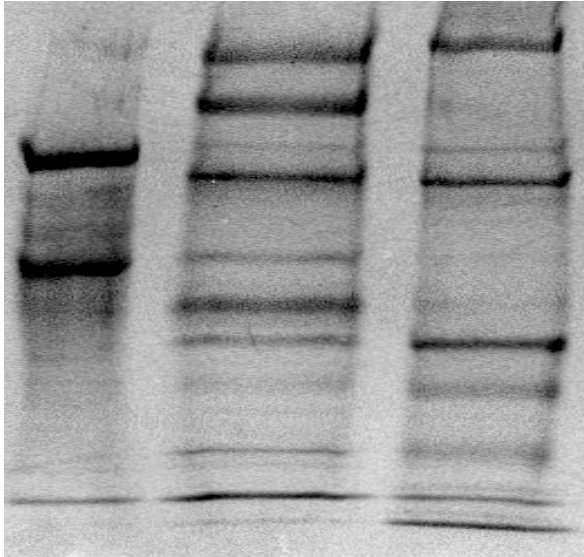


Rodriguez-Navarro et al., 2000; Nys et al., (2004)



Images: J.M. Garcia-Ruiz, Granada

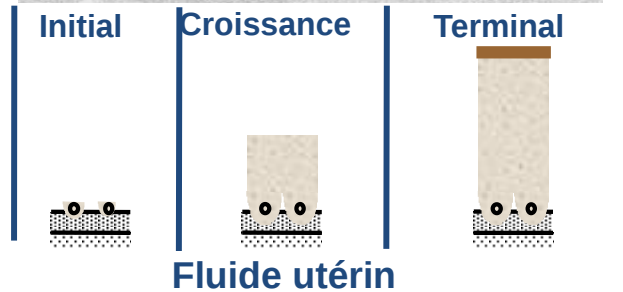
Protéines de la matrice et minéralisation de la coquille



Composition variable du fluide utérin au cours du processus de calcification



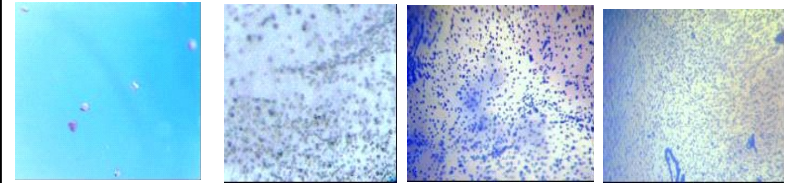
Adaptation du contenu organique selon le stade de minéralisation



Protéines de la matrice et minéralisation de la coquille

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

Augmente le nombre de cristaux



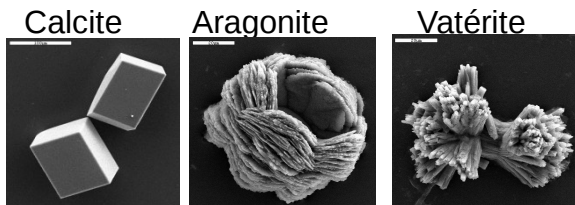
Témoins
40 cristaux

Initiale Croissance Terminale
Fluide utérin >10 000 cristaux

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

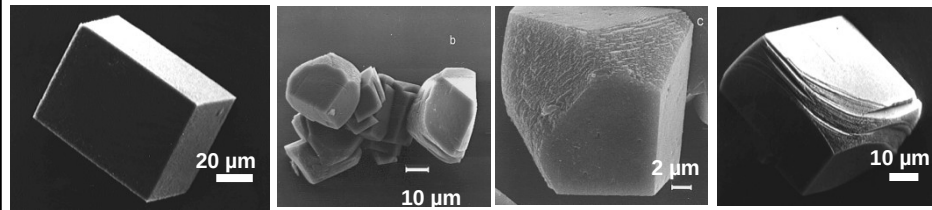
(*Poultry Sci.*, 2000, 79, 901-907 ; *J. Crystal Growth*, 2008, 310, 1754-1759 ; *Cryst. Growth. Des.*, 2008, 8, 4330-4339)

Favorise la calcite comme type polymorphique



	Calcite	Aragonite	Vatérite
Témoins (%)	55	22.5	22.5
Fluide utérin (%)	100	0	0

Modifie la morphologie des cristaux de calcite



Témoin

Initiale

Croissance
Fluide utérin

Terminale

Identification des protéines de l'œuf

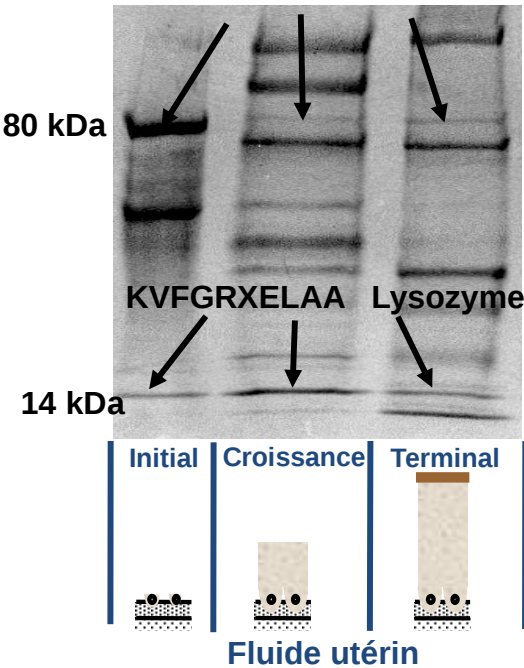
Les techniques classiques

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

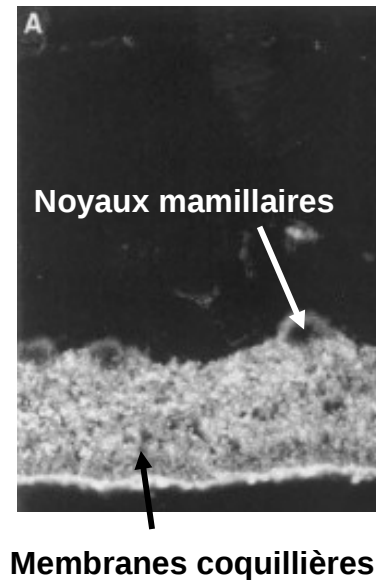
Les protéines préalablement identifiées par des techniques « classiques »

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

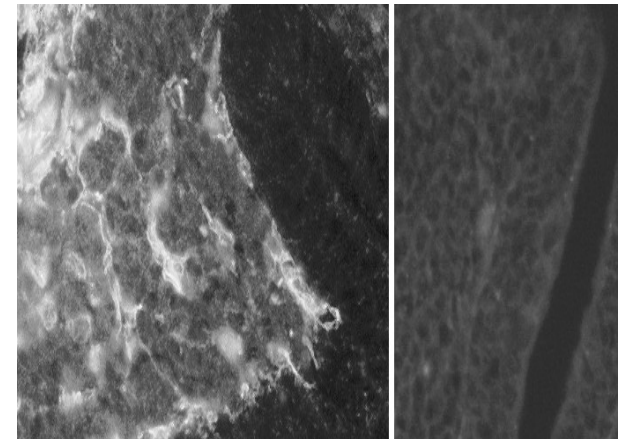
APPKSVIRXXTISS Ovotransferrine



Localisation du lysozyme dans la coquille



Origine utérine de l'ovotransferrine



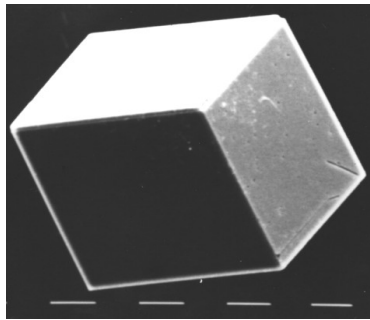
- **Présentes dans la coquille**
- **sécrétées par les tissus où se forme la coquille**

Les protéines préalablement identifiées par des techniques « classiques »

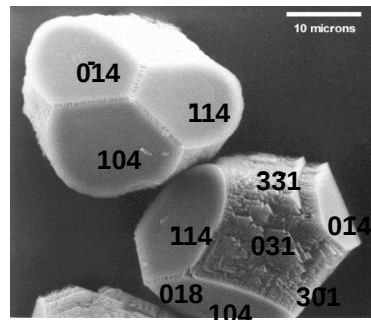
□ **lysozyme** (*Matrix Biol.*, 2000, 19, 443-453) **et ovotransferrine** (*Connect. Tissue. Res.*, 2001, 42, 225-267)

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

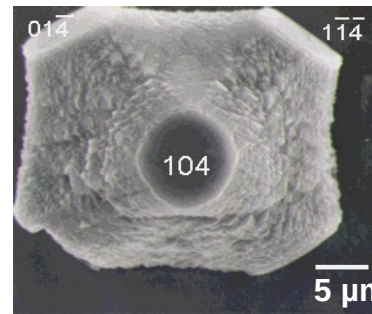
Interaction avec le carbonate de calcium



Témoi



Ovotransferrine



Lysozyme

➤ Jouent un rôle antimicrobien (protection chimique de l'œuf et de l'embryon)

* Ovotransferrine → Inhibe la croissance des bactéries à Gram négatif par privation de fer

* Lysozyme → Hydrolyse la paroi des bactéries à Gram positif

Identification des protéines de l'œuf

Les techniques classiques

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

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

Les développements récents

✓ 2004, Publication de la séquence génomique de la poule



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

Sequences included in UniGene	
Known genes are from GenBank	18 Aug 2012
ESTs are from dbEST through	18 Aug 2012
33,838	mRNAs
683	Models
0	HTC
11,088	EST, 3reads
418,700	EST, 5reads
79,390	EST, otherunknown
543,699	total sequences in clusters

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



Banques cDNA et EST

Le but

- * Identifier les gènes fonctionnels

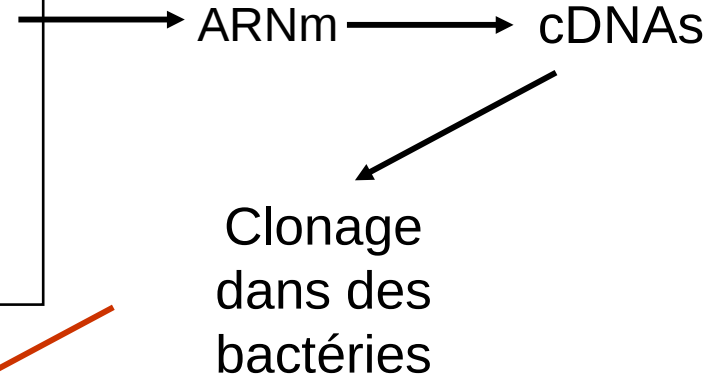
Méthode

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

Recueil des tissus:

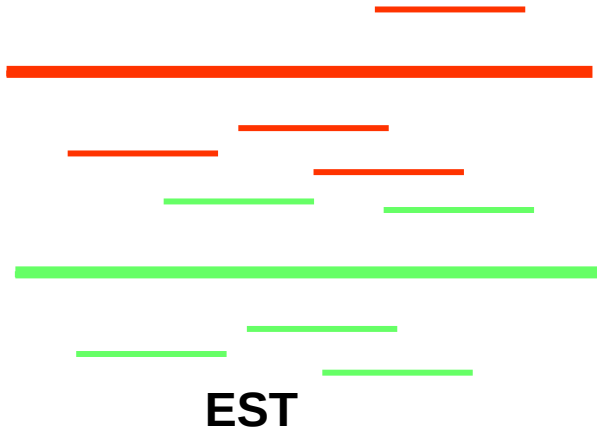
Nombreuses fonctions biologiques :
(Tissus reproducteurs, système digestif,
Système nerveux central, foie, intestin, rate,
...)

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



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

Banques cDNA et EST



Assembled into a genome-wide non-redundant catalog of expressed genes (Unigenes)

Main projects for poultry:

University Delaware (<http://www.chickest.udel.edu/>)

University of Manchester (<http://www.chick.umist.ac.uk/index.html>)

Inra (<http://www.siginae.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.siginae.org:9090/Gallus_gallus/index.html)

Banques cDNA et EST

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

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

Séquençage des Protéines et traduction en nucléotides

Protein sequencing of OCX-32

N terminal sequence

ERLPWPQVPGVMHPLNPKHREAV

Internal peptide sequences

CB3	GLAIVGSSH(I)
CB4	YLV
	ERLPW
K1	X(Q)IRK
K2	(G)NF
K3	KSPXVVHAK
K4	DNAVAFK
K5	X(Q)IRXDNAVAFK
K6a	(Q)IQEED(HR)FYE(YLQ)
K6b	KIQEED HR FYE(YLQ)
K7a	KQSTEHTGYLLAQVSS(V)K
K7b	QSTEHTGYLLAQVSS(V)K
K8	YLVWTLGHPIRVK
K9	FIVLLHEIPTQQLNVX(H)
K10	KPITANYIPDŠ(N)GNIA(HDH)

Traduction en séquences
nucléotidiques
(code dégénéré)

Leucine : 6 codons

(UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG)

Acide aspartique : 2 codons (GAU, GAC)

Méthionine : codon unique (AUG)

Milliers de combinaisons possibles
Utilisation d'outils bioinformatiques

Banques cDNA et EST

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

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

Séquençage des Protéines et traduction en nucléotides

N terminal sequence	
ERLPWPQVPGVMHPLNPKHREAV	
Internal peptide sequences	
CB3	GLAIVGSSH(I)
CB4	YLV
	ERLPW
K1	X(Q)IRK
K2	(G)NF
K3	KSPXVVHAK
K4	DNAVAFK
K5	X(Q)IRXDNAVAFK
K6a	(Q)IQEED(HR)FYE(YLQ)
K6b	KIQEED HR FYE(YLQ)
K7a	KQSTEHTGYLLAQVSS(V)K
K7b	QSTEHTGYLLAQVSS(V)K
K8	YLVWTLGHPIRVK
K9	FIVLLHEIPTOQLNVX(H)
K10	KPITANYIPDŠ(N)GNIA(HDH)

Traduction en séquences
nucléotidiques
(code dégénéré)

Recherche dans les bases de données
Banques de séquences EST (tblastN)

Identification des séquences EST
correctes

Banques cDNA et EST

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

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

* Full length cDNA sequence



Amino acid translation

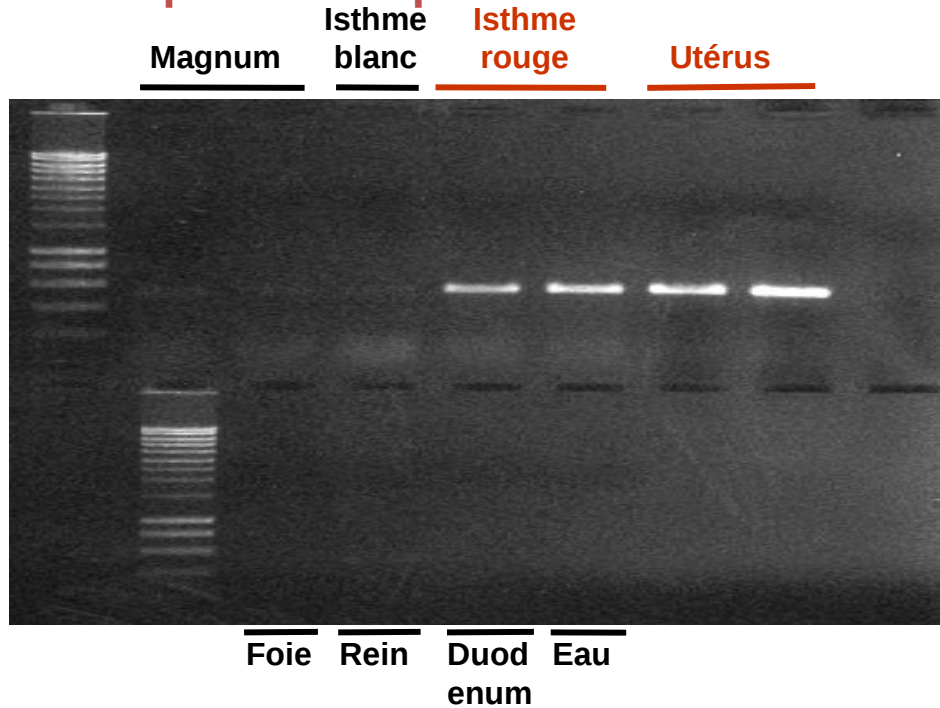
**EFGTSAAERLPWPQVPGVMRPLNPSHREAVWAAWTALHYINSHEASPSRP
LALHKVVKAASKMIPRLGWKYYVHCTTEGYIHGENAGSCFATVLYLKKSP
PVVHGKCVHAQNKKQIQEEDHRFYEYLQHQKKPITANYIPDSNGNIAHDH
LQLWGLAIVGSSYIMWKQSTEHTGYLLAQVSSVKQQIRKDNAVAFKFIVL
LHEIPTQQLNVCHMYLVWTLGHPIRVKYSCAPDNHGLEDSGQDSGSAAG
TSHETKGNF**

Banques cDNA et EST

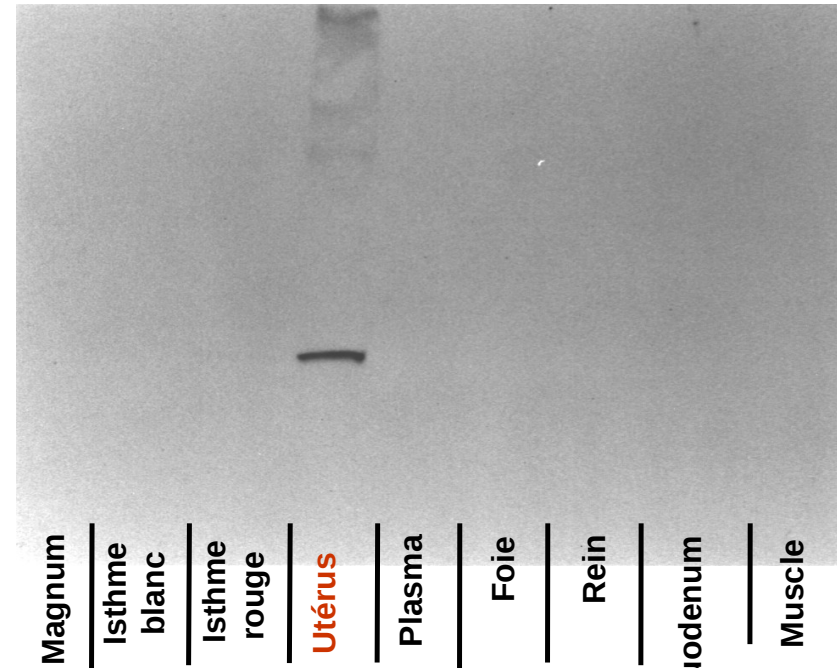
➤ Nouvelles séquences protéiques non identifiées au préalable (protéines spécifiques de la coquille)

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

➤ Uniquement exprimée dans les tissus où se forme la coquille



RT-PCR de l'ovocalyxine-32



Western blot de l'ovocalyxine-32

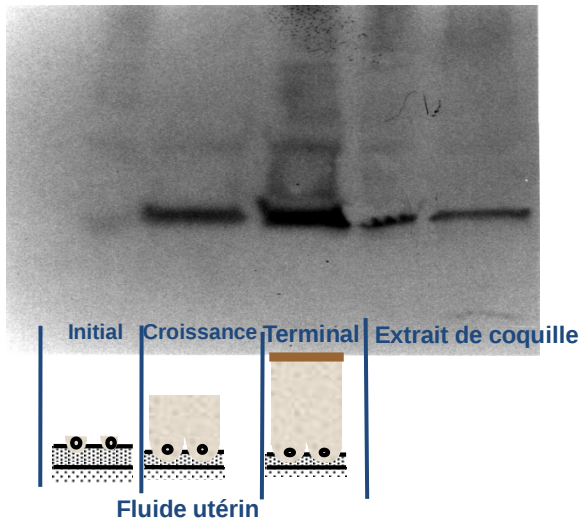
Banques cDNA et EST

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

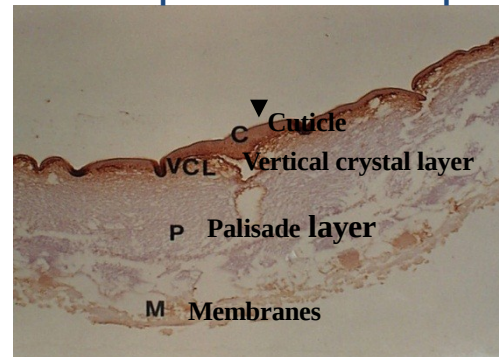
□ **Ovocalyxin -32** (*J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 39243-39252)

➤ Impliquée dans le processus d'arrêt de la calcification

Abondante au stade terminal



Abondante dans les couches supérieures de la coquille



➤ Joue un rôle antimicrobien (protection chimique de l'œuf et de l'embryon)

- Inhibiteur de carboxypeptidase
- inhibe la croissance de *Bacillus subtilis*

(*Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Bio*, 2007, 147, 172-177)

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

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

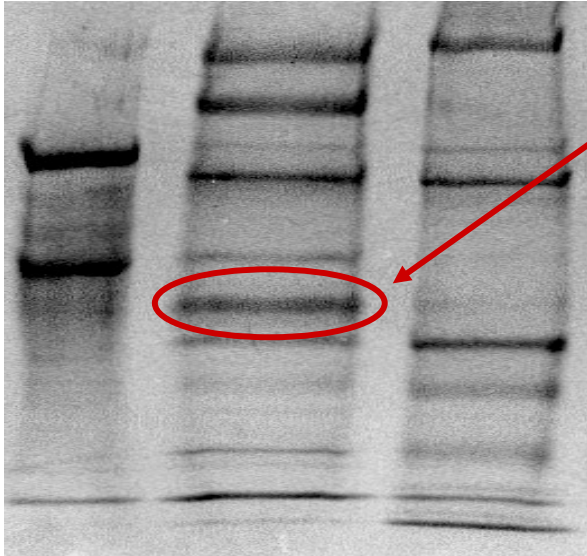
Cloning of Ovocalyxin-36, a Novel Chicken Eggshell Protein Related to Lipopolysaccharide-binding Proteins, Bactericidal Permeability-increasing Proteins, and Plunc Family Proteins*

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

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

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

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

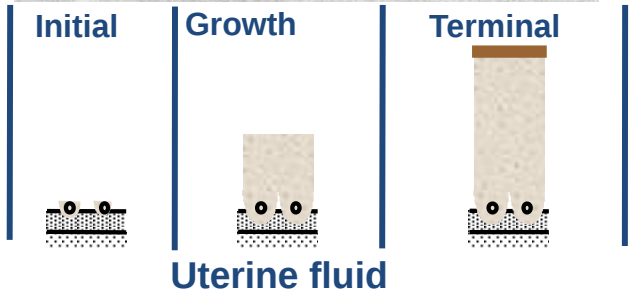


36 kDa Band

N-terminal Amino acid sequencing :
VLGSGLSCAISPRAMQQVLSDAIIQTGGL

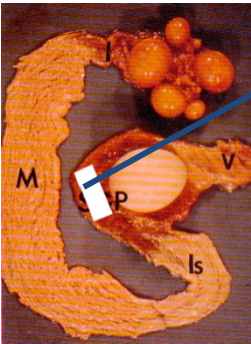
No correspondences in databases

Specific antibodies



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

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



RNA prepared from uterus harvested during the shell calcification

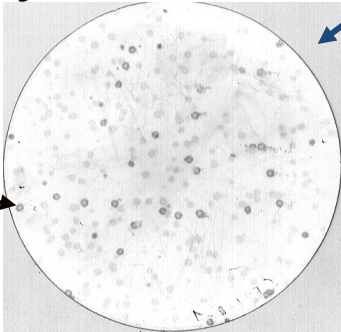
Preparation of a bacteriophage cDNA expression library

OCX-36 specific dies



Expression screening of the cDNA

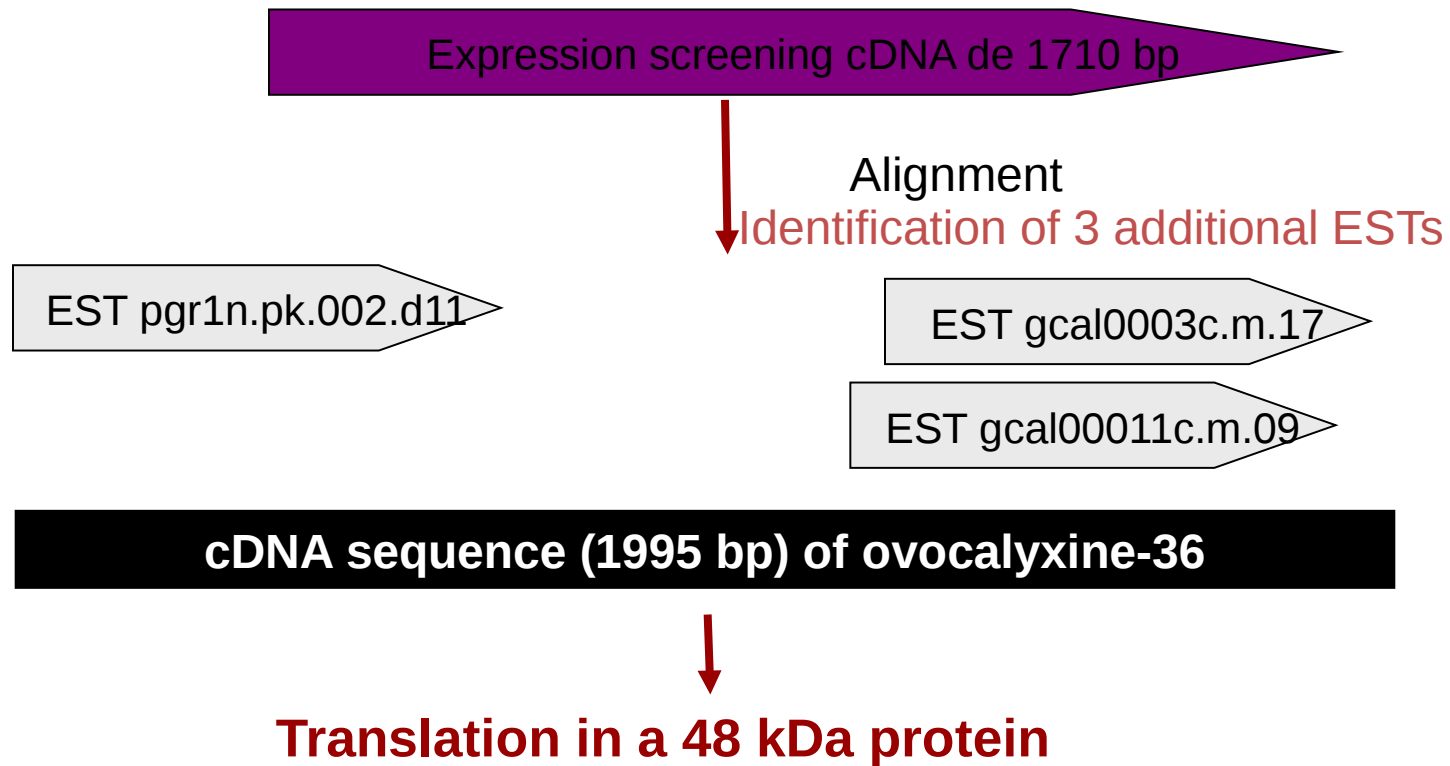
cDNA sequence of positive clones



cDNA sequence of 1710 bp

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

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



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

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

Analyse bioinformatique des séquences génomique, cDNA et protéique

Séquence cDNA de OCX 36

Aucune homologie avec des séquences répertoriées

Séquence en acides aminés

Identité et similarité limités avec “lipopolysaccharide binding proteins (LBP)”, “bactericidal permeability increasing protein (BPI)” et “Plunc families proteins”

20-25 % résidus identiques

39-44 % substitutions conservatives

Expected value 10^{-4} to 10^{-28}

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

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

5'

3'

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

Identification de la séquence génomique de l'Ovocalyxin-36
Chromosome 20
Position 9842171 et 9842177

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

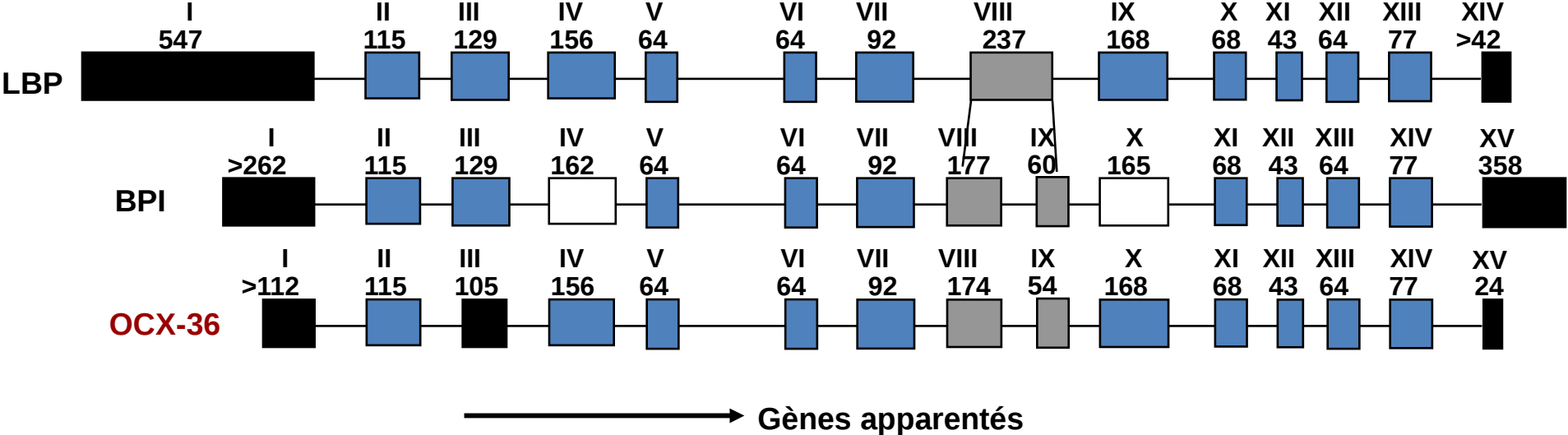
Ovocalyxin-36, une protéine spécifique de la matrice organique de la coquille

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

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

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

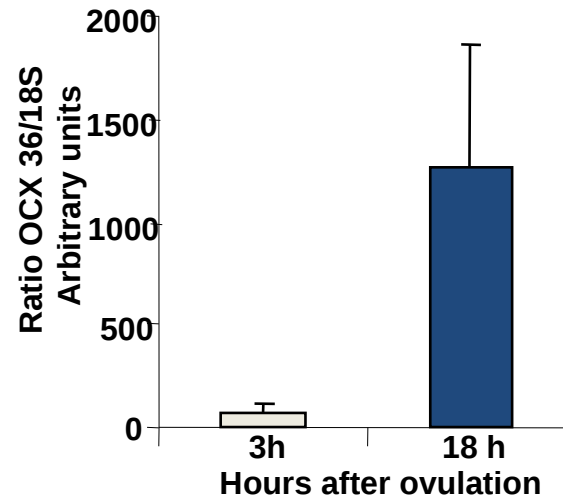
Architecture du gène



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

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

Expression de l'OCX-36 à différentes conditions physiologiques



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

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

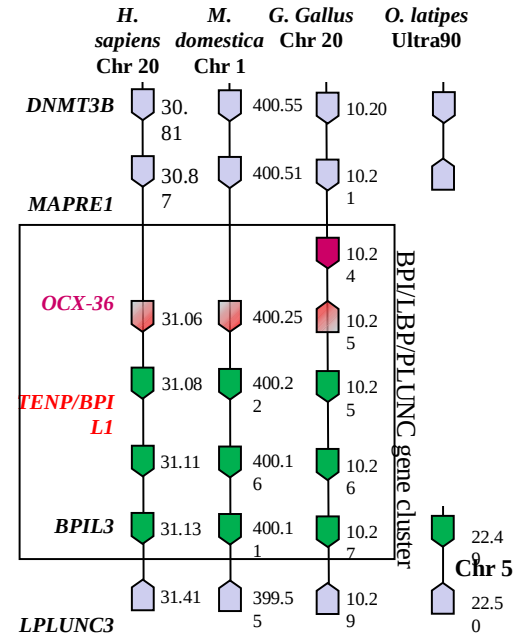
BIOLOGY OF REPRODUCTION 83, 893–900 (2010)
 Published online before print 11 August 2010.
 DOI 10.1095/biolreprod.110.085019

Minireview

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

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

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



Developmental and Comparative Immunology xxx (2010) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Developmental and Comparative Immunology

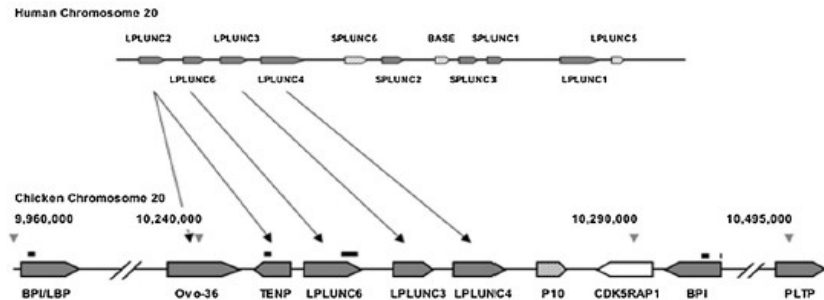
journal homepage: www.elsevier.com/locate/dci



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

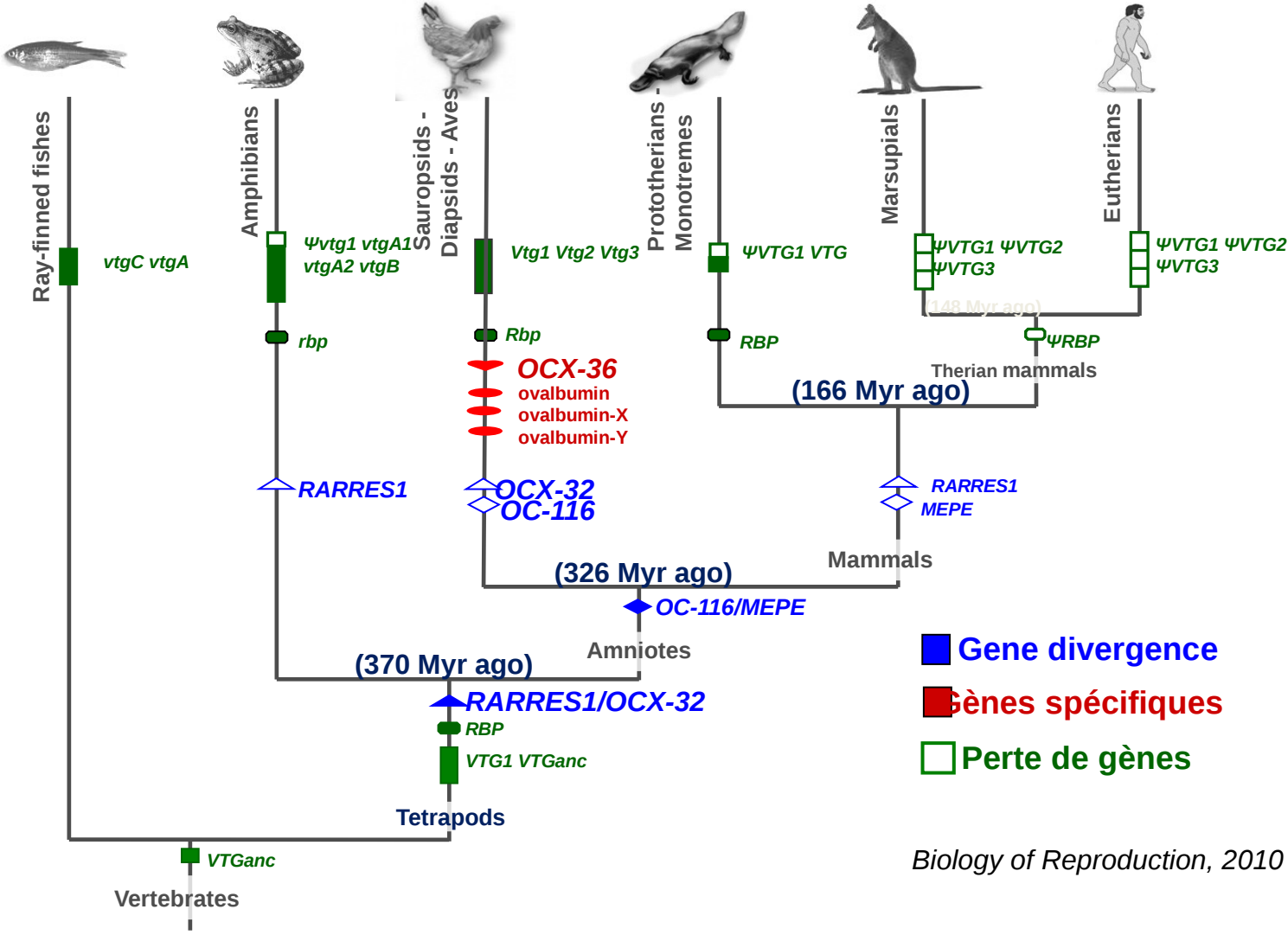
Shih-Chieh Chiang^{a,1}, Edwin J.A. Veldhuizen^b, Frances A. Barnes^a, C. Jeremy Craven^c, Henk P. Haagsman^b, Colin D. Bingle^{a,*}

^a Academic Unit of Respiratory Medicine, Department of Infection and Immunity, University of Sheffield, Sheffield S10 2JF, UK
^b Department of Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, P.O. Box 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



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

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



Identification des protéines de l'œuf

Les techniques classiques

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

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

Les développements récents

✓ 2004, Publication de la séquence génomique de la poule

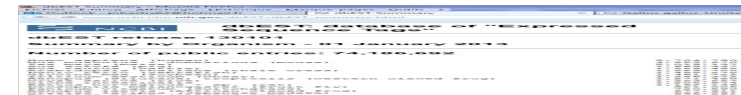


✓ Genome-wide non redundant catalog of 33 838 different genes

The image is a screenshot of the NCBI UniGene database interface for Gallus gallus. The top navigation bar includes links for PubMed, Protein, Genome, Structure, PopSet, Taxonomy, and OMIM. A search bar contains 'Gallus gallus[organism]' and buttons for 'Go' and 'Clear'. Below the search bar, the text reads 'Gallus gallus: UniGene Build #46'. A 'Lineage' section lists taxonomic categories from cellular organisms to Gallus gallus. A table lists the number of sequences included in UniGene: 33,838 mRNAs, 683 Models, 0 HTC, 11,088 EST, 3reads, 418,700 EST, 5reads, 79,390 EST, otherunknown, and 543,699 total sequences in clusters. On the right, there is a small image of two chicks and a 'UniGene Links' section with links to Clusters, Library Browser, DDD, Query Tips, FAQ, and Finding cDNAs.

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

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



« omics » to identify novel egg proteins



- ✓ **Transcriptomics** (*microarrays, RNA seq...*)

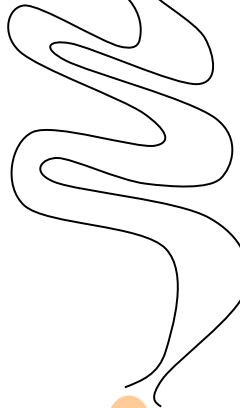


Liver:
Egg yolk proteins (several weeks)

0 h



Ovary and infundibulum:
Vitelline membranes (less 1 h)



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

Isthmus:
eggshell membranes (4h30 to 6 h)

Uterus:
eggshell calcification (6 to 24 h)

24 h

Egg formation *Spatial and temporal regulation*

Different tissues or organs
Egg components are deposited at different times
Different physiological stages



Comparison of gene expression in the
various segment of the reproductive tract

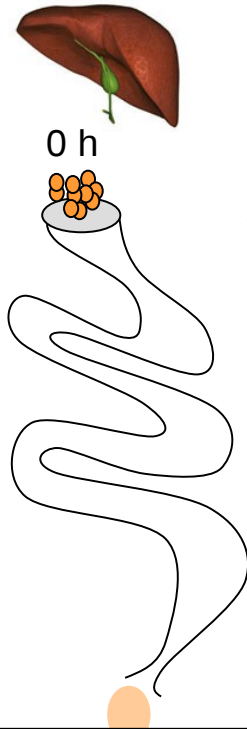


Quantification of genes specifically related to the egg yolk, the vitelline membranes, the egg white, the eggshell membranes and the eggshell calcification process

« omics » to identify novel egg proteins



✓ **Transcriptomics** (*microarrays, RNA*)



Liver: 582 ←
Egg yolk proteins (several weeks)

Ovary and infundibulum:
Vitelline membranes (less 1 h)

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

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

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

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



RESEARCH ARTICLE

Open Access

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

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

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

Joël Gautron¹, Aurélien Brionne¹, Christelle Hennequet-Antier¹, Cédric Cabau¹, Nicolas Guyot¹, Larry Cogburn², Sophie Réhault-Godbert¹, Yves Nys¹

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

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

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



RESEARCH ARTICLE

Open Access

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

Vincent Jonchère¹, Sophie Réhault-Godbert¹, Christelle Hennequet-Antier¹, Cédric Cabau¹, Vonick Sibut^{1,3}, Larry A. Cogburn², Yves Nys¹, Joel Gautron^{1*}

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



RESEARCH ARTICLE

Open Access

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

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

I. Analyse exhaustive des protéines

II. Caractérisation des défenses

III. Variabilité des défenses

utiliser les outils à haut débit pour identifier les gènes et protéines impliqués dans la formation de l'ovule

✓ Proteomics

JOURNAL OF PROTEOMICS 75 (2012) 2697–2706

Available online at www.sciencedirect.com

ELSEVIER

SciVerse ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle

Megan Rose-Martel, Jingwen Du, Maxwell T. Hincke*

Proteomics 2013, 13, 3523–3536 DOI 10.1002/pmic.201300286 3523

RESEARCH ARTICLE

Differential label-free quantitative proteomic analysis of avian eggshell matrix and uterine fluid proteins associated with eggshell mechanical property

Congjiao Sun, Guiyun Xu and Ning Yang

JOURNAL OF PROTEOMICS 119 (2015) 178–193

Available online at www.sciencedirect.com

ELSEVIER

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

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,*}

JOURNAL OF PROTEOMICS 116 (2015) 81–96

Available online at www.sciencedirect.com

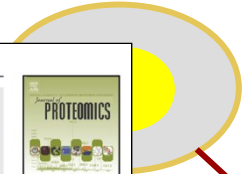
ELSEVIER

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

Novel identification of matrix proteins involved in calcitic biomineralization

Megan Rose-Martel, Sandy Smiley, Maxwell T. Hincke*



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

Karlheinz Mann, Boris Maček and Jesper V. Olsen

106 DOI 10.1002/pmic.200600635 Proteomics 2007, 7, 106–115

RESEARCH ARTICLE

Phosphoproteins of the chicken eggshell calcified layer

Karlheinz Mann, Jesper V. Olsen, Boris Maček, Florian Gnad and Matthias Mann

Max-Planck-Institute for Biochemistry, Department of Proteomics and Signal Transduction, Martinsried, Germany

Connective Tissue Research, 48:1–8, 2007
Copyright © Informa Healthcare
ISSN: 0300-8207 print / 1521-0456 online
DOI: 10.1080/03008200601003116

ORIGINAL RESEARCH

Proteins of Insoluble Matrix of Avian (Gallus Gallus) Eggshell

Ivan Mikšík and Adam Eckhardt
Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, and Cardiovascular Research Centre, Prague, Czech Republic

Pavla Sedláková and Katerina Mikulikova
Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Anal Bioanal Chem (2010) 397:205–214
DOI 10.1007/s00216-009-3326-3

ORIGINAL PAPER

Determination of insoluble avian eggshell matrix proteins

Ivan Mikšík · Pavla Sedláková · Katerina Lacinová · Statis Pataridis · Adam Eckhardt

« omics » to identify novel egg proteins



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

>3600 protein identifiers in the different egg proteomes from 3 different databases
IPI (closed), GeneBank and UniProt



Lot of redundancies
Majority of them were not annotated



Data mining and bioinformatics tools



Loading of the sequences, multi alignment to eliminate redundancies



725 non redundant eggshell proteins



Update of functional annotations

Eggshell proteins and physical defence

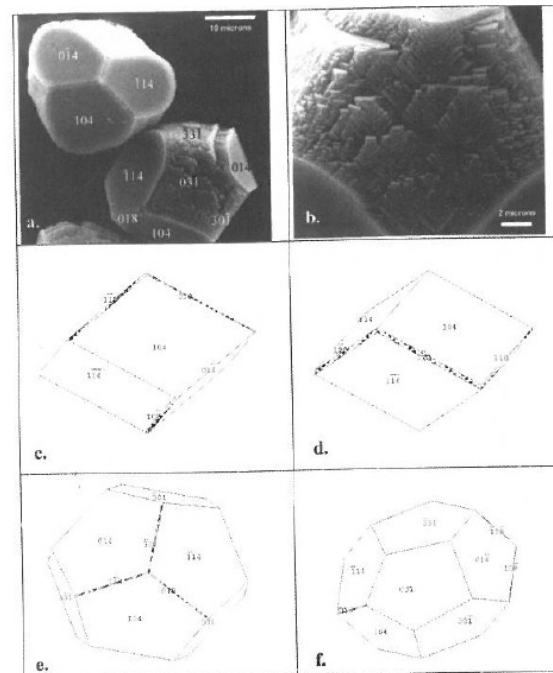
➤ calcification process

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

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

Ovotransferrin is a Matrix Protein of the Hen Eggshell Membranes and Basal Calcified Layer

J. GAUTRON^a, M.T. HINCKE^b, M. PANHELEUX^a, J.M. GARCIA-RUIZ^c, T. BOLDICKE^d and Y. NYS^{a,*}



Proteins interact with minerals to influence the morphology of crystals

Eggshell proteins and physical defence

➤ calcification process

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

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

Angewandte
International Edition
Chemie

DOI: 10.1002/anie.201000679

Biomaterialization

Structural Control of Crystal Nuclei by an Eggshell Protein**

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

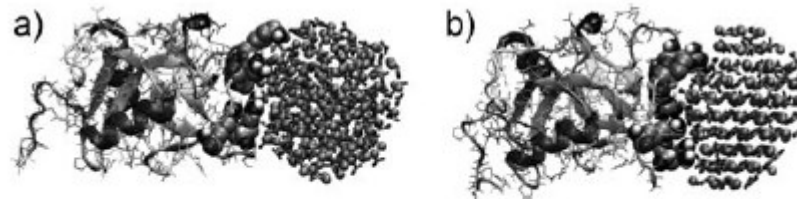
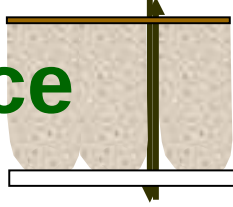


Figure 1. Ovocleidin-17 bound to an amorphous (a) and a crystallized (b) calcium carbonate nanoparticle containing 192 formula units. The

Eggshell proteins and physical defence



➤ calcification process

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

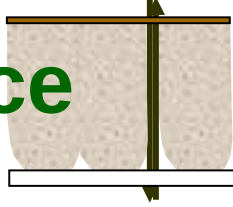
- *OC-17*
- *OC-116*
- *Ovotransferrin*
- *OCX-32*
- *Osteopontin*
- *Lysozyme*

✓ **Calcium binding proteins (CaBPs)** to interact with calcium to favour crystal nucleation or drive the morphology of crystals

Identification of numerous novel CaBPs

- *A total of 23 proteins with EF-hand and EGF-like calcium binding domains are present in the shell*

Eggshell proteins and physical defence

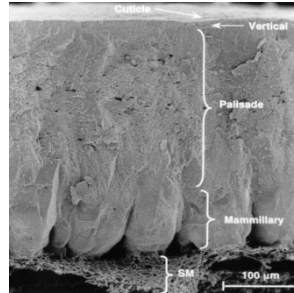
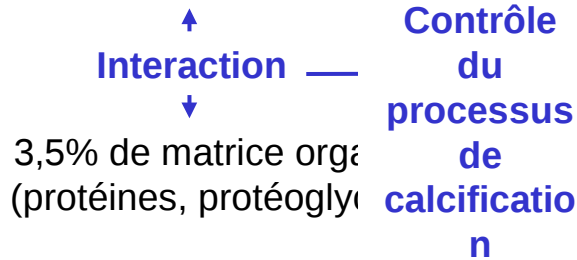


➤ **calcification process**

- Proteins involved in the **proper folding of the eggshell matrix**
- ✓ *An appropriate conformation of proteins is required to ensure calcium and mineral interactions and to ensure template to the mineralized structure*
 - *Molecular chaperone*
 - *Protein assisting folding*
 - *Proteins with interactive properties related to proteoglycans*
- **Regulation of the activity of proteins** related to the shell deposit
- ✓ *Shell mineralisation occurs in a non cellular milieu*
- ✓ *In situ by direct action of proteins to inhibit or activate the molecular actors present in the milieu.*
 - *Molecular chaperone which can interact with proteins might be involved in this regulation process.*
 - *Proteases and proteases inhibitors (specific and controlled role during calcification process, either by degrading proteins or regulating processing of proteins into their mature forms)*

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

95% de CaCO_3 (calcite)

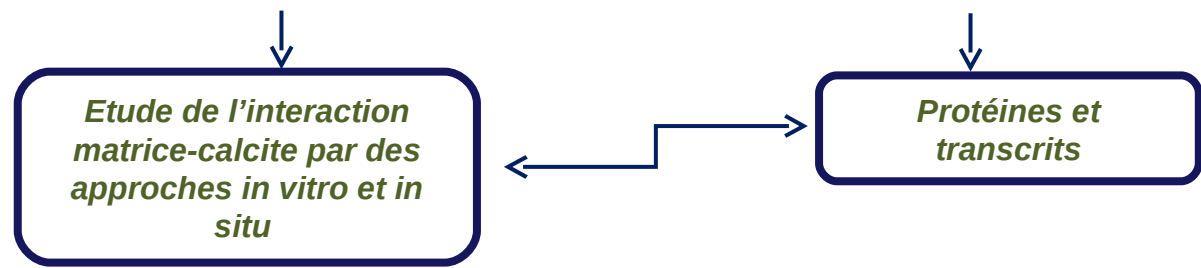


Approches globales et non hiérarchisées

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

Hiérarchiser les acteurs moléculaires prépondérants lors du processus de minéralisation

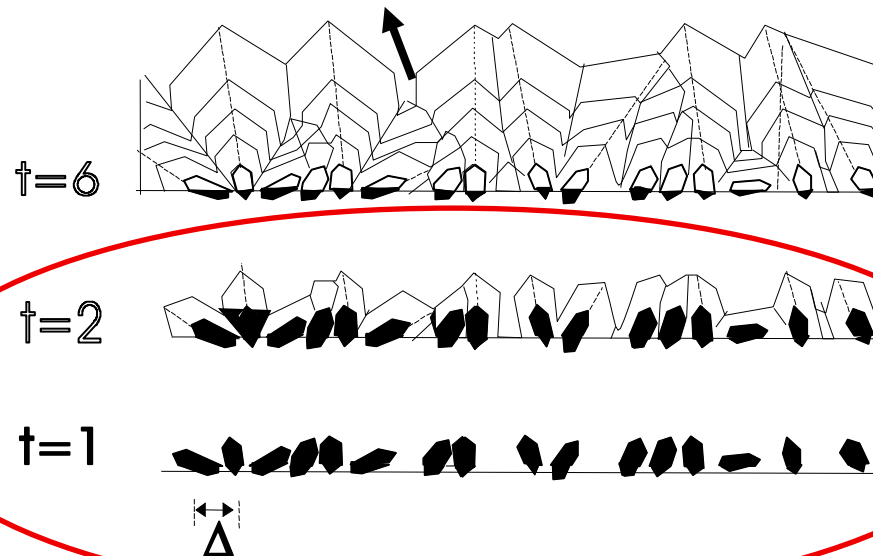
Etudes à différents stades de la minéralisation (poule et pintade)



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

□ Importance de l'initiation de la minéralisation

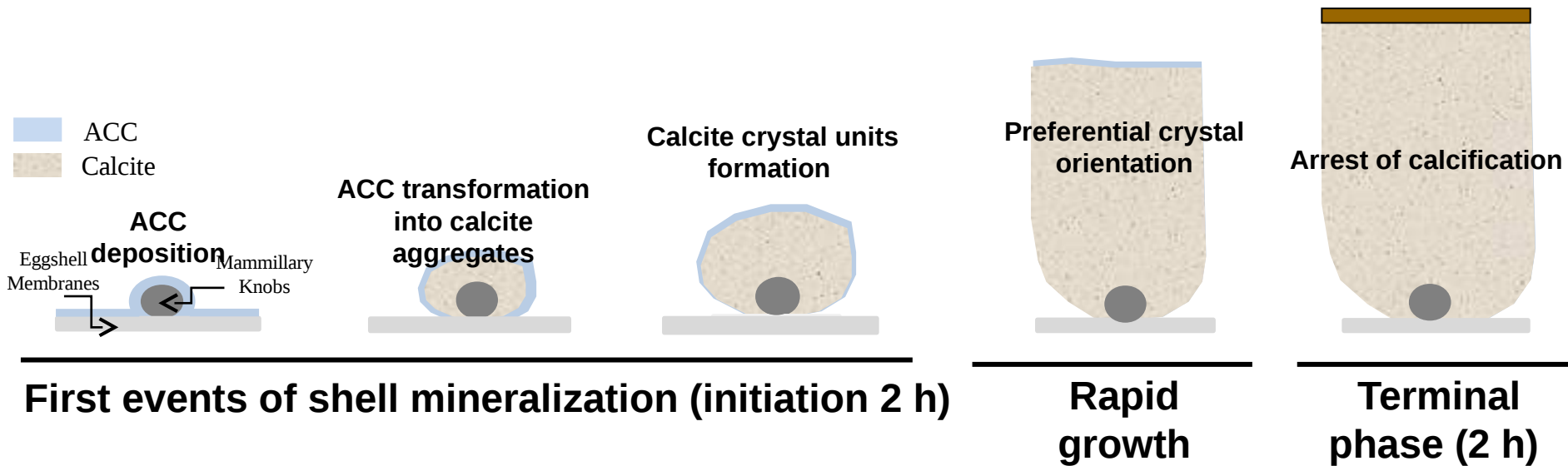
- Etape cruciale pour la suite de la biominéralisation
- Détermine les propriétés mécaniques de la coquille



Rodriguez-Navarro
and Garcia-Ruiz,
2000

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

Role of amorphous calcium carbonate (ACC) at pivotal stages of shell formation



First events of shell mineralization (initiation 2 h)

Rapid growth phase (12 h)

Terminal phase (2 h)

Role of organic matrix proteins at pivotal events

✓ Stabilization of amorphous calcium carbonate (ACC)

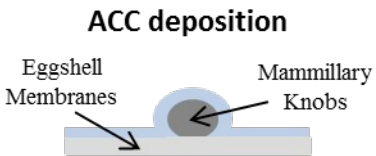
✓ Polymorphs, morphology and size of crystals



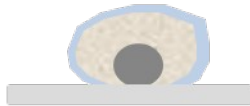
Impact (2013-2017)

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

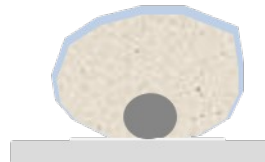
ACC
Calcite



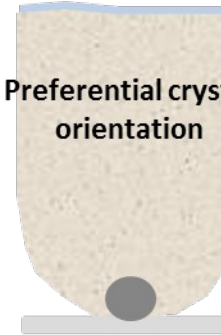
ACC transformation into calcite aggregates



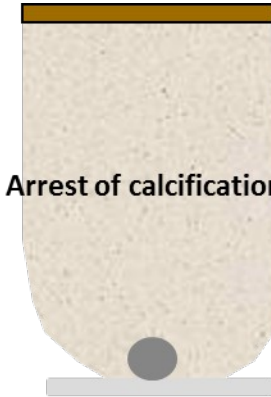
Calcite crystal units formation



Preferential crystal orientation



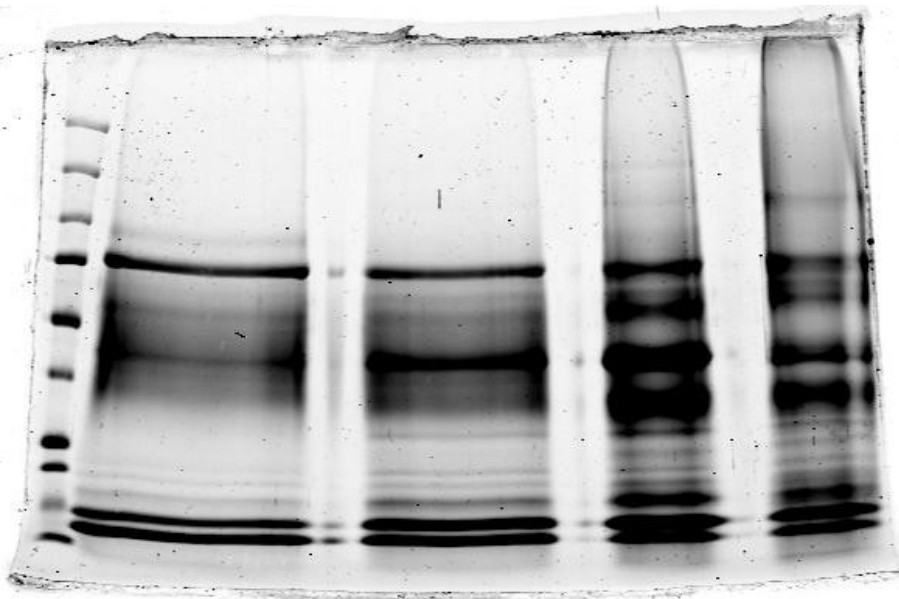
Arrest of calcification



First events of shell mineralization (initiation 2 h)

Rapid growth phase (12 h)

Terminal phase (2 h)



Analyse protéomique sur LTQ-VelosOrbitrap des bandes

Identification des protéines

Etablissement d'une liste non redondante de 316 protéines

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

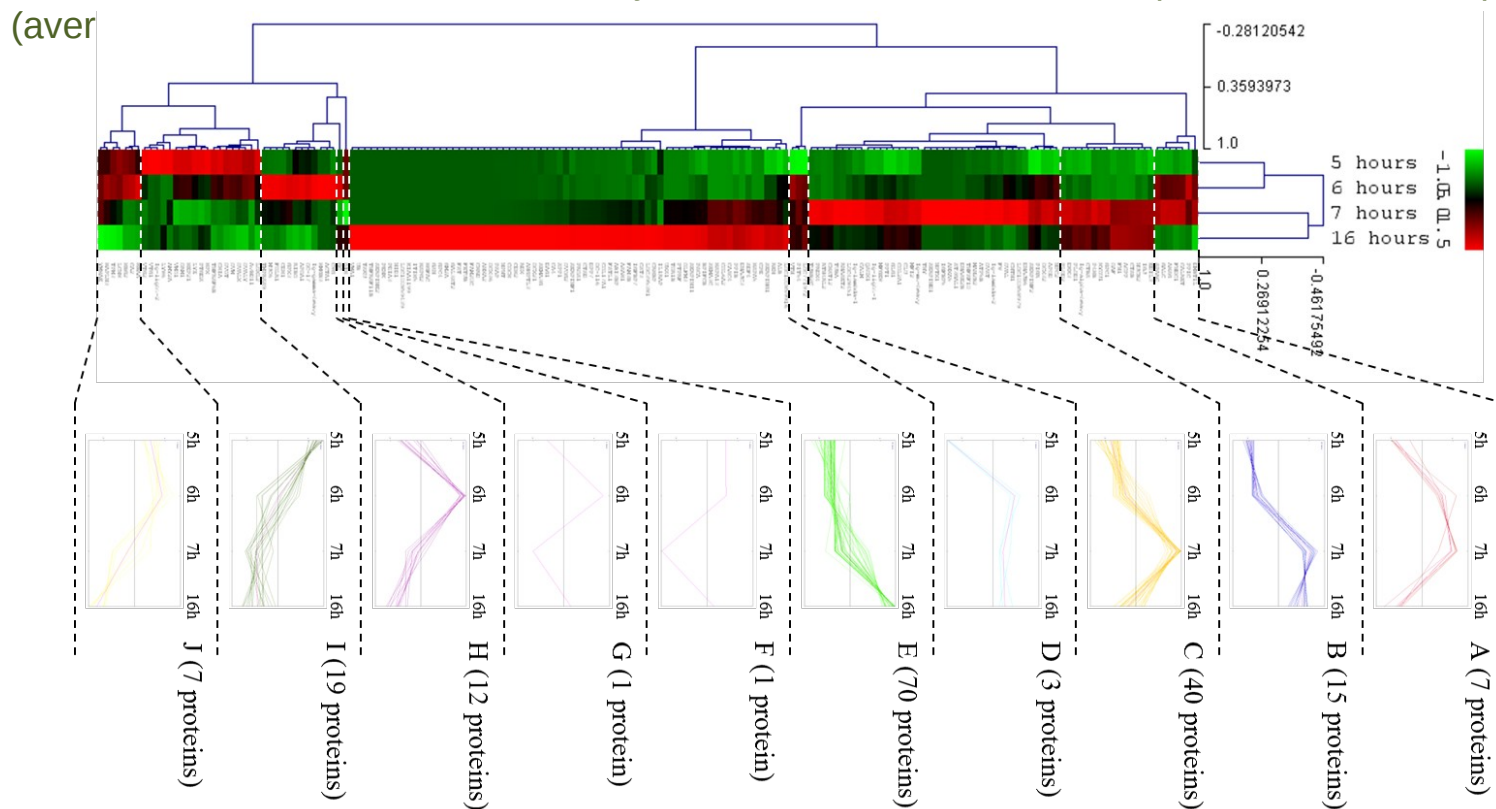
- **316 protéines quantifiées**
- **Détermination de l'abondance relative dans chacun des 5 stades**
- **Analyses statistiques**
 - ANOVA
Protéines ont des variations d'abondance significatives selon les stades
 - Cluster hiérarchique profils d'abondance protéique

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

Classement des protéines selon leur profil d'abondance

Réalisation d'un cluster hiérarchique pour les protéines quantifiées

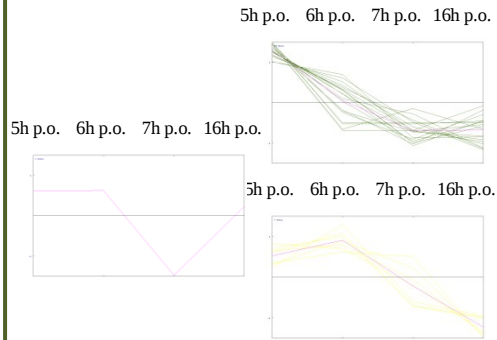
- Valeur moyenne centrée réduite pour limiter l'effet de la variance
- Calculs de distance entre individus : corrélation de Pearson
- Calculs de distance entre classe : moyenne des distances entre chaque individu de chaque classe (aver



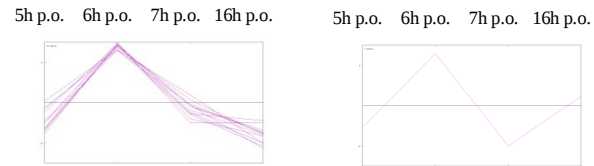
Etude spatio-temporelle des protéines impliquées dans la biominéralisation de la coquille des oiseaux

Classement des protéines selon leur profil d'abondance

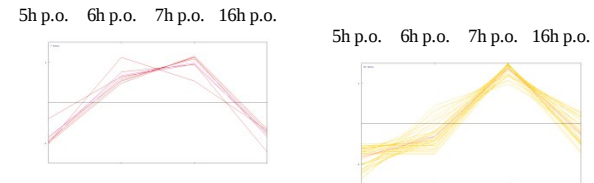
27 protéines overabundant during primary events of shell mineralization



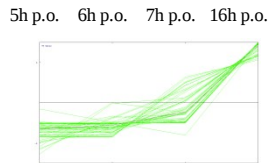
13 protéines overabundant during ACC transformation into calcite aggregates



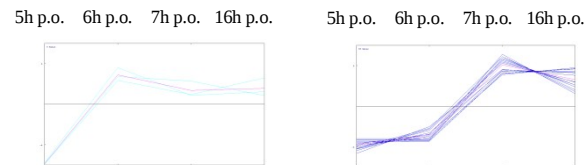
47 protéines overabundant when large calcite crystal units are formed



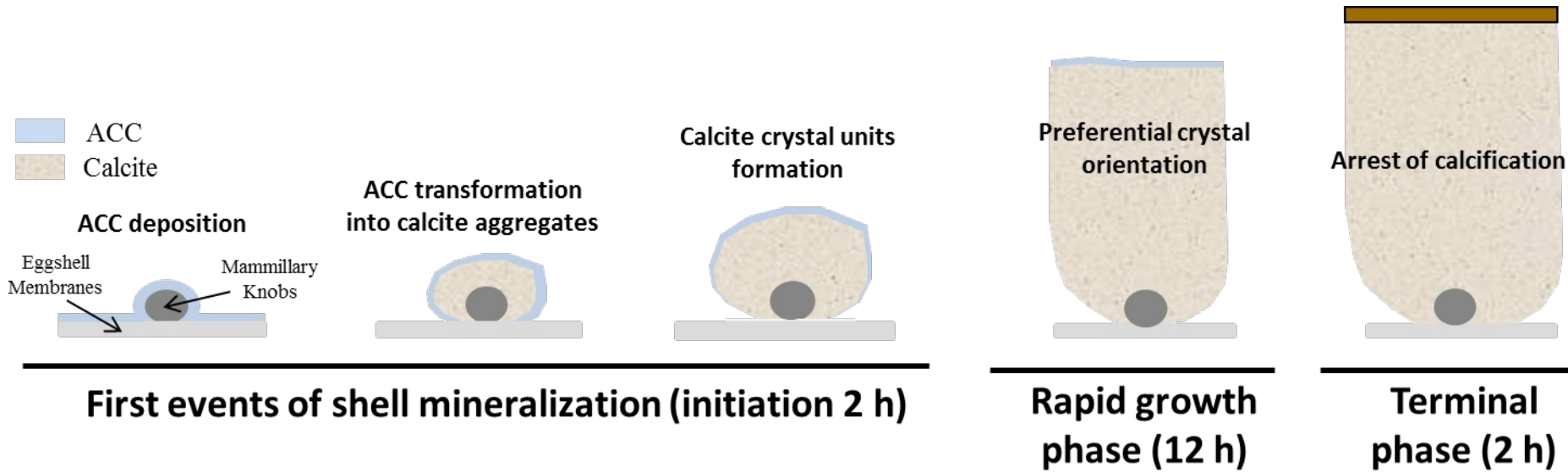
70 protéines overabundant during rapid growth phase



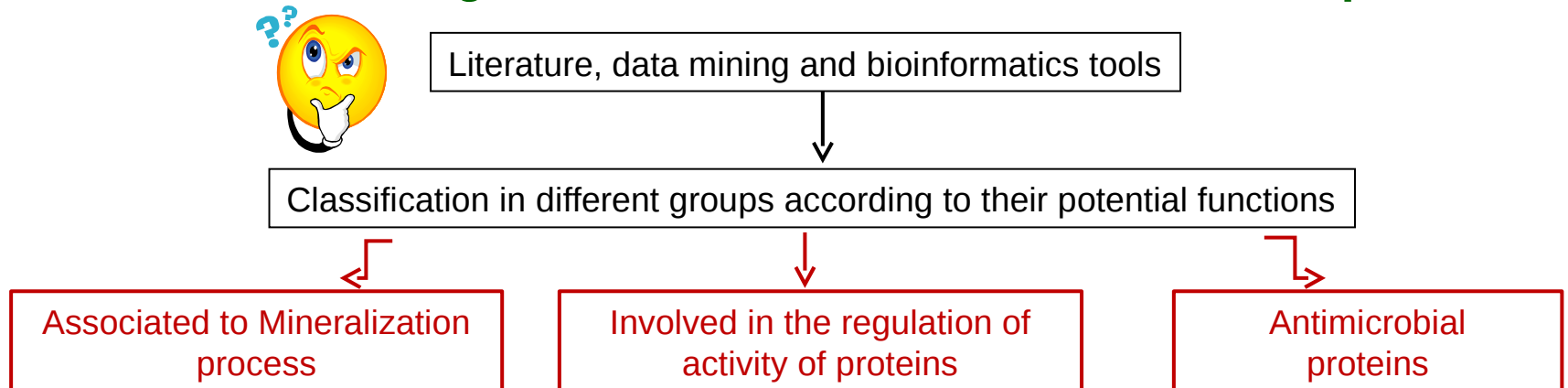
18 protéines overabundant at stages associated with the presence of calcite



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



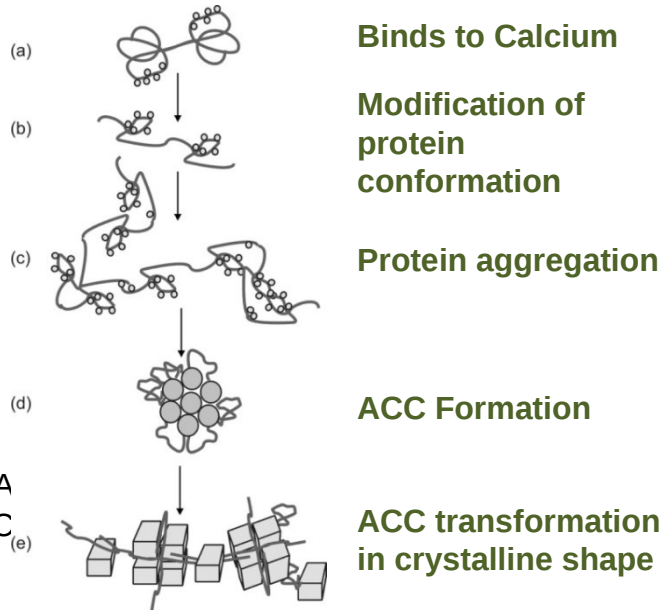
Functions and biological activities of the identified matrix proteins ?



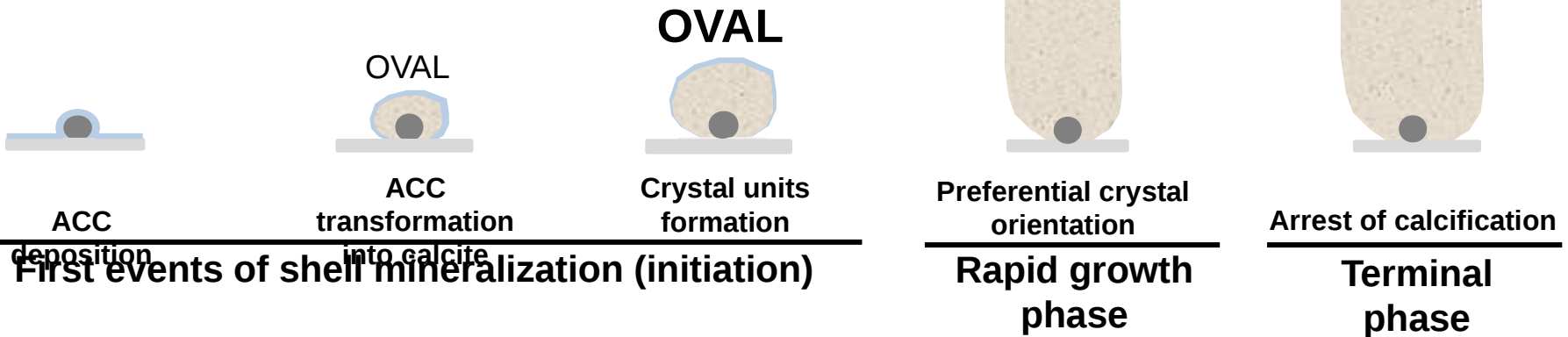
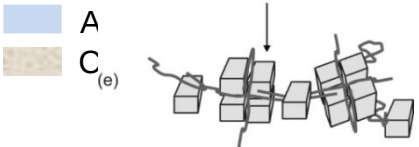
Proteins at pivotal events

Proteins having a direct involvement in eggshell mineralization

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



In vitro study of the role of Ovalbumin on CaCO₃ crystallization (Pipitch et al., 2008, Schwahn et al., 2003)



Proteins at pivotal events

Proteins having a direct involvement in eggshell mineralization

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

Freeman et al,
2010

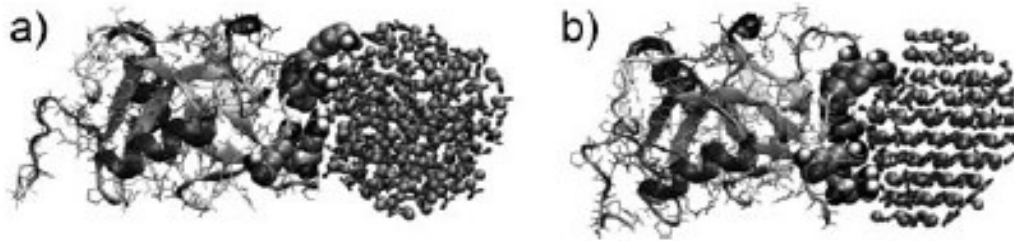
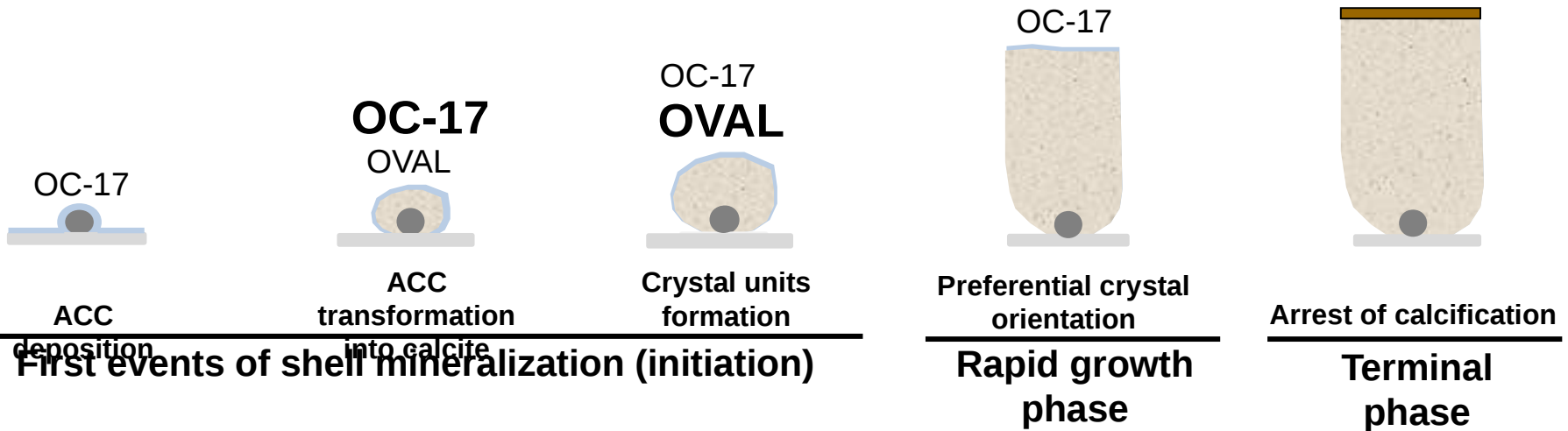


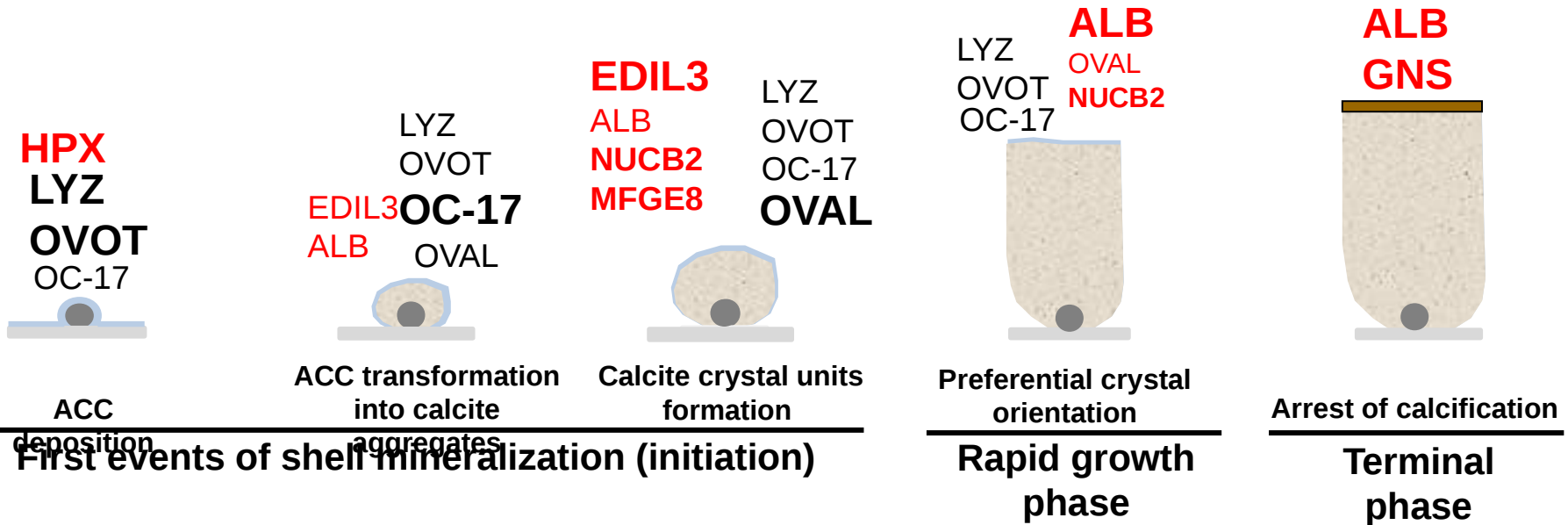
Figure 1. Ovocleidin-17 bound to an amorphous (a) and a crystallized (b) calcium carbonate nanoparticle containing 192 formula units.



Proteins at pivotal events

Proteins having a direct involvement in eggshell mineralization

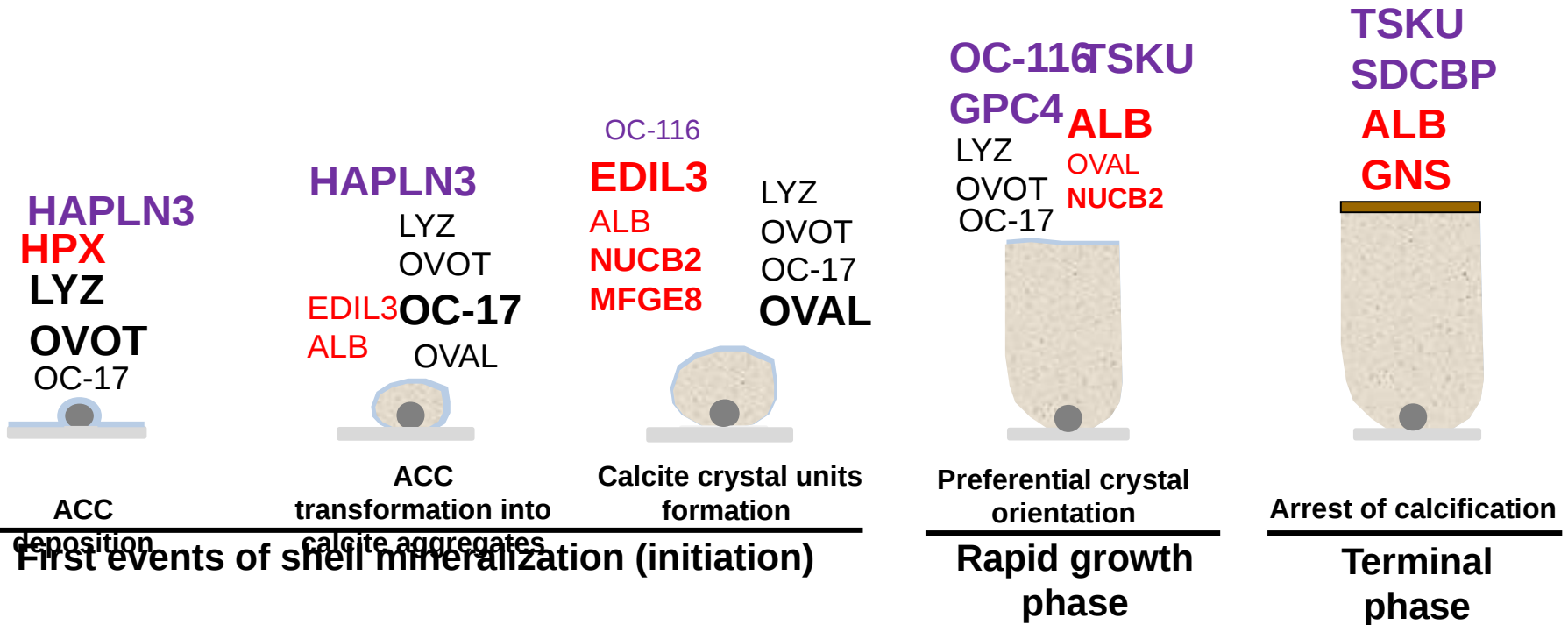
- ✓ Proteins with established role in the **biomineralisation**
- ✓ **Calcium binding proteins (CaBPs)** interacting with calcium, favoring crystal nucleation and driving the morphology of crystals
 - *Proteins with EF-hand and EGF-like calcium binding domains*



Proteins at pivotal events

Proteins having a direct involvement in eggshell mineralization

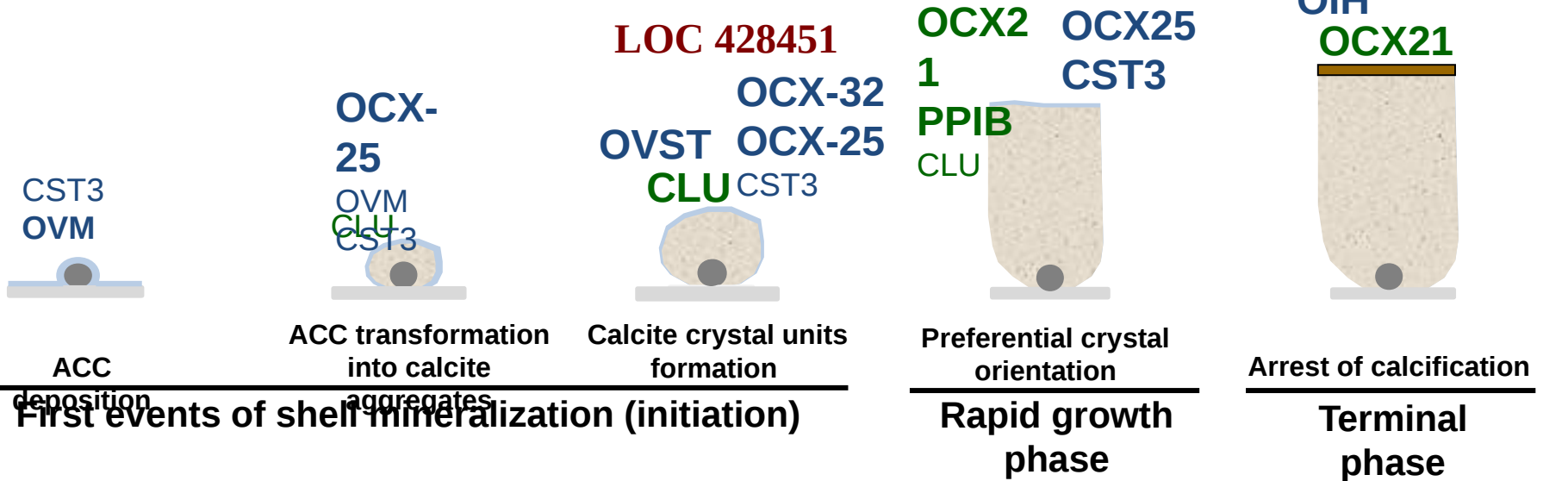
- ✓ Proteins with established role in the **biomineralisation**
- ✓ **Calcium binding proteins (CaBPs)** interacting with calcium, favoring crystal nucleation and driving the morphology of crystals
 - *Proteins with EF-hand and EGF-like calcium binding domains*
- ✓ **Proteoglycans** and proteoglycan binding proteins
 - proteoglycans have a negative charge to attract Ca²⁺ ions



Proteins at pivotal events

Proteins involved in the regulation of proteins driving mineralization

- Proteins involved in the proper folding of the eggshell matrix to ensure calcium and mineral interactions and to ensure template to the mineralized structure
- Proteins inhibiting or activating proteins present in the mineralization milieu (non cellular).
 - Molecular interactions with other proteins 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



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

Microstructure, ultrastructure parfaitement définie

Rôle du carbonate de calcium amorphe (ACC) est démontré et important

Interaction matrice organique minéraux est prépondérante

Stabilisation de l'ACC, morphologie des cristaux

Caractérisation de la matrice organique récente (10 protéines en 2006, > 700 aujourd'hui)

Hiérarchisation des acteurs moléculaires prépondérants lors du processus de minéralisation

Etablissement d'une liste restreinte de candidats pivots

Validation expérimentale

(purification, interaction minéral, invalidation des gènes codant les protéines clefs, recherche de polymorphismes associés à la solidité du biomatériau, marqueurs biologiques de la solidité, relation structure-fonction....)