





UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV UR83 Recherches Avicoles

THÈSE présentée par :

Pauline MARIE

soutenue le : 20 mai 2015

pour obtenir le grade de : Docteur de l'université François – Rabelais de Tours

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie

Biominéralisation de la coquille d'œuf de poule : caractérisation des protéines de la matrice organique impliquées dans l'initiation de la minéralisation

THÈSE dirigée par : M. GAUTRON Joël	Directeur de Recherche, INRA, Tours
RAPPORTEURS : M. MARIN Frédéric M. ZOCCOLA Didier	Directeur de Recherche, CNRS-Université de Bourgogne, Dijon Chargé de Recherche, HDR, Centre Scientifique de Monaco, Monaco
JURY : M. GAUTRON Joël M. HINCKE Maxwell M. MARIN Frédéric M. MOREAU Thierry M. NYS Yves Mme ROGNIAUX Hélène M. ZOCCOLA Didier	Directeur de Recherche, INRA, Tours Professeur, University of Ottawa, Ottawa Directeur de Recherche, CNRS-Université de Bourgogne, Dijon Professeur des Universités, INSERM-Université de Tours, Tours Directeur de Recherche, INRA, Tours Ingénieur de Recherche, INRA, Nantes Chargé de Recherche, HDR, Centre Scientifique de Monaco, Monaco

A mes parents

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier la Région Centre-Val de Loire et l'Institut National de la Recherche Agronomique pour la bourse de thèse dont j'ai bénéficié durant ces trois années.

Je remercie également l'Agence Nationale de la Recherche pour son aide financière qui a permis la réalisation des travaux de cette thèse *via* le programme IMPACT (Identification of Matrix Proteins Affecting Calcite Texture in chicken and guinea fowl eggshells).

Je souhaite remercier Messieurs Frédéric MARIN, Directeur de Recherche à l'UMR Biogéosciences (CNRS-Université de Bourgogne) et Didier ZOCCOLA, Chargé de Recherche au Centre Scientifique de Monaco, qui me font l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail et de participer à ce jury.

Je remercie également Madame Hélène ROGNIAUX, Ingénieur de Recherche à l'INRA et Messieurs Thierry MOREAU, Professeur à l'Université François-Rabelais de Tours et Maxwell HINCKE, Professeur à l'Université d'Ottawa (Canada) pour avoir accepté d'évaluer ce travail et de participer à ce jury.

Je tiens à remercier Monsieur Michel DUCLOS, directeur de l'Unité de Recherches Avicoles de l'INRA de Tours de m'avoir accueillie au sein de cette structure.

Un grand merci à Monsieur Joël GAUTRON qui m'a donné l'opportunité d'entreprendre ce travail de thèse au sein de l'équipe FRPO et qui l'a attentivement dirigé durant ces trois années. Merci pour votre confiance et pour m'avoir fait découvrir le monde captivant des biominéralisations.

J'adresse également mes sincères remerciements à Monsieur Yves NYS pour son accompagnement dans ce travail et ses relectures attentives.

Un grand merci à Madame Valérie LABAS et Monsieur Grégoire HARICHAUX pour leur accueil au sein du laboratoire de spectrométrie de masse de la Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomolécules et de Phénomique des Animaux d'Intérêt Bio-agronomique, sans qui les analyses protéomiques n'auraient pas pu être réalisées.

Merci pour votre aide précieuse et votre contribution à ces travaux.

Valérie, merci pour le temps que tu m'as toujours si gentiment accordé.

Je remercie vivement Monsieur Alejandro RODRIGUEZ-NAVARRO, professeur à l'Université de Grenade (Espagne), de m'avoir invitée à partager ses travaux. Je le remercie pour son accueil chaleureux au sein de son laboratoire et pour avoir organisé et financé mon séjour sur place. Merci pour son aide précieuse aux analyses physiques de la coquille. Cela restera un magnifique souvenir et la parenthèse ensoleillée de ces trois années.

Je remercie également l'Université François-Rabelais de Tours pour avoir participé au financement de ce séjour.

Mes remerciements vont également à Madame Angeles HERNANDEZ-HERNANDEZ pour m'avoir initiée aux tests d'interactions matrice/minéraux au cours de ce séjour. Merci pour sa bienveillance.

Une pensée pour Nazareth DOMINGUEZ-GASCA, doctorante à l'Université de Grenade et Arantxa MUNOZ, post-doctorante. Merci pour votre accueil et tous les bons moments que nous avons partagés au cours de mon séjour dans votre belle ville de Grenade.

Je souhaite remercier Monsieur Aurélien BRIONNE pour toute l'aide qu'il m'a apportée dans l'analyse bioinformatique des résultats de protéomique. Merci de m'avoir initiée au langage informatique dédié.

Mes remerciements vont également à Madame Christelle HENNEQUET-ANTIER pour son expertise en analyse statistique (classification hiérarchique ascendante).

Un grand merci à tous mes collègues de l'équipe FRPO, Mesdames Magali CHESSE, Maryse MILLS et Sophie REHAULT-GODBERT et Messieurs Nicolas GUYOT et Jean-Claude POIRIER pour leurs aides précieuses, pour leur gentillesse et leur bonne humeur. Maryse et Magali, merci pour votre soutien et votre aide technique.

Merci aux membres de l'équipe « Repro » pour tous les moments et les repas partagés

Je remercie le personnel de l'Unité expérimentale PEAT pour le soin apporté aux animaux. Merci à « mes » poules pour leurs œufs !

J'exprime toute ma gratitude à Mesdames Sophie TESSERAUD et Elisabeth DUVAL pour la confiance qu'elles m'ont accordée en retenant ma candidature.

Merci à Sabrina, William et Julien pour avoir partagé mon quotidien de thésarde. Sabrina et William, nos discussions dans le bus vont me manquer !

Un grand merci à Diep pour avoir partagé non seulement mon quotidien de thésarde mais aussi mon bureau. Merci pour les discussions à propos de tout et de rien et tous les moments de rigolade. Merci d'avoir partagé une semaine estivale en Norvège.

Un grand merci aux « ITAVIennes » Marie et Amandine.

Marie, merci pour ton soutien, tes conseils et pour tes réunions Tupp' qui ont été des moments de détente et de convivialité.

Amandine, merci pour tous ces moments partagés avec nos chevaux préférés.

Je dédie tout particulièrement cette thèse à mes parents, qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de ces trois années. Merci pour votre implication, pour votre aide et vos relectures attentives.

Un grand merci à toute ma famille pour son soutien.

Je remercie également tous ceux que j'aurais pu oublier et qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

Résumé en français

La coquille d'œuf de poule est un biominéral naturel composé de 95% de carbonate de calcium (sous forme de calcite) de 3,5% de matrice organique (protéines, protéoglycanes et polysaccharides) et de 1,5% d'eau. Sa structure ordonnée, sa texture et ses propriétés mécaniques remarquables sont déterminées par les interactions entre les composantes organiques et minérales. De ce fait, l'identification des composants de la matrice organique de la coquille est apparue d'un intérêt majeur et a permis d'apporter des connaissances essentielles sur le processus de biominéralisation. Les récents développements des méthodes à haut-débit ont conduit à l'identification de plus de 670 protéines dans la coquille et de 600 transcrits utérins. Mais ces études restent quantitatives et non-hiérarchiques et peu d'informations sont disponibles sur la fonction des protéines dans le processus de minéralisation.

Le travail conduit au cours de cette thèse visait à dépasser la phase de criblage moléculaire global pour aller vers une caractérisation fonctionnelle des protéines de la matrice organique.

Dans une première étape, nous avons utilisé des méthodes innovantes en spectrométrie de masse afin d'établir une liste exhaustive de protéines sécrétées dans le fluide utérin et associées aux trois principaux stades de la calcification de la coquille (initiation, croissance linéaire et terminaison). Un total de 308 protéines a été identifié et 96 d'entre elles ont été quantifiées. Parmi ces dernières, 64 sont différentiellement exprimées à au moins un des stades de la minéralisation. Cinq profils protéiques ont été déterminés. Les fonctions des protéines présentes dans chacun de ces profils ont été recherchées et trois groupes fonctionnels ont été déterminés (implication dans le processus de minéralisation, régulation de la fonction des protéines et fonction antimicrobienne).

Dans une seconde étape, notre attention s'est portée sur l'initiation, qui est une étape cruciale pour la détermination de l'ultrastructure de la coquille et des propriétés mécaniques qui en résultent. Notre but était d'établir une relation entre les observations in situ et minéralogiques et la composition de la matrice organique. Des observations ont été réalisées et la composition et le type polymorphique des dépôts minéraux déterminés sur des échantillons de coquilles en cours de formation prélevés au cours de la phase initiale de la minéralisation. Nos résultats ont mis en évidence pour la première fois du carbonate de calcium amorphe dans un processus de minéralisation chez un vertébré. Ce travail nous a permis de proposer un scénario explicatif des événements se déroulant au cours de l'initiation : dépôt d'une phase désordonnée de carbonate de calcium identifiée comme du carbonate de calcium amorphe, transformation du carbonate de calcium amorphe en calcite et formation d'unités cristallines de calcite en accroissement. La composition de la matrice organique de la coquille a été établie sur les mêmes échantillons. Nous avons identifié 216 protéines dont 175 présentent des variations d'abondance à au moins un des événements étudiés. Cinq profils protéiques principaux ont été déterminés. Les fonctions des protéines présentes dans chacun d'entre eux ont été recherchées et nous avons mis en évidence 77 protéines potentiellement impliquées de façon directe ou indirecte dans le processus de minéralisation.

Le but de cette étude a été de caractériser les composants essentiels de la matrice organique impliqués dans chacune des différentes phases du processus de minéralisation. Ces résultats fournissent de nouvelles indications fondamentales sur la façon dont les protéines régulent les propriétés mécaniques de la coquille qui constituent la première défense naturelle de l'œuf contre les infections bactériennes.

Résumé en anglais

Avian eggshell is a natural biomineral composed of 95% calcium carbonate (calcite polymorph) and 3.5% organic matrix (proteins, proteoglycans and polysaccharides). Its well-ordered structure and texture and its resulting mechanical properties are determined by interactions between organic and mineral components which control the mineralisation process. Identification of eggshell organic matrix components appeared to be of major interest and provided new insights on biomineralisation process. Recent advances using high-throughput methods (transcriptomics and proteomics) led to the identification of more than 670 proteins in the shell and 600 uterine transcripts. Nevertheless, these studies were qualitative and global and little is known about protein function on the calcification process.

The work performed here in this PhD aims to advance from the global molecular screening phase to a functional characterisation of the organic matrix proteins.

In a first step, we have used innovative mass spectrometry methodologies to establish an exhaustive list of proteins secreted in the uterine fluid and associated to the three main stages of shell calcification (initiation, linear growth and termination). A total of 308 proteins were identified and 96 of them were quantified. Amongst them, 64 were differentially expressed according mineralisation stages. Five protein profiles were highlighted. Protein functions in each profile were investigated and three functional groups were determined (involvement in biomineralisation process, regulation of protein function, antimicrobial properties).

In a second step, we have focused on the initiation of shell mineralisation, which is crucial to determine eggshell ultrastructure and resulting mechanical properties. We aimed to establish a relationship between *in situ* and mineralogical observations and organic matrix composition. Forming eggshell samples were collected and the composition and polymorphic type of mineral deposits were determined at different key points of the calcification phase. We highlighted for the first time amorphous calcium carbonate in a vertebrate mineralisation process. This work allowed us to propose a scenario describing the events occurring during initiation of calcification: deposit of disordered phase of calcium carbonate into calcite and establishment of larger calcite crystal units. We investigated the organic matrix composition at the same samples, and identified 216 proteins, 175 of them with variation of abundance according to shell calcification stages. Five main proteins profiles were determined and we have reported potential direct or indirect functions for 77 proteins according to the different events of shell mineralisation.

This study aimed to characterise essential matrix components involved in the different phases of shell formation. These results yield new fundamental insights into how proteins regulate the mechanical properties of the eggshell which constitutes the primary natural defence of the egg against microbial penetration.

Liste des abréviations

 μg : microgramme(s) μm : micromètre(s) ACC : Amorphous Calcium Carbonate (carbonate de calcium amorphe) ANOVA : ANalysis Of Variance (Analyse de variance) ANR : Agence National de la Recherche AvBD : Avian Beta Defensin BLAST : Basic Local Alignement Search Tool BPI : Bactericidal Permeability Increasing protein Ca^{2+} : ion calcium CaCO₃ : carbonate de calcium cm : centimètre(s) CO_3^{2-} : ion carbonate Cl⁻: ion chlore EGF : Epidermal Growth Factor emPAI : exponentially modified protein abundance index FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'Agriculture) FRPO : Fonction et Régulation des Protéines de l'Oeuf FTIR : Fourier Transformed InfraRed spectroscopy (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier) g : gramme(s) GeLC-MS/MS : Gel liquid chromatography Mass Spectrometry/Mass spectrometry GO : Gene Ontology h : heure(s) H^+ : proton HCO₃⁻ : ion bicarbonate INRA : Institut National de la Recherche Agronomique IMPACT : Identification of Matrix Proteins Affecting Calcite Texture in chicken and guinea fowl eggshells K^+ : ion potassium kDa : kilodalton

LPS : LipoPolySaccharide

LTQ : Linear Trap Quadrupole

min : minute(s)

mL : millilitre(s)

mg : milligramme(s)

MS : Mass Spectrometry (spectrométrie de masse)

 Na^+ : ion sodium

OC : ovocléidine

OCX : ovocalyxine

PAIB2 : Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomolécules et de Phénomique des Animaux

d'Intérêt Bio-agronomique

Plunc : Palate lung and nasal epithelium clone

QTL : Quantitative Trait Loci

VMO : Vitelline Membrane Outer

SDS-PAGE : Sodium DodecylSulfate PolyAccrylamide Gel Electrophoresis

SEM : Scanning Electronic Microscopy (microscopie électronique à balayage)

XRD : X-Ray Diffraction (diffraction aux rayons X)

ZP : Zona Pellucida

Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : Représentation schématique des différents compartiments de l'œuf (Sauveur and de Reviers, 1988) p 9

Figure 2 : Photographie en microscopie à balayage électronique de la coquille (Nys *et al*, 2001) p 12

Figure 3 : Formation spatio-temporelle de l'œuf (Nys and Guyot, 2011) p 13

Figure 4 : Nouveau modèle des transports ioniques durant la calcification de la coquille (Brionne *et al*, 2014 adapté de Jonchere *et al*, 2012) p 21

Figure 5 : Graphique des différentes phases de la formation de la coquille (adapté de Nys, 2010) p 24

Figure 6: Modélisation du processus d'évolution des cristaux de carbonate de calcium au cours de la biominéralisation de la coquille d'œufs d'oiseaux (Rodriguez-Navarro and Garcia-Ruiz, 2000) p 25

Figure 7 : Coupes de coquilles observées en lumière polarisée (a) au niveau des noyaux mamillaires (b) au milieu de la couche palissadique (c) en haut de la couche palissadique (Nys *et al*, 2004) p 26

Figure 8 : Photographies au microscope électronique à balayage montrant les modifications morphologiques des cristaux de calcite en présence de fluide utérin prélevés à chacun des stades de la calcification (Dominguez-Vera *et al*, 2000) p 29

Figure 9 : Photographies en microscope électronique à balayage des cristaux de carbonate de calcium obtenus en présence de différentes protéines de la coquille d'œuf de poule p 38

Figure 10 : Représentation des modifications morphologiques des cristaux de calcite sous l'action de la matrice organique (a) cristal rhomboédrique non modifié, (b) cristal modifié présent dans la coquille (adapté de Nys, 2010) p 218

Figure 11 : Formation de carbonate de calcium en présence d'ovalbumine (Pipich *et al*, 2008) p 226

Figure 12 : Cycle catalytique de la transformation du carbonate de calcium amorphe en calcite par l'ovocléidine-17 (Freeman *et al*, 2010) p 228

Figure 13 : Comparaison de l'expression du transcrit de l'ovocléidine-116 entre une condition normale et une condition où l'œuf est expulsé (Brionne *et al*, 2014) p 230

Figure 14 : Répartition des protéines candidates intervenant dans les différents événements de minéralisation p 236

Figure 15 : Représentation schématique des perspectives de thèse p 237

Figure 16 : Schéma général du projet ANR IMPACT p 238

Figure 17 : Photographie et représentation schématique du dispositif de minéralisation champignon de minéralisation (Dominguez-Vera *et al*, 2000) p 240

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des résultats des tests de cristallisation *in vitro* en présence de fluides utérins prélevés à chacun des stades de la calcification (Hernandez-Hernandez *et al*, 2008a) p 29

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des résultats des tests de cristallisation *in vitro* en présence de fractions de protéines de coquille d'œuf de poule (Hernandez-Hernandez *et al*, 2008b) p 30

Tableau 3 : Protéines de la matrice organique de la coquille d'œuf de poule liant le calcium identifiées par les méthodes à haut-débit (Mann *et al*, 2006, Jonchere *et al*, 2010, Sun *et al*, 2013, Brionne *et al*, 2014) p 41

Tableau 4 : Inhibiteurs de protéases retrouvés dans les études à haut-débit (Mann *et al*, 2006, Jonchere *et al*, 2010, Sun *et al*, 2013, Brionne *et al*, 2014) p 44

Tableau 5 : Protéines identifiées chez les invertébrés présentant des domaines EF-hand ou EGF-like p 51

Tableau 6 : Protéines identifiées chez les invertébrés pouvant lier le calcium p 52

Tableau 7 : Protéines identifiées chez les invertébrés possédant une activité anhydrase carbonique p 54

Tableau 8 : Protéines identifiées chez les invertébrés présentant une activité inhibitrice de protéases p 55

Sommaire

F	tésumé en français	V
F	lésumé en anglais	vi
L	iste des abréviations	vii
I	iste des figures et des tableaux	ix
т	Introduction	1
Τ.		1
Ι	[-Synthèse bibliographique	7
1	Structure et formation de l'œuf de poule	9
	1.1 Structure et composition des différents compartiments de l'œuf	9
	1.1.1 Le jaune	9
	1.1.2 La membrane vitelline	10
	1.1.3 Le blanc	10
	1.1.4 La coquille	11
	1.2 Formation de l'œuf dans l'appareil reproducteur femelle	12
	1.2.1 Synthèse du jaune d'œuf dans l'ovaire	13
	1.2.2 Dépôt des autres compartiments de l'œuf dans l'oviducte	14
2	Généralités sur les processus de biominéralisation	16
	2.1 Les différents processus de biominéralisation	16
	2.2 Principes généraux de la biominéralisation contrôlée carbonatée	17
	2.3 Rôle du carbonate de calcium amorphe dans la biominéralisation	18
3	Biominéralisation carbonatée de la coquille d'œuf de poule	20
	3.1 Apports des ions dans l'utérus	20
	3.2 Calcification de la coquille	22
	3.2.1 Séquence de dépôt des différentes couches de la coquille	22
	3.2.2 Matrice organique et biominéralisation de la coquille	27
4	Protéines des matrices organiques associées aux biominéraux	32
	4.1 Inventaire de la matrice organique de la coquille d'œuf de poule	32
	4.1.1 Protéines identifiées par des méthodes biochimique et moléculaire	32
	4.1.2 Protéines et transcrits identifiés par des méthodes à haut-débit	34
	4.2 Caractérisation des protéines identifiées dans la matrice organique de la coquille d'œuf de poul	e 37
	4.2.1 Protéines intervenant dans la minéralisation	37
	4.2.2 Protéines potentiellement régulatrices du processus de minéralisation	43
	4.2.3 Protéines potentiellement antimicrobiennes	45
	4.3 Caractérisation des protéines identifiées dans les matrices organiques d'invertébrés biominérali	sants 47
	4.3.1 Protéines modifiant les cristaux de carbonate de calcium	47
	4.3.2 Proteines liant le calcium	51
	4.5.5 Proteines stabilisant le carbonate de calcium amorphe	52

4.3.4 Protéines présentant une activité anhydrase carbonique	53
4.3.5 Protéines présentant un domaine C-type lectin	54
4.3.6 Protéines inhibitrices de protéases	55
III-Objectifs de la thèse	57
IV-Résultats expérimentaux	63
Chapitre 1 : Quantification et analyse fonctionnelle des protéine	s sécrétées dans le fluide
utérin et intervenant dans le processus de minéralisation au	cours des trois stades
principaux de la calcification de la coquille d'œuf de poule	65
Présentation des travaux réalisés dans ce chapitre (Articles n°1 e	et 2) 67
Article n°1 : « Quantitative proteomics and bioinformatic analysis pro-	ovide new insight into protein
function during avian eggshell biomineralization »	75
Article n°2 : « Data set for the proteomic inventory and quantitative ar	halysis of chicken uterine fluid
during eggshell biomineralization »	93
Chapitre 2 : Relation entre les caractéristiques physiques du pro	cessus de minéralisation
et la composition de la matrice organique au cours de l'initiatior	n de la calcification de la
coquille d'œuf de poule	101
Présentation des travaux réalisés dans ce chapitre (Articles n°3,	4 et 5) 103
Section 2.1 : Caractérisation physique du processus de miné	ralisation au cours de la
cinétique de l'initiation de la calcification de la coquille d'œuf	de poule 105
Présentation de l'article n°3	107
Article n°3 : « Amorphous calcium carbonate controls avian eggshell m	ineralization : a new paradigm
for understanding rapid eggshell calcification »	113
Section 2.2 : Caractérisation des protéines intervenant	dans le processus de
minéralisation au cours de la cinétique de l'initiation de la ca	lcification de la coquille
d'œuf de poule et de la phase active de calcification	129
Présentation des articles n°4 et 5	131
Article n°4 : « Quantitative proteomics provides new insights into ch	icken eggshell matrix proteins
functions during the primary events of mineralisation and the active cale	cification phase » 139
Article n°5: « Data set for the proteomic inventory and quantitative	e analysis of chicken eggshell
matrix proteins during the primary events of eggshell mineralization a	and the active growth phase of
calcification »	157
V-Discussion et perspectives	167
1 Discussion générale	169
1.1 Evènements minéralogiques de l'initiation de la minéralisation	171
1.2 Inventaire global des protéines de la matrice organique	172
1.3 Caractérisation quantitative et fonctionnelle des protéines	175

1.4 Candidats protéiques mis en évidence	176
1.4.1 Protéines directement impliquées dans la minéralisation	176
1.4.2 Protéines régulant la fonction d'autres protéines	184
1.5 Conclusion	187
2 Perspectives	189
2.1 Mise en évidence de candidats impliqués dans la minéralisation	189
2.2 Validation expérimentale des candidats	191
VI-Conclusion	197 201
VII-Liste des travaux associés	
VIII-Références bibliographiques	207

I-Introduction

Introduction

L'œuf fait partie intégrante du cycle de reproduction chez la poule. C'est dans cette enceinte close et étanche que l'embryon pourra se développer de manière harmonieuse à partir des seuls constituants présents dans l'œuf lorsqu'il y a eu fécondation. Le mode de reproduction des espèces ovipares implique que les constituants de l'œuf possèdent des propriétés remarquables d'un point de vue énergétique et nutritionnel et de par leurs activités biologiques. Les constituants du jaune sont formés au niveau du foie et déposés au niveau de l'ovaire. Les autres compartiments ont pour origine l'oviducte que l'œuf traverse au cours de sa formation. Le gamète femelle est porté par le jaune et pourra être fécondé par le gamète mâle une fois le jaune ovulé. Le jaune et le blanc contiennent toutes les réserves nutritives protéiques et lipidiques permettant le développement du poussin en 21 jours.

Aussi, l'œuf doit rester exempt de toute contamination microbienne, deux types pouvant l'affecter. L'un, vertical, correspond aux contaminations pouvant se développer chez la poule au cours de la formation de l'œuf et l'autre, horizontal, aux contaminations pouvant affecter l'œuf après la ponte, notamment si la coquille a subi des dommages. Pour les éviter, l'œuf possède des défenses naturelles. La défense physique est assurée par la coquille qui joue un rôle de barrière protectrice et la défense chimique par un grand nombre de molécules antimicrobiennes réparties dans les différents compartiments de l'œuf.

L'œuf fait également partie intégrante de l'alimentation humaine. Il est une source équilibrée de protéines et de lipides, tout en étant peu énergétique (moins de 100 kilocalories pour un œuf de 60 g). La valeur biologique des protéines de l'œuf a fait de celles-ci la référence pour l'alimentation humaine (valeur 100) jusqu'à récemment. Leur composition répond presque intégralement aux besoins de l'enfant en acides aminés indispensables, qui ne peuvent pas être synthétisés à partir de précurseurs à la suite de réactions enzymatiques.

En 2012, la production d'œufs au niveau mondial a été estimée par la FAO à plus de 66,4 millions de tonnes soit environ 1000 milliards d'œufs. Les principaux producteurs sont la Chine (24,5 millions de tonnes, soit près de 37% de la production mondiale), l'Union Européenne (6,7 millions), les Etats-Unis (5,4 millions), l'Inde (3,6 millions), le Japon (2,5 millions). La France est le premier producteur de l'Union Européenne (853 000 tonnes), juste devant l'Allemagne (831 000 tonnes) et l'Italie (765 000 tonnes) (source ITAVI, note de conjoncture, octobre 2014 et FAO, statistical division).

Au vu de cette production importante, la qualité sanitaire de l'œuf de table nécessite une attention particulière. En Europe, la consommation d'œufs et d'ovoproduits (surtout crus, dans des préparations comme les mayonnaises) serait ainsi responsable de 45% des toxi-infections de type salmonellose. Ce taux atteint 62% pour le sérotype spécifique *Salmonella*

Introduction

Enteritidis (source EFSA (EFSA, 2014)). Depuis le 1^{er} janvier 2012, la directive européenne 1999/74/CE sur le bien-être des poules pondeuses interdit l'élevage des poules en cages dites standard au profit de systèmes dits alternatifs permettant l'expression des comportements naturels des animaux (cages aménagées, volières ou élevages au sol). Or, ces systèmes, principalement les voilières ou les élevages au sol, pourraient avoir pour conséquence une charge bactérienne augmentée en surface des œufs (Rossi and Reu, 2011).

Dans ce contexte, il est important d'étudier, de mieux comprendre et d'améliorer les systèmes de défenses de l'œuf et d'adapter les nouveaux modes d'élevage pour garantir la qualité sanitaire de ce produit de consommation. L'équipe « Fonction et Régulation des Protéines de l'Oeuf » a ainsi coordonné et/ou participé à différents projets de recherches nationaux et européens autour de ces thèmes : les projets européens Egg Defence (2001-2004), RESCAPE (Reduce Egg Susceptibility to Contamination in Avian Production in Europe, 2006-2009) et SABRE (cut edge for Substainable Animal BREeding, 2006-2010), les projets ANR BIOCRYSTAL (2006-2009) et OVO-MINING (2009-2012) ainsi que le projet interrégional OVAL (régions Bretagne, Pays de la Loire et Centre, 2011-2013). Elle coordonne actuellement le projet ANR IMPACT (Identification of Matrix Proteins Affecting Calcite Texture in chicken and guinea fowl, 2013-2017) et le projet Région Centre MUSE (Medicinal USe of Eggs, 2014-2016).

Mon projet de thèse porte plus particulièrement sur le processus de minéralisation de la coquille, défense physique de l'œuf. Outre ce rôle, la coquille constitue également un lieu de stockage du calcium pour le squelette du futur embryon et contrôle les échanges gazeux entre l'intérieur de l'œuf et le milieu extérieur. Elle est définie comme un biominéral composé à 95% de carbonate de calcium sous forme de calcite, à 3,5% de matrice organique composée de protéines, de protéoglycanes et de polysaccharides et à 1,5% d'eau. Elle est formée dans l'utérus, le dernier segment de l'oviducte chez la poule, dans un fluide acellulaire appelé fluide utérin. Cette formation est divisée en trois grands stades : l'initiation, la croissance linéaire et la terminaison. Au cours de ce processus, les minéraux constitutifs de la coquille interagissent avec des constituants organiques (matrice organique). Ces interactions vont guider la croissance cristalline, conduire à l'élaboration de l'ultrastructure de la coquille et ainsi lui donner ses propriétés mécaniques remarquables. Connaitre la composition protéique de cette matrice a été un axe majeur de recherche. Par différentes approches, près de 700 protéines de la coquille et plus de 600 transcrits utérins surexprimés dans l'utérus ont été identifiés. Bien qu'exhaustives, les informations apportées par ces études restaient principalement qualitatives.

Introduction

L'objectif principal de mon travail a donc été de passer d'une étape globale et non hiérarchisée à l'identification, la quantification et la caractérisation fonctionnelle des protéines-clés présentes à chacun des stades de la minéralisation et impliquées dans l'élaboration de la coquille. Cela a permis de différencier les constituants actifs dans le processus de minéralisation de ceux incorporés de manière passive dans la coquille. L'accent a été mis sur la phase initiale qui est cruciale pour la détermination de l'ultrastructure de la coquille et de ses propriétés mécaniques. Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet ANR IMPACT. Ces connaissances seront utiles pour mieux comprendre le rôle des principales protéines dans le processus de biominéralisation et contribueront aux travaux menés sur le renforcement de la barrière protectrice qu'est la coquille. D'un point de vue plus général, elles permettent de mieux appréhender une biominéralisation naturelle qui se déroule à basse pression et à basse température. Ces connaissances sont une source d'informations importantes pour la fabrication des biomatériaux qui est un enjeu industriel.

La première partie de ce manuscrit rappelle différentes notions bibliographiques sur la structure, la composition et la formation de l'œuf de poule, sur les processus de minéralisations acellulaires contrôlées en particulier chez la poule ainsi que sur l'identification et la fonction des protéines associées aux biominéraux. La deuxième partie présente les travaux de recherche effectués au cours de mon doctorat et intègre les publications correspondantes. La première étape porte sur l'identification des protéines présentes dans le fluide utérin à chacun des stades de la minéralisation. La seconde étape s'intéresse aux évènements minéralogiques et cristallographiques ainsi qu'aux protéines impliquées durant l'initiation de la calcification. La dernière partie discute les résultats obtenus et ouvre des perspectives à partir de ces recherches.

II-Synthèse bibliographique

1 Structure et formation de l'œuf de poule

1.1 <u>Structure et composition des différents compartiments de l'œuf</u>

L'œuf de poule est divisé en trois compartiments principaux : le jaune (ou vitellus), le blanc (ou albumen), et la coquille qui sert d'enveloppe protectrice. La membrane vitelline entoure le jaune et contient les constituants de ce dernier (Figure 1).



Figure 1 : Représentation schématique des différents compartiments de l'œuf (Sauveur and de Reviers, 1988)

1.1.1 *Le jaune*

Le jaune contient le gamète femelle qui pourra être fécondé. Ce dernier est localisé au niveau du disque germinatif, situé en surface du jaune. Le jaune est composé de 51% d'eau, de 30% de lipides, de 16% de protéines et de 0,6% de glucides. Il est également riche en phosphore, contient la plupart du fer de l'œuf et renferme des vitamines (la totalité des vitamines liposolubles et un certain nombre de vitamines hydrosolubles) (Guerin-Dubiard *et al*, 2010, Nys, 2010).

Deux fractions du jaune peuvent être mises en évidence lors d'une centrifugation : le plasma (environ 78%), correspondant au surnageant, et la fraction granulaire ou globulaire (environ 22%), correspondant au précipité (Li-Chan and Kim, 2008). Dans le plasma, les principales protéines identifiées sont l'albumine sérique (ou α -livetine), l' α -2 microglobuline (ou β -livetine) et l'immunoglobuline Y (ou γ -livetine). La fraction granulaire, riche en gouttelettes lipidiques, contient notamment des HDL (High-Density Lipoprotein) avec des

lipovitellines issues des vitellogénines et des VLDL (Very Low Density Lipoprotein) avec des apoprotéines (Burley and Vadehra, 1989). Deux études protéomiques ont permis l'identification de près de 300 protéines dans le jaune (Mann and Mann, 2008, Farinazzo *et al*, 2009). Les protéines majoritaires apparaissent comme étant l'albumine sérique, l'apovitelline-I, une protéine de 12 kDa ayant une réactivité croisée avec la β -2 microglobuline, la vitellogénine 2 et l'ovalbumine (Mann and Mann, 2008).

1.1.2 *La membrane vitelline*

La membrane vitelline est de nature protéique ; elle entoure et contient le jaune (Nys and Guyot, 2011). Elle a une épaisseur totale d'environ 10 μ m (Mineki and Kobayashi, 1997) et peut être divisée en trois couches : une couche médiane continue au centre comprise entre deux couches fibreuses que sont la couche interne (équivalent de la *zona pellucida* chez les mammifères) et la couche externe (Nys and Guyot, 2011). Certains auteurs évoquent la présence d'une quatrième couche, la *zona radiata*, située sous la couche interne fibreuse.

Une étude protéomique a permis l'identification de 137 protéines présentes dans la membrane vitelline (Mann, 2008). Les protéines majoritaires identifiées sont l'ovalbumine, le lysozyme, les protéines Vitelline Outer Membrane I et II (VMO I et II) et l'ovotransferrine. Les protéines de la *zona pellucida* ZP C/ZP 3, ZP 1 et ZP D sont également identifiées parmi les protéines les plus abondantes. Elles pourraient être associées aux évènements de fertilisation.

1.1.3 *Le blanc*

Le blanc constitue une réserve nutritive de nature protéique pour l'embryon au cours de son développement. Il peut être divisé en quatre structures distinctes : le blanc liquide interne, le blanc épais, le blanc liquide externe et les chalazes (Figure 1) (Guerin-Dubiard *et al*, 2010). Le blanc liquide interne, au contact du jaune, est entouré par le blanc épais. Ce dernier, présentant l'aspect d'un gel, est en contact avec la coquille aux deux extrémités de l'œuf. Le blanc liquide externe est en contact direct avec les membranes coquillières. Les chalazes sont des fibres qui maintiennent le jaune en suspension au milieu de l'œuf. La différence de texture entre le blanc liquide et le blanc épais est liée à la répartition inégale d'une protéine majeure du blanc, l'ovomucine, cette dernière étant quatre fois plus abondante dans le blanc épais, lui donnant sa texture gélatineuse (Anton *et al*, 2010).

Le blanc est composé de 88% d'eau, de 10,6% de protéines et de 0,9% de glucides. Il contient également des minéraux (0,5%) et une faible quantité de vitamines hydrosolubles,

uniquement du groupe B (Guerin-Dubiard *et al*, 2010, Nys, 2010). Les protéines majeures du blanc sont l'ovalbumine (qui représente 54% des protéines du blanc), l'ovotransferrine (13%), l'ovomucoïde (11%), le lysozyme (3,5%) et l'ovomucine (1,5 à 3,5%) (Li-Chan and Nakai, 1989).

Depuis, quatre études protéomiques ont permis l'identification d'environ 240 protéines dans le blanc (Guerin-Dubiard *et al*, 2006, Mann, 2007, D'Ambrosio *et al*, 2008, Mann and Mann, 2011).

Le blanc contient également les acteurs antimicrobiens les plus concentrés et les plus actifs qui assurent la défense moléculaire antimicrobienne principale de l'œuf. Le lysozyme, l'ovotransferrine ou les β -défensines sont les plus connus mais des études récentes ont mis en évidence l'ovoinhibiteur et l'OVAX ainsi que de nombreux autres candidats antimicrobiens dans le blanc d'œuf (Bourin *et al*, 2011, Rehault-Godbert *et al*, 2011, Rehault-Godbert *et al*, 2013).

1.1.4 *La coquille*

La coquille, compartiment le plus externe de l'œuf, assure la protection de l'embryon contre les agressions extérieures (Figure 1). Elle est composée de 95% de matière minérale (carbonate de calcium sous forme de calcite), de 3,5% de matière organique ou matrice organique (protéines, polysaccharides et protéoglycanes) et de 1,5% d'eau (Nys and Guyot, 2011). La coquille d'œuf de poule est divisée en 5 couches de l'intérieur vers l'extérieur : les membranes coquillières, la couche mamillaire ou couche des cônes, la couche palissadique, la couche des cristaux verticaux et la cuticule (Nys *et al*, 1999) (Figure 2). Des informations complémentaires sur la structure et la composition des différentes couches seront données dans la troisième partie de cette synthèse.

Synthèse bibliographique



Figure 2 : Photographie en microscopie à balayage électronique de la coquille (Nys *et al*, 2001)

1.2 Formation de l'œuf dans l'appareil reproducteur femelle

La formation de l'œuf suit un processus spatio-temporel bien déterminé, représenté Figure 3, qui permet la mise en place des différents compartiments de l'œuf le long de l'appareil reproducteur femelle. Chez les oiseaux, seul le côté gauche de l'appareil reproducteur est développé et est constitué de l'ovaire et de l'oviducte. Une fois formé dans l'ovaire et à maturité, le jaune est ovulé puis capté par le pavillon de l'oviducte où le dépôt des autres compartiments aura lieu dans les différents segments. Toutes les informations contenues dans ce paragraphe sont extraites de Sauveur et de Reviers (Sauveur and de Reviers, 1988), Nys (Nys, 2010) et Nys et Guyot (Nys and Guyot, 2011). Synthèse bibliographique



Figure 3 : Formation spatio-temporelle de l'œuf (Nys and Guyot, 2011)

1.2.1 Synthèse du jaune d'œuf dans l'ovaire

Au moment de l'éclosion, le poussin femelle possède une réserve d'environ 12000 ovocytes primaires au niveau de l'ovaire. Les ovocytes vont ensuite subir un développement en trois phases qui va aboutir à la formation du jaune et à son ovulation. Au cours de ce processus, la majorité des ovocytes vont dégénérer, essentiellement par atrésie, et moins de 2000 seront effectivement ovulés au cours de la vie de la poule.

La première phase est une phase d'accroissement lent. Elle a lieu entre l'éclosion et la maturité sexuelle (environ 15 à 16 semaines chez la poule). Elle concerne tous les ovocytes, dont le diamètre passe d'environ 10 μ m à 1 mm par accumulation de protéines.

A partir de la maturité sexuelle, certains des ovocytes sont sélectionnés à chaque cycle d'ovulation de la poule et poursuivent leur développement. Les autres restent bloqués dans la première phase pendant une durée plus ou moins longue (quelques semaines voire plusieurs mois) en attente de continuer leur maturation. Les ovocytes sélectionnés entrent dans la deuxième phase qui est une phase d'accroissement intermédiaire. Elle dure environ 60 jours chez la poule. Les dépôts de protéines et de lipides conduisent à une multiplication par 4 du diamètre des ovocytes. Cette sélection est d'origine hormonale.

A chaque cycle d'ovulation, un seul ovocyte est également sélectionné pour entrer dans la troisième phase qui est une phase de grand accroissement. Il vient s'ajouter aux 7 à 10 ovocytes en phase de grand accroissement déjà présents au niveau de l'ovaire. Les ovocytes voient leur masse augmenter fortement durant les 6 à 14 jours précédant l'ovulation, chacun d'entre eux présentant un développement particulier en décalage d'une journée avec les autres. Les protéines et les lipides s'accumulent autour de l'ovocyte, ce qui correspond au dépôt de la quasi-totalité du jaune (98%). La majorité des constituants du jaune est synthétisée au niveau du foie puis acheminée par la circulation sanguine au niveau de l'ovaire. Ces constituants pénètrent dans le jaune par un mécanisme d'endocytose grâce à des récepteurs spécifiques situés à sa surface. Durant cette transformation, la masse des ovocytes passe ainsi de 200 mg à 15-18 g. L'ovocyte est alors recouvert de la première couche des membranes vitellines, la couche interne fibreuse.

Chaque jour, l'ovulation de l'ovocyte le plus développé a lieu. Cette ovulation est placée sous contrôle hormonal : elle fait suite à une sécrétion importante de LH (Luteinizing Hormone), dite décharge ovulante, effectuée et régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire.

A sa sortie de l'ovaire, l'ovocyte est capté par l'oviducte, où les autres compartiments de l'œuf sont synthétisés par les différents segments de cet organe.

1.2.2 Dépôt des autres compartiments de l'œuf dans l'oviducte

L'oviducte est divisé en 5 segments différents (l'infundibulum, le magnum, l'isthme, l'utérus et le vagin), ayant chacun des particularités anatomiques et une fonction propre dans la formation de l'œuf. L'oviducte mesure environ 70 cm de long chez une poule adulte. Tous les segments présentent la même organisation en couches cellulaires distinctes, de l'extérieur vers la lumière de l'utérus : une couche séreuse externe, une couche de fibres musculaires longitudinales, une couche conjonctive externe, une couche de fibres musculaires, une couche conjonctive interne, une couche dite « lamina propria » qui contient des glandes tubulaires pluricellulaires et un épithélium composé de deux types cellulaires, les cellules caliciformes et les cellules ciliées.

Achèvement de la membrane vitelline dans l'infundibulum

Une fois ovulé, le jaune est tout d'abord capté par l'infundibulum où il reste environ 20 minutes. C'est le lieu d'une éventuelle fécondation ainsi que celui de la synthèse des couches médiane continue et externe fibreuse de la membrane vitelline.

Dépôt du blanc dans le magnum

Le jaune recouvert de la membrane vitelline transite ensuite dans le magnum, le plus long segment de l'oviducte. Le magnum est le lieu de la synthèse de l'ensemble des protéines du blanc. Ces protéines sont fabriquées de façon quasi-continue puis stockées dans les cellules sécrétrices. Lors du passage du jaune, les protéines sont excrétées et déposées autour de celuici pour former le blanc. Ce processus dure environ 4 heures. A la sortie du magnum, le blanc n'est pas totalement hydraté.

Synthèse des membranes coquillières dans l'isthme

L'œuf en formation traverse ensuite l'isthme où il séjourne environ 1 heure. Ce dernier est lui-même divisé en deux parties : l'isthme blanc et l'isthme rouge. Dans chacune de ces deux parties se déroulent respectivement le dépôt des membranes coquillières et la mise en place des noyaux mamillaires, points de départ de la calcification (sites de nucléation de la minéralisation).

Hydratation du blanc et formation de la coquille dans l'utérus

Deux phénomènes se produisent dans l'utérus. Le blanc est tout d'abord hydraté, phénomène appelé « plumping ». L'œuf acquiert ainsi sa forme ovoïde définitive et entre en contact étroit avec la paroi cellulaire de l'utérus. Le second phénomène est la calcification de la coquille, l'étape la plus longue de la formation de l'œuf, qui se déroule selon un processus de biominéralisation à partir des ions et des constituants de la matrice organique sécrétés par l'utérus. La biominéralisation de l'œuf de poule est l'une des plus rapides du monde vivant : en effet, six grammes de coquille sont formés en 19 heures environ. Celle-ci a lieu à basse pression et à basse température sous le contrôle de la matrice organique. Une description plus détaillée de ces mécanismes sera faite dans les paragraphes 2 et 3 de ce chapitre.

L'œuf ainsi formé transite par le vagin avant de rejoindre le cloaque et d'être pondu environ 24 heures après l'ovulation du jaune.

2 Généralités sur les processus de biominéralisation

La biominéralisation consiste en l'élaboration d'une structure minérale complexe par un organisme vivant. Ce mécanisme apparaît comme très répandu dans l'ensemble du monde vivant. Un grand nombre d'organismes sont concernés, qu'ils soient unicellulaires ou pluricellulaires, qu'ils appartiennent au règne animal ou au règne végétal. Il s'agit d'un processus très ancien puisque les organismes marins des mers primitives formaient déjà leur coquille selon un processus de biominéralisation. Ce dépôt de minéraux sous conditions physiologiques par un organisme vivant aboutit à la formation de structures très diversifiées avec des formes, des tailles et des couleurs différentes.

2.1 Les différents processus de biominéralisation

Deux grands types de processus existent (Lowenstam, 1981, Mann, 1983) :

- une minéralisation biologiquement induite

Cette minéralisation est le résultat d'interactions entre l'activité biologique de l'organisme et son environnement (Mann, 1983). Elle ne nécessite pas la mise en place d'une machinerie cellulaire dédiée par l'organisme minéralisant. La biominéralisation induite est retrouvée chez certaines espèces bactériennes ainsi que chez les algues vertes et brunes (Lowenstam, 1981).

- une minéralisation biologiquement contrôlée

La minéralisation biologiquement contrôlée est caractérisée par la présence d'une matrice organique, ensemble de protéines, protéoglycanes et polysaccharides (Mann, 1983). Cette matrice est sécrétée par un épithélium dédié. L'apport des ions constitutifs du minéral est assuré par des transports ioniques spécifiques. Des interactions entre les minéraux et la matrice organique sont mises en évidence (Marin and Luquet, 2004, Nys *et al*, 2004). Ainsi, la matrice organique régule l'initiation de la minéralisation, la croissance des cristaux ainsi que leur type polymorphique sous contrôle génétique.

Deux types de biominéralisation contrôlée sont mis en évidence :

- une biominéralisation contrôlée cellulaire, dans laquelle des cellules sont présentes au site de minéralisation et impliquées dans la régulation du processus. Le squelette des vertébrés, composé de phosphate de calcium $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ en est un exemple. - une biominéralisation contrôlée acellulaire, dans laquelle aucune cellule n'intervient sur le lieu de la biominéralisation. Les coquilles d'œufs d'oiseaux, les coquilles de mollusques, les cuticules de crustacés et les exosquelettes de coraux, composés de carbonate de calcium (CaCO₃) sont des exemples de biominéralisation contrôlée acellulaire carbonatée.

2.2 Principes généraux de la biominéralisation contrôlée carbonatée

Malgré la diversité de formes et de fonctions, les structures biominérales sont élaborées selon les mêmes principes par interaction des ions constitutifs avec la matrice organique présente dans le milieu (Mann, 1983, Addadi and Weiner, 1992) :

_ la définition d'un espace biologiquement compartimenté où le biominéral se formera. Cet espace peut être cellulaire (cas des êtres unicellulaires type bactéries magnétiques), le résultat de fusions cellulaires pour former une vacuole unique (épine de l'oursin formée dans une vacuole allant jusqu'à 25 cm) ou extracellulaire (utérus pour la coquille d'oiseaux). Dans cet espace, les entrées ioniques et organiques sont contrôlées pour atteindre les conditions physico-chimiques précises dans lesquelles la minéralisation pourra se dérouler. Pour exemple, la minéralisation de la coquille des mollusques nacro-prismatiques se déroule dans l'espace extrapalléal. L'épithélium responsable de la minéralisation, appelé le manteau, est situé sous la coquille. Le liquide extrapalléal remplit la cavité et contient tous les ions et les protéines nécessaires au processus de biominéralisation ; les premiers sont amenés de l'hémolymphe vers la cavité au travers des cellules du manteau à l'aide de transporteurs ioniques, les secondes sécrétées par le manteau (Marin and Luquet, 2004). La minéralisation de l'exosquelette de corail se fait au niveau d'un espace défini, le milieu extracellulaire calcifiant sub-calicoblastique. L'épithélium intervenant dans cette synthèse est appelé ectoderme calicoblastique. Les ions nécessaires peuvent être apportés soit par transport transcellulaire soit par transport paracellulaire jusqu'au lieu de la minéralisation et les protéines sont sécrétées par l'ectoderme calicoblastique (Allemand et al, 2011).

- <u>une hypersaturation en ions du milieu</u>. Les ions constitutifs du minéral doivent se trouver en conditions saturantes ($C^+ + A^- \rightarrow CA$, C=cations, A=anions). Le sel CA ainsi formé est en équilibre entre 2 formes (CA soluble, CA solide). Si le produit de solubilité de CA est atteint, la forme solide est favorisée, le sel précipite dans le milieu et le milieu est dit « hypersaturé ».

- <u>la présence de sites de nucléation</u>. Les conditions d'hypersaturation ne sont pas suffisantes à elles seules pour précipiter un sel. L'initiation de la cristallisation ou nucléation primaire se fait à partir de sites de nucléation se trouvant dans le milieu.

- <u>la croissance du minéral</u>. Il s'agit d'une nucléation secondaire qui se déroule à partir des cristaux produits lors de la nucléation précédente. La matrice organique intervient également lors de ce processus en inhibant la croissance du minéral selon un ou plusieurs axes, lui donnant ainsi une morphologie bien déterminée.

- <u>le dépôt d'un type polymorphique cristallin particulier</u>. Pour une même composition chimique, la structure cristalline peut être différente. Par exemple, le carbonate de calcium CaCO₃ existe sous trois polymorphes cristallins anhydres différents : calcite, aragonite et vatérite, chacun ayant ses propriétés cristallines propres. La structure du biominéral obtenue sera différente selon le type polymorphique présent. La coquille des mollusques est ainsi composée de différentes couches minérales qui peuvent être faites d'aragonite ou de calcite et l'exosquelette des coraux est formé d'aragonite.

2.3 Rôle du carbonate de calcium amorphe dans la biominéralisation

Depuis quelques années, le rôle supplémentaire du carbonate de calcium amorphe (ACC) est mis en évidence dans différents exemples de biominéralisations carbonatées. Contrairement aux formes cristallines, les atomes composant le carbonate de calcium amorphe ne présentent pas une organisation régulière dans l'espace. Les formes minérales amorphes ne sont pas ou peu stables et n'ont été observées que récemment. L'ACC a été retrouvé chez les mollusques bivalves Mercenaria mercenaria et Crassostrea gigas au niveau de la coquille larvaire (Weiss et al, 2002) et Mytilus edulis (Medakovic, 2000) et (Allemand et al, 2011)dans les spicules d'oursins Paracentrotus lividus (Beniash et al, 1997) et Strongylocentrotus purpuratus (Raz et al, 2003, Gong et al, 2012). Il est également supposé être présent chez les coraux, par analogie avec son identification chez les octocorailliaires (Weiner et al, 2003).Ce carbonate de calcium amorphe aurait deux fonctions principales : servir de réserve d'ions pour la construction du cristal futur et de précurseur transitoire à la phase minérale cristalline stable présente dans la structure achevée (Addadi et al, 2003). Le mécanisme en quatre étapes proposé pour la formation de la nacre, une des couches de la coquille de mollusque bivalve, souligne l'importance du rôle du carbonate de calcium amorphe. Dans un premier temps, les composants de la matrice organique sécrétés par les cellules du manteau s'assemblent. Dans un deuxième temps, l'apparition d'une première
phase minérale est constatée. Cette première phase serait synthétisée dans des cellules spécialisées puis transportée par des vésicules jusqu'au site de minéralisation et serait constituée de carbonate de calcium amorphe. Dans un troisième temps, l'initiation de la formation des tablettes de nacre se déroule au niveau de sites précis de nucléation. Ces sites, correspondant au centre de chaque tablette, sont riches en carboxyles et sulfates. Cette formation fait appel à la phase minérale amorphe déposée précédemment. Dans un dernier temps, les tablettes d'aragonite se développent. Elles s'allongeraient tout d'abord verticalement jusqu'à atteindre le feuillet de chitine situé au-dessus puis horizontalement jusqu'à rencontrer les tablettes voisines. Lors de cette croissance, certaines protéines généralement acides sont intégrées dans la nacre au contraire des protéines hydrophobes contenues dans le gel qui sont repoussées en périphérie des tablettes (Levi-Kalisman *et al*, 2001, Addati *et al*, 2006).

3 <u>Biominéralisation carbonatée de la coquille d'œuf</u> <u>de poule</u>

La biominéralisation de la coquille d'œuf de poule est un exemple de biominéralisation contrôlée acellulaire carbonatée qui répond aux différentes règles énoncées paragraphe 2.2. L'utérus de la poule, le dernier compartiment de l'oviducte, constitue l'espace biologiquement compartimenté où le biominéral se formera. Il sécrétera au sein d'un fluide acellulaire (le fluide utérin) l'ensemble des précurseurs organiques et minéraux nécessaires à la calcification de la coquille. Le fluide utérin est hypersaturé en ions calcium et carbonate par rapport au produit de solubilité de la calcite, le polymorphe cristallin présent dans la coquille (Nys *et al*, 1991). Les noyaux mamillaires, amas de matière organique répartis sur les membranes coquillières, servent de sites de nucléation et de point de départ de la minéralisation.

3.1 Apports des ions dans l'utérus

La coquille est constituée de 95% de carbonate de calcium, formé à partir d'ions calcium Ca^{2+} et d'ions hydrogénocarbonate HCO_3^- , selon l'équation suivante :

$$\operatorname{Ca}^{2+} + \operatorname{HCO}_3^{-} = \operatorname{CaCO}_3 + \operatorname{H}^+.$$

Elle pèse 5 à 6 g et sa formation nécessite un apport important de calcium (> 3g) et d'hydrogénocarbonate au sein du fluide utérin pour conduire à l'hypersaturation de ce dernier et permettre la minéralisation de la coquille. C'est un effort métabolique considérable au regard d'un animal pesant moins de 2 kg et qui doit effectuer cette biominéralisation de manière quasi-quotidienne.

Des modèles récents ont conduit à l'identification d'un certain nombre de transporteurs ioniques intervenant dans le processus de minéralisation et fournissent un schéma global et cohérent des apports ioniques au travers des cellules de l'utérus (Figure 4) (Jonchere *et al*, 2012, Brionne *et al*, 2014).

Synthèse bibliographique



Figure 4 : Schéma global et cohérent des transports et échanges ioniques dans la cellule utérine durant la calcification de la coquille (Brionne *et al*, 2014 adapté de Jonchere *et al*, 2012)

Les ions calcium et hydrogénocarbonate sont présents dans le sang et transférés dans le fluide *via* la cellule utérine.

La totalité du calcium est d'origine alimentaire (Nys, 2010). Cependant, suite à la désynchronisation entre l'apport diurne en calcium et la synthèse nocturne de la coquille, une partie des ions calcium (30 à 40%) provient des os par déminéralisation (Nys and Guyot, 2011), qui sont ensuite reminéralisés dans la journée lors de l'ingestion alimentaire du calcium. Les ions Ca^{2+} sont prélevés dans le plasma sanguin en particulier par le canal TRPV6 et pris en charge dans la cellule par la calbindine-1. Ils sont transportés hors de la cellule vers le fluide utérin par deux familles d'échangeurs à calcium, des échangeurs $Ca^{2+}/2H^+$ (ATP2B1 et ATP2B2) et Ca^{2+}/Na^+ (SLC8A1 et SLC8A3).

Les ions HCO_3^- sont prélevés dans le plasma sanguin par une famille de co-transporteurs HCO_3^-/Na^+ (SLCA4, SCLA5 et SLCA10). Ils sortent de la cellule vers le fluide utérin en échange d'ions Cl⁻ par l'échangeur SLC26A9. Ils peuvent également provenir de l'hydratation du CO₂ dissous dans le plasma sanguin, qui se diffuse jusqu'au fluide utérin à travers les cellules de la paroi utérine. Cette hydratation est catalysée par une famille d'enzymes appelée anhydrases carboniques dont deux membres, les anhydrases carboniques 2 et 4, ont pu être identifiées dans la cellule utérine et le fluide. Elle se déroule selon l'équation suivante : $CO_2 +$

 $H_2O = HCO_3^- + H^+$. Cette réaction peut avoir lieu dans le cytosol des cellules utérines ou dans le fluide utérin.

Ces transports actifs nécessitent de l'énergie et des co-transports avec d'autres ions. L'entrée d'ions HCO_3^- dans la cellule a pour conséquence l'entrée simultanée d'ions Na^+ ; la sécrétion dans le fluide des ions Ca^{2+} et HCO_3^- conduit à une entrée dans la cellule d'ions Na^+ , Cl^- et H^+ qui seront éliminés vers le sang *via* une entrée d'ions K^+ et H^+ . Ceci implique de nombreux échanges réalisés par des transporteurs spécifiques (CLCN5, ATP1B1, ATP1A1 et NKAIN4) afin de maintenir l'homéostasie cellulaire et permettre la survie des cellules de la paroi utérine.

De plus, il est à noter que la synthèse d'ions HCO₃⁻ puis la formation du CaCO₃ dans les cellules utérines et le fluide utérin conduisent à la production d'ions H⁺. Ces ions doivent être évacués de ces compartiments vers la circulation sanguine afin de ne pas conduire à une acidification importante de ces milieux. Ce rôle est joué par les transporteurs ATP2B1, ATP2B2, ATP6V1B et ATP6V1C2.

La coquille contient de faibles quantités de magnésium, de fer et de cuivre. Des transporteurs permettent l'entrée de magnésium dans la cellule utérine (SLC41A2, SLC41A3 et NIPAL1). STEAP3, quant à lui, est connu pour réduire les ions Fe^{3+} en ions Fe^{2+} et les ions Cu^{2+} en ions Cu^{+} et interviendrait dans l'homéostasie du fer.

3.2 <u>Calcification de la coquille</u>

3.2.1 <u>Séquence de dépôt des différentes couches de la coquille</u>

Les membranes coquillières créent une séparation entre le blanc et la coquille et servent ainsi d'appui à la mise en place de la partie calcifiée de la coquille. Elles sont élaborées dans l'isthme et constituées d'un réseau de fibres de nature protéique. Elles sont au nombre de deux : une membrane interne d'environ 20 µm d'épaisseur et une membrane externe d'environ 50 µm d'épaisseur. Le diamètre des fibres est de 0,5 nm dans la membrane interne et de 0,8 nm dans la membrane externe (Nys and Guyot, 2011). Les premières études portant sur la composition des membranes coquillières ont évoqué la présence de kératine et le terme ovokératine avait alors été proposé. Cependant, des études postérieures utilisant notamment des anticorps ont confirmé l'absence de kératine (Leach, 1982, Chowdhury, 1990, Arias *et al*, 1991). L'identification de desmosine, d'isodesmosine, d'hydroxylysine et d'hydroxyproline, rapportée par Leach (Leach, 1982) et Chowdhury (Chowdhury, 1990), ont suggéré la présence d'élastine et de collagènes. La présence de différents isoformes de collagènes (de type I, V et X) a été confirmée (Wong *et al*, 1984, Carrino *et al*, 1996, Fernandez *et al*, 1997). Le collagène de type X a pu être mis en évidence par immunohistochimie sur des membranes non calcifiées (Fernandez *et al*, 1997) et par hybridation *in situ* et Northern Blot sur les différents tissus de l'oviducte (Wang *et al*, 2002). Cet isoforme pourrait inhiber le dépôt cristallin au travers des membranes coquillières (Arias *et al*, 1997). Les membranes coquillières seraient ainsi formées de 70 à 75% de protéines fibrillaires contenant des pontages dérivés de la lysine, de 10% de collagènes et de glycoprotéines (Leach, 1982, Chowdhury, 1990, Hincke *et al*, 2011). La présence d'élastine n'a pu être démontrée mais une protéine riche en cystéine, appelée CREMP (Cystein Rich Eggshell Membrane Protein), a récemment été identifiée (Kodali *et al*, 2011). Cette protéine est constituée de répétitions de deux modules contenant chacun quatre cystéines (module a : $C-X_4-C-X_5-C-X_8-C-X_6$ et module b : $C-X_4-C-X_5-C-X_8-C-X_{11}$). Ces répétitions sont organisées de plusieurs façons possibles ((a)_n, (a-b)_n ou (a-b-b)_n par exemple). Cette identification est cohérente avec l'analyse en acides aminés des membranes coquillières qui montre que les résidus cystéines représentent 10% du total.

Une fois la mise en place des membranes coquillières achevée et les noyaux mamillaires déposés dans l'isthme, l'œuf en formation pénètre dans l'utérus. Les noyaux mamillaires sont composés de matière organique et représentent les sites d'initiation de la minéralisation à partir desquels le cristal va se former. La partie calcifiée de la coquille se déposera au sein de l'utérus selon un processus en trois phases (Figure 5) (Nys *et al*, 1991) :

- Ia phase initiale : elle se caractérise par le dépôt des noyaux mamillaires sur les membranes coquillières et celui des premiers cristaux de calcite autour de ces derniers. La vitesse de cristallisation est faible. Elle est initiée dans l'isthme et se poursuit principalement dans l'utérus.
- Ia phase de croissance active : durant cette phase, la croissance cristalline est la plus rapide avec un dépôt de 0,33 g de coquille/heure.
- La phase terminale : cette phase se caractérise par la minéralisation de la couche de cristaux verticaux qui précède l'arrêt de la minéralisation et le dépôt de la couche la plus externe de l'œuf, la cuticule, composée de matière organique.



Figure 5 : Graphique des différentes phases de la formation de la coquille (adapté de Nys, 2010)

La première couche minéralisée en surface des membranes coquillières est la **couche mamillaire ou couche des cônes**, épaisse d'environ 70 μ m (Guerin-Dubiard *et al*, 2010). Elle est déposée entre 6 et 10 heures après l'ovulation au cours de la phase initiale (Nys *et al*, 1991) par accumulation de carbonate de calcium sous forme de calcite sur les noyaux mamillaires. Cette couche est formée de structures en cônes renversés.

Les noyaux mamillaires sont répartis à intervalles réguliers sur toute la surface des membranes coquillières. Leur composition organique a été peu étudiée. Il est rapporté la présence de mucopolysaccharides, d'hexosamides, d'hexoses et d'acide sialique (Arias *et al*, 1993). Un kératane sulfate, appelé le mammillan, a été décrit et jouerait un rôle important dans la minéralisation par ses propriétés de liaison au calcium, plus particulièrement dans les premiers évènements de nucléation (Arias and Fernandez, 2001, Fernandez *et al*, 2001). Toutefois, depuis ces études, la présence de ce constituant n'a jamais pu être montrée et son cœur protéique être identifié.

Les cristaux de calcite ensuite déposés sur les noyaux mamillaires ont une forme allongée sous l'action de la matrice organique (Figure 6 a) (Rodriguez-Navarro and Garcia-Ruiz, 2000). Il s'agit d'une croissance anisotropique du cristal, c'est à dire différente selon les directions de l'espace. Cet allongement est induit par l'adsorption de protéines de la matrice organique sur les faces cristallines parallèles à l'axe-*c*, inhibant ainsi la croissance cristalline dans les directions perpendiculaires à ce dernier et favorisant l'élongation du cristal. Le dépôt des premiers cristaux de calcite se fait de façon sphérulitique, sans orientation privilégiée de leur axe-*c*, comme le montre les observations en lumière polarisée (Figure 7 a) (Nys *et al*, 2004) et la modélisation (Figure 6 a).



Figure 6 : Modélisation du processus d'évolution des cristaux de carbonate de calcium au cours de la biominéralisation de la coquille d'œufs d'oiseaux (Rodriguez-Navarro and Garcia-Ruiz, 2000)



Figure 7 : Coupes de coquilles observées en lumière polarisée (a) au niveau des noyaux mamillaires (b) au milieu de la couche palissadique (c) en haut de la couche palissadique

Les flèches présentes sur les photographies indiquent l'axe-c des cristaux de calcite

(Nys et al, 2004)

Au cours de la phase de minéralisation active (10-22 heures après l'ovulation), la minéralisation se poursuit et aboutit à la fusion des cônes adjacents donnant une structure minérale compacte en palissade appelée **couche palissadique**. Cette dernière, épaisse d'environ 200 μ m, représente les 2/3 de la hauteur de la coquille (Nys and Guyot, 2011). Les endroits où les cônes n'ont pas fusionné forment les pores de la coquille, essentiels aux échanges gazeux entre l'embryon et le milieu extérieur. Environ 10000 pores traversent la coquille (Nys, 2010). Une compétition entre des cristaux adjacents a lieu lors de la mise en place de la structure cristalline (Figure 6 b). Ainsi, il existe un phénomène d'inhibition physique lorsque deux cristaux en croissance se rejoignent. Cette compétition conduit à ce que seuls les cristaux perpendiculaires à la surface de l'œuf puissent se développer sur la totalité de la hauteur de la coquille (Figure 6 c.). Par contre, les cristaux dont l'axe de croissance est orienté vers les membranes coquillières ne pourront pas se développer. Une orientation privilégiée des cristaux avec un axe-*c* perpendiculaire à la surface de l'œuf se met ainsi progressivement en place. Cette orientation est mise en évidence par des observations en lumière polarisée (Figure 7 b et c).

La couche des cristaux verticaux, d'une épaisseur de moins de 10 µm, est la dernière couche cristalline située juste sous la cuticule (Nys, 2010). C'est une fine couche de cristaux

orientés verticalement et déposés perpendiculairement à la surface de l'œuf sur la couche palissadique.

La cuticule est la couche la plus externe de la coquille. Elle est constituée de matière organique et est épaisse d'environ 10 µm. Elle est déposée lors de la phase après l'arrêt de la minéralisation, 2 heures environ avant la ponte de l'œuf (Nys and Guyot, 2011). Elle est divisée en une couche interne plus riche en minéraux et une couche externe pauvre en minéraux (Dennis et al, 1996). Elle est déposée sur la surface entière de l'œuf et recouvre les pores présents à la surface de la coquille (Hincke et al, 2011). Au moment de la ponte, cette couche est fragile, va rapidement sécher et prendre l'aspect d'une boue sèche. Les fissures qui apparaissent autorisent les échanges gazeux via les pores mais, par leur taille, ne permettent pas la pénétration de microbes (Solomon, 1991). La cuticule assure donc une protection antimicrobienne de l'œuf si elle reste intacte. Contrairement au reste de la coquille, il est à noter la présence de phosphate de calcium, sous forme d'hydroxyapatite, au niveau de la couche interne. Celui-ci pourrait agir comme un inhibiteur de la minéralisation (Dennis et al, 1996). La cuticule contient également la majorité des pigments (protoporphyrines) qui donnent sa couleur à la coquille des œufs bruns (Nys et al, 1991). Des glycoprotéines (mucines) et différents sucres (galactose, mannose, fucose, hexoamine) y ont également été mis en évidence (Arias et al, 1993). Rose-Martel et collaborateurs ont réalisé le protéome de la cuticule et identifié 47 protéines dans cette couche (Rose-Martel et al, 2012). Des informations complémentaires sur les protéines présentes et leurs fonctions seront données dans le paragraphe 4 de ce chapitre.

3.2.2 <u>Matrice organique et biominéralisation de la coquille</u>

La matrice organique joue un rôle fondamental dans la minéralisation et dans l'élaboration de la structure et, par conséquent, des propriétés mécaniques de la coquille (Nys *et al*, 1999, Nys *et al*, 2004, Gautron and Nys, 2007b). La mise en évidence d'un changement de la composition protéique du fluide utérin lors des différentes phases de calcification est une observation expérimentale indirecte qui suggère une variation du contenu organique lors du processus de calcification (Gautron *et al*, 1997). Une intervention de la matrice organique dans le processus de calcification implique une interaction de celle-ci avec la phase minérale pour contrôler la croissance minérale, la morphologie des cristaux de calcite et leur allongement comme montré *in situ*. Cette hypothèse a été confirmée par différentes approches expérimentales *in vitro, in vivo* et génomique.

Approche in vitro

Des propriétés de liaison au calcium ont été observées pour des fractions protéiques de la matrice organique (Abatangelo *et al*, 1978, Wheeler *et al*, 1981, Hincke *et al*, 1992) et des protéoglycanes à kératanes et dermatanes sulfates de la coquille (Arias *et al*, 1992) ainsi que pour des bandes protéiques du fluide utérin (Gautron *et al*, 1997).

L'un des tests fréquemment utilisé auparavant pour confirmer l'interaction matriceminéraux consistait à mesurer la vitesse de précipitation du carbonate de calcium (Wheeler *et al*, 1981). Ainsi, il avait été observé que l'ajout de protéines extraites de la coquille d'œuf de poule retardait cette précipitation, d'une manière dose-dépendante (Arias *et al*, 1992, Arias *et al*, 1993, Gautron *et al*, 1996). L'ajout de fluide utérin total n'a pas le même effet en fonction du stade de minéralisation auquel il est prélevé. La vitesse de précipitation du carbonate de calcium est augmentée par rapport aux conditions contrôles lorsque le fluide ajouté est prélevé aux stades initial ou croissance, alors qu'elle est diminuée lorsque le fluide ajouté est prélevé au stade terminal. Lorsque le fluide utérin est dialysé de manière à n'en conserver que les macromolécules, la précipitation du carbonate de calcium est alors ralentie, quel que soit le stade (Gautron *et al*, 1997).

La méthode de Wheeler (1981) utilisée auparavant ne permettant pas l'analyse d'effets homogènes des protéines sur la morphologie de cristaux formés *in vitro*, une micro-méthode réalisée au moyen d'un dispositif appelé champignon de minéralisation a été développée pour permettre une bonne reproductibilité et une homogénéité des cristaux de carbonate de calcium (Dominguez-Vera *et al*, 2000). Un faible volume de solution favorise une diffusion homogène du CO₂ dans la gouttelette de solution de CaCl₂. Ce test mené dans des conditions contrôles démontre la répartition suivante entre les différents polymorphes de carbonate de calcium : 55% pour la calcite et 22,5% pour chacun des deux autres polymorphes, la vatérite et l'aragonite (Hernandez-Hernandez *et al*, 2008a).

Ce dispositif a été utilisé en présence de fluide utérin ou de différentes fractions protéiques de la matrice organique. En présence de fluide utérin prélevé à chacun des stades de calcification de la coquille, il est observé que seul le polymorphe calcite est obtenu. Le nombre de cristaux formés est augmenté, leur taille et le temps de latence pour les obtenir sont diminués (Tableau 1) et leurs morphologies modifiées par rapport aux conditions contrôles (Figure 8) (Dominguez-Vera *et al*, 2000, Hernandez-Hernandez *et al*, 2008a).

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des résultats des tests de cristallisation *in vitro*en présence de fluides utérins prélevés à chacun des stades de la calcification(Hernandez-Hernandez *et al*, 2008a)

Condition	Concentration protéique (µg/mL)	Temps de latence (min)	Nombre de cristaux	Types polymorphiques	Taille des cristaux (μm)
Contrôle	0	~900	40	55% calcite 22% vatérite 23% aragonite	100-200
Fluide utérin stade initial	92	<0.2	>10000	100% calcite	6-20
Fluide utérin stade croissance	455	< 0.2	>10000	100% calcite	5-52
Fluide utérin stade terminal	163	<0.2	>10000	100% calcite	5-22



Calcite contrôle



Fluide utérin stade initial



Fluide utérin stade croissance



Fluide utérin stade terminal

Figure 8 : Photographies au microscope électronique à balayage montrant les modifications morphologiques des cristaux de calcite en présence de fluide utérin prélevés à chacun des stades de la calcification (Dominguez-Vera *et al*, 2000)

Dans une autre étude, huit fractions de protéines de la matrice organique de coquille d'œuf de poule ont été obtenues par chromatographie liquide. En présence de ces fractions, seule la calcite est observée. Par contre, les différentes fractions n'ont pas les mêmes effets sur le temps de latence pour obtenir les premiers cristaux ainsi que le nombre et la taille des cristaux formés (Tableau 2) (Hernandez-Hernandez *et al*, 2008b).

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des résultats des tests de cristallisation *in vitro*en présence de fractions de protéines de coquille d'œuf de poule(Hernandez-Hernandez et al, 2008b)

Fugation	Temps de	Nombre de	% types polymorphiques CaCO3			Taille des cristaux
Fraction	latence (min)	cristaux	Calcite	Aragonite	Vatérite	(µm)
Contrôle 1	1100	124	60	18	22	~90
G	1680	12	100	0	0	86
Н	1100	147	100	0	0	59
N	1300	112	100	0	0	195
R	>1300	10	100	0	0	130-230
Contrôle 2	960	77	55	22,5	22,5	~95
c'	960-1200	59	100	0	0	62
g'	960-1200	40	100	0	0	62-118
i'	960-1200	77	100	0	0	49-138
k'	>1360	11	100	0	0	118,5

> Approche *in vivo*

Les interactions qui se produisent entre les constituants de la matrice organique et la phase minérale au cours de la minéralisation affectent la morphologie des cristaux et, par conséquent, la texture de la coquille (taille et orientation des cristaux) et ses propriétés mécaniques. Cette hypothèse implique une variation de la quantité des protéines de la matrice organique selon les propriétés mécaniques de la coquille. Deux études ont permis de mettre en évidence cette relation (Panheleux et al, 2000, Ahmed et al, 2005). Dans la première, des œufs issus de poules jeunes qui se caractérisent par des coquilles solides ont été comparés à des œufs issus de poules plus âgées à coquilles plus fragiles. Il a été constaté que la concentration totale des protéines de la matrice organique ne variait pas en fonction de l'âge des poules. A contrario, la concentration relative de deux protéines non spécifiques de la coquille était plus élevée dans la matrice organique des coquilles d'œufs de poules âgées que dans celle des coquilles d'œufs de poules jeunes (Panheleux et al, 2000). La seconde utilise le modèle de la mue et compare des œufs issus des mêmes poules au même âge prélevés avant et après la mue. Les œufs prélevés après la mue présentent une amélioration des propriétés mécaniques de leur coquille. Il est observé une augmentation de la quantité relative de protéines spécifiques de la matrice organique et une diminution de la quantité de protéines non-spécifiques suite à la restauration de la qualité de la coquille (Ahmed et al, 2005). Ces études mettent en évidence une corrélation entre la composition de la matrice organique et la qualité de la coquille.

Approche génomique

Dunn et collaborateurs (Dunn *et al*, 2009a, Dunn *et al*, 2012) ont identifié des polymorphismes simples dans certains gènes codant pour des protéines de la matrice organique de la coquille au sein d'une population de poules Rhode Island Red. Ils ont également réalisé différentes mesures phénotypiques de qualité de coquille telles que la rigidité dynamique, la résistance à la rupture, l'épaisseur de la couche mamillaire, la taille et l'orientation des cristaux composant la coquille sur cette même population. Des associations entre mesures phénotypiques et polymorphismes des gènes ont été établies.

Takahashi et collaborateurs (Takahashi *et al*, 2009) ont réalisé un croisement sur deux générations entre deux lignées divergentes sélectionnées sur la résistance de la coquille (une lignée à coquille forte et une lignée à coquille faible) et mesuré différents paramètres morphologiques de l'œuf et de la coquille (petite et grande longueur de l'œuf, masse de l'œuf et de la coquille, épaisseur de la coquille). Des QTL (Quantitative Trait Loci) influençant ces différents paramètres ont pu être identifiés sur le chromosome 9.

4 <u>Protéines des matrices organiques associées aux</u> <u>biominéraux</u>

L'identification et la caractérisation fonctionnelle des protéines composant les matrices organiques associées aux biominéraux a été un axe majeur de recherche pour mieux comprendre le phénomène de minéralisation et plus particulièrement les interactions entre matrice organique et partie minérale.

4.1 Inventaire de la matrice organique de la coquille d'œuf de poule

L'identification et la caractérisation des protéines de la matrice organique de la coquille d'œuf de poule se sont déroulées en deux grandes phases : par des méthodes biochimiques et moléculaires jusqu'en 2006 puis par des techniques à haut-débit à partir de 2006 (protéomique et transcriptomique).

4.1.1 <u>Protéines identifiées par des méthodes biochimique et moléculaire</u>

Onze protéines, parmi les plus abondantes, ont été identifiées dans le fluide utérin de la poule et la matrice organique de la coquille d'œuf par différentes techniques biochimiques et immunologiques (Western Blotting, immunohistochimie, immunofluorescence ou immunocytochimie) et moléculaires (clonage, séquençage, criblage d'expression à l'aide d'une banque cDNA de l'utérus de poule, Northern et Southern Blotting, qRT-PCR).

Deux d'entre elles sont des protéines ubiquitaires, l'ostéopontine (Pines *et al*, 1995) et la clusterine (Mann *et al*, 2003). L'ostéopontine, d'abord identifiée dans l'os de rat, participe à sa calcification. Chez la poule, l'ostéopontine est retrouvée à la fois au niveau de l'os et de la coquille. Dans celle-ci, elle a été localisée dans les membranes coquillières, les noyaux mamillaires (Fernandez *et al*, 2003, Chien *et al*, 2008) et la couche palissadique (Chien *et al*, 2008, Hincke *et al*, 2008). La clusterine, quant à elle, a été localisée dans les membranes coquillières et dans l'ensemble des couches calcifiées de la coquille, en quantité plus importante dans la couche mamillaire, le haut de la couche palissadique et la couche des cristaux verticaux (Mann *et al*, 2003). Elle est plus abondante dans le fluide utérin lors de la phase de croissance active (Mann *et al*, 2003).

Trois autres sont des protéines également identifiées dans le blanc, l'ovalbumine (Hincke, 1995), le lysozyme (Hincke *et al*, 2000) et l'ovotransferrine (Gautron *et al*, 2001b). Les

ARNm codant le lysozyme et l'ovotransferrine sont exprimés dans tous les segments de l'oviducte (magnum, isthme blanc, isthme rouge et utérus) (Hincke et al, 2000, Gautron et al, 2001b). Le niveau d'expression est le plus élevé dans le magnum où sont synthétisées les protéines du blanc, important dans l'isthme blanc où se forment les membranes coquillières et significatif dans les régions de l'oviducte impliquées dans le processus de calcification de la coquille (isthme rouge et utérus). La présence du lysozyme et de l'ovotransferrine dans la coquille n'est donc pas uniquement le fait d'une diffusion passive le long de l'oviducte (du magnum, organe où est sécrété le blanc, à l'utérus, lieu de dépôt de la coquille) mais bien le résultat d'une synthèse par l'utérus. Le lysozyme et l'ovotransferrine sont présents principalement dans les couches basales de la coquille (membranes coquillières et couche mamillaire) ainsi que dans le fluide utérin, en concentration plus élevée au stade initial pour l'ovotransferrine et au stade croissance pour le lysozyme (Hincke et al, 2000, Gautron et al, 2001b). Le lysozyme est également retrouvé dans la couche palissadique, en concentration plus élevée dans les zones internes que dans les zones externes (Hincke et al, 2000). De la même façon, l'ovalbumine est retrouvée dans la coquille au niveau des noyaux mamillaires (Hincke, 1995). Elle est également présente dans le fluide utérin tout au long de la formation de la coquille, avec cependant une concentration beaucoup plus élevée durant la phase initiale (Gautron *et al*, 1997).

Les six protéines suivantes ont été définies comme des protéines spécifiques de la coquille d'œuf de poule car leurs séquences étaient uniquement trouvées dans la matrice organique de la coquille et leur expression limitée aux tissus impliqués dans la minéralisation (isthme rouge et utérus). Ces protéines ont été nommées ovocléidine ou ovocalyxine (du latin ovo pour œuf associé au grec kleidoun pour verrouiller ou au latin calvx pour coquille) suivie de leur masse moléculaire apparente. L'ovocléidine-17 est la première protéine de la coquille à avoir été purifiée (Hincke et al, 1995). Elle est synthétisée par les cellules tubulaires de l'utérus pour être sécrétée dans le fluide et incorporée en abondance dans la coquille. Elle est détectée à travers toute la coquille et est présente en quantité plus importante au niveau des noyaux mamillaires (Hincke et al, 1995). Le gène codant l'ovocléidine-116 est le premier à avoir été cloné (Hincke et al, 1999). Cette protéine correspond à une bande de 116 kDa présente dans le fluide utérin uniquement au stade croissance de la calcification de la coquille d'œuf (Hincke et al, 1999). L'ovocalyxine-32 est une protéine de 32 kDa détectée dans le fluide utérin, principalement au stade terminal de formation de la coquille, ainsi que dans les couches les plus externes de la coquille (haut de la couche palissadique, couche des cristaux verticaux et cuticule) (Gautron et al, 2001a). L'ovocalyxine-36 est abondamment présente dans le fluide utérin collecté au stade croissance de la formation de la coquille et plus faiblement présente dans le fluide utérin aux stades initial et terminal de la calcification. Elle est présente dans la totalité de la coquille avec une réaction positive plus intense observée au niveau de la région interne adjacente aux membranes coquillières à l'interface avec la couche mamillaire. Elle est également détectée dans les membranes coquillières et en surface de la coquille (Gautron *et al*, 2007a). L'ovocalyxine-21 correspond à une bande de 21 kDa présente dans le fluide utérin au stade croissance et terminal de la calcification (Gautron and Nys, 2007a). L'ovocalyxine-25 est également une protéine spécifique de la matrice organique dont la présence a été récemment rapportée dans la coquille (Gautron and Nys, 2007a). Elle a été identifiée par criblage d'expression d'une banque cDNA de l'utérus de poule.

Des anticorps dirigés contre des protéines identifiées dans la matrice organique de la coquille d'œuf de poule permettent de mettre en évidence des homologues chez d'autres espèces d'oiseaux (Panheleux *et al*, 1999). Ainsi, il est retrouvé une protéine proche de l'ovalbumine chez la dinde, le canard de Pékin, la pintade, l'oie, la caille et le faisan ainsi qu'une protéine analogue de l'ovocléidine-17 chez toutes les espèces citées précédemment à l'exception de la caille. Les coquilles d'œufs de dinde et de caille contiennent un analogue de l'ovotransferrine. Ces résultats tendraient à prouver un contrôle du processus de minéralisation par des protéines apparentées chez différentes espèces aviaires (Panheleux *et al*, 1999).

4.1.2 Protéines et transcrits identifiés par des méthodes à haut-débit

Les techniques «classiques» d'identification des protéines de l'œuf ont permis l'identification des protéines majeures de l'œuf. Le récent développement de la génomique fonctionnelle a transformé de manière considérable la biologie et la biotechnologie. Ces avancées ont eu un impact important sur l'identification et la caractérisation des protéines de l'œuf (Gautron *et al*, 2007b, Gautron *et al*, 2010, Guerin-Dubiard *et al*, 2010, Gautron *et al*, 2011a).

Analyses protéomiques

Au cours des dix dernières années, différentes études protéomiques ont été réalisées chez la poule pondeuse. Elles portent à la fois sur la matrice organique de la coquille (Miksik *et al*, 2003, Mann *et al*, 2006, Mann *et al*, 2007a, Miksik *et al*, 2007, Miksik *et al*, 2010, Rose-Martel *et al*, 2012, Sun *et al*, 2013) et le fluide utérin (Sun *et al*, 2013).

Mann et collaborateurs (Mann *et al*, 2006, Mann *et al*, 2007a) ont extrait la matrice organique après déminéralisation de la coquille et analysé la fraction soluble de cette matrice

par des méthodes protéomiques. Dans la première étude (Mann et al, 2006), 520 protéines différentes ont ainsi pu être mises en évidence dans la fraction soluble de la coquille et classées en trois groupes en fonction de l'abondance relative des protéines mesurée par un index d'abondance protéique modifié (emPAI). Un total de 32 protéines (6% du nombre de protéines identifiées) constitue le groupe des protéines en forte abondance. Il contient les protéines déjà identifiées par les méthodes classiques (ovocléidines, ovocalyxines, protéines du blanc et ubiquitaires à l'exception de l'ostéopontine, présente dans le groupe des protéines de faible abondance). Les autres protéines de ce groupe sont connues pour être des protéines cytoplasmiques, des protéines du blanc (dont deux antiprotéases, cystatine et ovoinhibiteur), des protéines décrites au préalable dans de nombreux autres fluides biologiques (comme l'albumine sérique, l'hémopexine ou des protéines de liaison à la vitamine D), des protéines non caractérisées ayant des similarités de séquences avec celles liant les intégrines ou possédant des domaines relatifs aux protéines antimicrobiennes ou pour être impliquées dans le métabolisme lipidique. Le groupe des protéines d'abondance intermédiaire est constitué de 74 protéines qui représentent 14% du nombre de protéines identifiées. Il contient des protéines de signalisation et des protéines reliées au système immunitaire (contenant un domaine analogue aux immunoglobulines ou β -défensines aviaires). Le reste des protéines, 80% du nombre de protéines identifiées, constitue le groupe des protéines de faible abondance.

La fraction insoluble de la matrice organique de la coquille a également été explorée (Miksik *et al*, 2003, Miksik *et al*, 2007, Miksik *et al*, 2010). Parmi les 31 protéines identifiées, 7 n'étaient pas encore connues et incluaient 5 protéines collagéniques de structure fibrillaire.

Une analyse protéomique de la couche la plus externe de la coquille, la cuticule, a identifié 47 protéines dans cette couche bien connue pour jouer un rôle majeur dans la prévention de la pénétration microbienne, dont 5 étaient décrites pour la première fois dans la coquille (Rose-Martel *et al*, 2012).

Dans une étude récente, Sun et collaborateurs (Sun *et al*, 2013) ont identifié 466 protéines dans la matrice organique de la coquille d'œuf de poule collectée au stade croissance (18 heures après l'ovulation). Les auteurs indiquent que 320 protéines identifiées dans leur étude sont communes avec celles décrites par Mann et collaborateurs (2006). Parallèlement, Sun et collaborateurs ont réalisé le protéome du fluide utérin collecté au stade croissance et identifié 560 protéines dont 244 sont communes avec les protéines de la matrice organique (Sun *et al*, 2013).

Les études décrites ci-dessus ont toutes été réalisées chez *Gallus gallus*. Une seule autre étude a été réalisée sur la coquille d'un autre oiseau. Il s'agit de la dinde *(Meleagris gallopavo)* et 697 protéines de la matrice organique ont été identifiées dans cette étude (Mann and Mann, 2013). La comparaison entre les protéomes de coquilles d'œufs de poule et de dinde met en évidence 52% de protéines communes entre les deux espèces. Parmi les 697 protéines identifiées, 47 sont considérées comme les plus abondantes dont 43 (soit 94%) sont également identifiées chez la poule (Mann and Mann, 2013).

Analyses transcriptomiques

Les protéines de la matrice organique sont sécrétées à partir de la maturité sexuelle de la poule par l'utérus qui est le lieu de calcification de la coquille. L'analyse transcriptomique de ce tissu adulte permet donc d'analyser les gènes qui sont exprimés pour participer à la minéralisation de l'œuf. Au total, 5 études transcriptomiques du tissu utérin ont été réalisées (Yang *et al*, 2007, Dunn *et al*, 2009b, Jonchere *et al*, 2010, Liu *et al*, 2013, Brionne *et al*, 2014).

Dunn et collaborateurs (Dunn *et al*, 2009b) ont réalisé l'une des premières études en relation avec l'appareil reproducteur de la femelle pondeuse et ont comparé l'expression des gènes entre des poules matures et des poules juvéniles. Cette étude a mis en évidence 266 gènes différentiellement exprimés lors de la production d'œufs à maturité sexuelle.

Les 4 autres études ont été réalisées sur l'utérus de la poule après maturité sexuelle.

Yang et collaborateurs (Yang *et al*, 2007) ont comparé l'expression des gènes utérins entre 2 souches de poules pondeuses différentes qui produisent peu ou beaucoup d'œufs. L'utérus a été recueilli 2 heures après l'ovulation lorsque l'œuf est dans le magnum (synthèse des protéines du blanc). Cette étude identifie 85 transcrits différentiellement exprimés entre les deux souches (fold change \geq 3). Parmi ceux-ci, 34 sont impliqués dans la transduction de signal, la synthèse des protéines ou le métabolisme, l'adhésion ou l'organisation cellulaires. Ils peuvent être divisés en 2 groupes en fonction de leur variation d'expression : 16 sont plus exprimés chez les poules pondant peu d'œufs et 18 plus exprimés chez les poules pondant beaucoup d'œufs.

L'analyse transcriptomique de l'utérus en se basant sur la spécificité spatiale et temporale du dépôt des constituants de l'œuf dans l'oviducte a ensuite été réalisée (Jonchere *et al*, 2010). L'expression des gènes de l'utérus pendant la phase active de minéralisation a été comparée à celle de deux autres segments de l'oviducte, le magnum et l'isthme, non impliqués dans la formation de la coquille. Un total de 605 transcrits sont surexprimés dans l'utérus par rapport aux deux autres segments, représentant 469 gènes uniques et 437 protéines différentes (Jonchere *et al*, 2010). L'analyse des transcrits a établi que 54 d'entre eux codent pour des protéines présentant un peptide signal qui sont potentiellement sécrétées par l'utérus pour être déposées dans la coquille et/ou jouer un rôle dans la biominéralisation. Cette étude a été complétée par l'analyse comparative du tissu utérin au même stade physiologique (milieu de la phase active de calcification) lorsqu'il y a ou non calcification de la coquille (Brionne *et al*, 2014). Au total, 302 gènes sont surexprimés dans l'utérus durant la calcification de la coquille. Parmi ceux-ci, 57 codent pour des protéines qui sont potentiellement sécrétées pour jouer un rôle dans le processus de biominéralisation (Brionne *et al*, 2014).

Une étude récente a utilisé des puces de type Affymetrix pour analyser l'expression des gènes de l'utérus potentiellement impliqués dans la résistance de la coquille lors des stades précoces de calcification (Liu *et al*, 2013). Les échantillons d'utérus ont été recueillis à 9 heures après l'ovulation, ce qui correspond à la fin de la phase d'initiation de la minéralisation. Cette étude était limitée à 4 animaux divisés en 2 groupes (poules dont les œufs présentent une coquille à forte ou à faible résistance à la rupture). Au total, 941 gènes sont différentiellement exprimés, 407 étant surexprimés dans l'utérus des poules produisant des œufs à coquille fortement résistante et 534 sous-exprimés (Liu *et al*, 2013). Parmi ces 941 gènes, 88 codent pour des protéines impliquées dans la transduction de signal, 77 pour des protéines de transport des ions ou extracellulaires de la matrice organique et 26 pour des protéines impliquées dans le métabolisme des carbohydrates ou réalisant des modifications post-traductionnelles.

4.2 <u>Caractérisation des protéines identifiées dans la matrice</u> organique de la coquille d'œuf de poule

La fonction des protéines identifiées grâce à ces approches classiques et à haut-débit a été étudiée et déterminée pour un certain nombre d'entre elles. Ces protéines peuvent être regroupées en trois catégories fonctionnelles, présentées ci-dessous.

4.2.1 <u>Protéines intervenant dans la minéralisation</u>

Ce groupe correspond aux protéines pour lesquelles un rôle avéré ou potentiel dans le processus de minéralisation a été montré.

4.2.1.1 Protéines modifiant la morphologie des cristaux de calcite

L'ovalbumine, la protéine majeure du blanc, est également trouvée dans la coquille. Par sa faculté à lier un grand nombre de cations di ou trivalents (dont le calcium), elle jouerait un rôle de transport ou de stockage des ions et pourrait avoir un rôle dans l'initiation de la calcification (Hincke, 1995). En effet, elle peut être qualifiée d'éponge à calcium et ainsi devenir le point de départ de la minéralisation (Schwahn *et al*, 2004, Pipich *et al*, 2008). La minéralisation du carbonate de calcium a été étudiée *in vitro* en présence d'ovalbumine. Celle-ci modifie la morphologie des cristaux de calcite (Figure 9 a) (Hernandez-Hernandez *et al*, 2008a, Wang *et al*, 2010). La première forme de carbonate de calcium obtenue est du carbonate de calcium amorphe que l'ovalbumine stabilise (Wang *et al*, 2009b, Wang *et al*, 2010), avant sa transformation en polymorphe cristallin stable (Pipich *et al*, 2008).



a. ovalbumine (Hernandez-Hernandez *et al*, 2008a)



b. ovotransferrine (Hernandez-Hernandez *et al*, 2008a)



c. lysozyme (Hincke *et al*, 2000)



d. ostéopontine (Chien *et al*, 2008)



e. ovocléidine-17 (Reyes-Grajeda *et al*, 2004)

Figure 9 : Photographies en microscope électronique à balayage des cristaux de carbonate de calcium obtenus *in vitro* en présence de différentes protéines de la coquille d'œuf de poule

L'ovotransferrine, une autre protéine du blanc, est également identifiée dans la coquille. *In vitro*, elle modifie la morphologie des cristaux de calcite et diminue leur taille à une concentration supérieure à 100 μ g/mL (Figure 9 b) (Gautron *et al*, 2001b, Hernandez-Hernandez *et al*, 2008a).

Le lysozyme, mis en évidence à la fois dans le blanc et la coquille, a différents effets sur la cristallisation du carbonate de calcium. Le nombre de cristaux et la période de latence pour les obtenir sont augmentés, leur taille est diminuée et leurs morphologies modifiées (Figure 9 c) (Hincke *et al*, 2000). La faculté du lysozyme à stabiliser le carbonate de calcium amorphe au cours de la minéralisation est controversée. En effet, des particules de carbonate de calcium amorphe ont été observées *in vitro* par certains auteurs en présence de lysozyme (Voinescu *et al*, 2007, Wang *et al*, 2009b) alors que Wolf et collaborateurs n'observent aucun effet du lysozyme sur cette forme transitoire (Wolf *et al*, 2011).

In vitro, il a été démontré que **l'ostéopontine** inhibe la croissance cristalline et modifie la morphologie des cristaux de calcite (Figure 9 d) (Chien *et al*, 2008). L'implication de cette protéine dans le processus de minéralisation peut être corroborée par l'expression de son gène. Cette expression est limitée à l'utérus au niveau de l'oviducte et uniquement détectée lorsqu'un œuf est présent dans l'utérus. Elle semble être contrôlée mécaniquement, notamment par la dilatation de l'utérus induite par le passage de l'œuf et les mouvements de l'oviducte qui l'accompagnent (Pines *et al*, 1995, Lavelin *et al*, 1998). De plus, l'ostéopontine doit être phosphorylée pour être active. Trois sites potentiels de phosphorylation, les sérines 12, 14 et 15, ont été localisés (Hincke and St. Maurice, 1998).

L'ovocléidine-17 a pour caractéristique principale de posséder un domaine lectine de type C. En sa présence, la morphologie des cristaux de calcite est modifiée, ce qui tendrait à prouver son implication dans le processus de minéralisation (Figure 9 e) (Reyes-Grajeda *et al*, 2004). De plus, des simulations moléculaires et des études de modélisation permettent de supposer que l'ovocléidine-17 lie le carbonate de calcium amorphe selon trois configurations possibles de liaison entre la protéine et le minéral (Freeman *et al*, 2010, Freeman *et al*, 2011). Cette fixation conduirait à la transformation du carbonate de calcium amorphe en calcite, le polymorphe cristallin présent dans la coquille. L'ovocléidine-17 ne jouerait donc pas un rôle direct dans la biominéralisation mais en serait un catalyseur (Freeman *et al*, 2010, Freeman *et al*, 2011). Différentes protéines possédant un domaine lectine de type C ont également été identifiées chez d'autres espèces aviaires : l'ansocalcine chez l'oie (Lakshminarayanan *et al*, 2003), les struthiocalcines 1 et 2 chez l'autruche (Mann and Siedler, 2004), les dromaiocalcines 1 et 2 chez l'émeu et les rhéacalcines 1 et 2 chez le nandou (Mann and Siedler, 2006). Chez l'oie, **l'ansocalcine** présente un taux de similarité important avec l'ovocléidine-17. Des répétitions d'acides aminés acides (Glx ou Asx) dans sa

séquence lui permettraient également de lier le carbonate de calcium (Lakshminarayanan et al, 2002). Comme l'ovoclédine-17, des études in vitro ont montré qu'elle modifie la morphologie des cristaux de carbonate de calcium de façon dose-dépendante (Lakshminarayanan et al, 2002, Lakshminarayanan et al, 2003). Les deux protéines présentent cependant certaines caractéristiques dissemblables, à l'origine d'hypothèses sur leurs fonctions dans le processus de minéralisation (Lakshminarayanan et al, 2005). L'ansocalsine est plus intimement liée à la phase minérale et modifie davantage la morphologie des cristaux que l'ovocléidine-17. L'ansocalsine peut également être trouvée sous une forme agrégée alors que l'ovocléidine-17 reste sous forme monomérique. Malgré la similarité de séquence entre les deux protéines, ni leurs structures tridimensionnelles ni leur répartition des charges en surface ne sont identiques. Pour l'ansocalcine, la répartition apparaît polarisée avec une face chargée négativement et l'autre positivement alors que la répartition apparaît plus homogène pour l'ovoclédine-17, avec la présence d'une majorité d'acides aminés chargés positivement en surface de la protéine. Suite à ces observations, les auteurs suggèrent que l'ansocalcine serait une protéine de structure de la matrice organique qui induirait l'agrégation des cristaux et stabiliserait les cristaux nouvellement formés alors que l'ovocléidine-17 n'aurait pas de rôle dans l'agrégation des cristaux (Lakshminarayanan et al, 2005).

4.2.1.2 Protéines liant le calcium

La liaison au calcium est une propriété importante pour la minéralisation puisque les protéines liant le calcium pourraient favoriser la nucléation ou modifier la morphologie des cristaux de carbonate de calcium par interactions spécifiques avec certaines faces cristallines. Différentes protéines de liaison au calcium ont été identifiées lors des études à haut débit (Tableau 3).

Deux protéines appartenant à la famille des protéines S100, **la calcycline** (ou S100A6) et **le sentan**, comportent deux domaines de liaison au calcium de type EF-hand (Mann *et al*, 2006). La famille des protéines S100 regroupe une vingtaine de membres (24 chez l'homme) qui présente une structure commune et deux domaines de liaison au calcium de type EF-hand. Les membres de cette famille régulent différentes fonctions cellulaires (cycle cellulaire, différentiation, survie et migration cellulaires, homéostasie du calcium intracellulaire) en interagissant avec d'autres protéines cibles d'une façon dépendante du calcium (Heizmann *et al*, 2002, Hermann *et al*, 2012). Certains membres peuvent également être sécrétés et exercent alors des fonctions proches de celles des cytokines (activités chimiotactiques et neurotrophiques) (Heizmann *et al*, 2002). Le sentan est connu pour lier les microtubules du

cytosquelette à la membrane plasmique dans les structures ciliées des épithéliums respiratoires et ovariens (Kubo *et al*, 2008). Une troisième protéine, **la nucléobindine-2**, contient également deux domaines EF-hand. Elle est retrouvée dans cinq des études protéomiques portant sur la coquille (Mann *et al*, 2006, Mann *et al*, 2007a, Miksik *et al*, 2010, Rose-Martel *et al*, 2012, Sun *et al*, 2013) et le transcrit correspondant est exprimé par l'utérus lors de la minéralisation de la coquille (Jonchere *et al*, 2010, Brionne *et al*, 2014). Deux autres protéines, **MFGE8** et **EDIL3**, qui contiennent respectivement 2 et 3 domaines de liaison au calcium de type EGF-like, ont également été identifiées (Mann *et al*, 2006, Miksik *et al*, 2010, Sun *et al*, 2013). Comme pour la nucléobindine-2, les transcrits codant ces deux protéines sont exprimés par l'utérus au cours de la calcification de la coquille (Jonchere *et al*, 2014).

Tableau 3 : Protéines de la matrice organique de la coquille d'œuf de poule liant le calcium identifiées par les méthodes à haut-débit

(Mann et al, 2006, Jonchere et al, 2010, Sun et al, 2013, Brionne et al, 2014)

Nom de la protéine	Caractéristiques	
calcycline	Domaines EF-hand	
FK506 binding protein 9		
follistatin related protein 1		
MCDF2		
nucléobindine-2		
SPARCL1		
sentan		
CRELD2		
EDIL3		
MATN2		
MFGE8	Domaines EGF-like	
Protein C		
SLIT2		
SLIT3		
calbindine		
calnexine		
calmyrine		
calsyntenine-3		
DMP4/FAM20C	Autres protéines liant le calcium	
endoplasmine/HSP90B1		
mannose binding C		
neuronal pentraxine 2]	
réticulobindine-2		

4.2.1.3 Protéines associées aux protéoglycanes

Les protéoglycanes, du fait de leur charge nette négative, sont connus pour être des acteurs majeurs de la biominéralisation (Carrino *et al*, 1996, Carrino *et al*, 1997, Fernandez *et al*, 2001). Ils sont constitués d'un glycosaminoglycane et d'une partie protéique.

L'ovocléidine-116 correspond au cœur protéique d'un protéoglycane (dermatane sulfate) également identifié dans la coquille, l'ovoglycane (Carrino *et al*, 1996, Carrino *et al*, 1997, Hincke *et al*, 1999, Arias and Fernandez, 2001, Fernandez *et al*, 2001). Elle est principalement retrouvée au niveau des noyaux mamillaires et de la couche palissadique. Du fait de la charge négative des protéoglycanes, cette protéine interviendrait dans la biominéralisation de la coquille par sa capacité à attirer les ions divalents et notamment le calcium (Hincke *et al*, 1999).

Les glypican-1 et 4 et le tsukushi sont également identifiés par des études à haut-débit (Mann *et al*, 2006, Miksik *et al*, 2010, Sun *et al*, 2013, Brionne *et al*, 2014). Les glypican-1 et 4 correspondent à des cœurs protéiques d'héparanes sulfates (Filmus *et al*, 2008) et le tsukushi appartient à la famille des small leucin rich proteoglycan (Dellett *et al*, 2012). Les transcrits du glypican-4 et du tsukushi sont également exprimés par l'utérus lorsqu'une coquille est en cours de formation (Brionne *et al*, 2014).

4.2.1.4 Anhydrases carboniques

Deux types d'anhydrases carboniques, **les anhydrases carboniques 2** et **4**, ont pu être mis en évidence dans la matrice organique de la coquille ou le fluide utérin (Mann *et al*, 2006, Sun *et al*, 2013). Ces protéines participent à la minéralisation en fournissant les ions hydrogénocarbonate HCO_3^- nécessaires à la formation du carbonate de calcium par l'hydratation du CO_2 . Ces deux enzymes interviennent dans les échanges ioniques entre le plasma sanguin et le fluide utérin ayant lieu lors de la minéralisation de la coquille (Jonchere *et al*, 2010, Brionne *et al*, 2014).

4.2.1.5 Protéines identifiées par des approches génomiques

Une corrélation a pu être établie entre des polymorphismes simples du gène de **l'ovocalyxine-32** et deux mesures phénotypiques réalisées sur la coquille, épaisseur de la couche mamillaire et orientation des cristaux (Dunn *et al*, 2009a, Dunn *et al*, 2012). Le gène de l'ovocalyxine-32 est également présent dans un QTL affectant différents paramètres morphologiques de l'œuf (petite et grande longueur de l'œuf) (Takahashi *et al*, 2009).

4.2.2 Protéines potentiellement régulatrices du processus de minéralisation

Le processus de minéralisation de la coquille d'œuf de poule est spatio-temporel et se produit dans un milieu acellulaire. L'activité des protéines intervenant dans la minéralisation est ainsi régulée par des interactions avec d'autres protéines sécrétées *in situ* dans le milieu pouvant activer ou inhiber ces protéines. Les protéines régulatrices ont été caractérisées dans la matrice organique de la coquille d'œuf de poule et classées en différentes catégories.

4.2.2.1 Protéines chaperonnes

La première catégorie représente les protéines chaperonnes qui participent au repliement des protéines. Les protéines de la matrice organique seront ainsi dans la configuration adéquate pour intervenir dans le processus de minéralisation. De plus les chaperons moléculaires, en se fixant ou se liant aux autres protéines, vont moduler l'activité de celles-ci.

La clusterine empêcherait l'agrégation des protéines au cours du processus de minéralisation (Mann *et al*, 2003). En effet, elle se lie aux protéines ayant subi un stress et inhibe leur précipitation. Elle n'empêche pas la perte de fonction des enzymes mais les maintient dans un état permettant un réarrangement ultérieur par d'autres protéines chaperonnes et le retour de l'activité enzymatique (Humphreys *et al*, 1999, Poon *et al*, 2000).

L'ovocalyxine-21 est une protéine identifiée dans la matrice organique possédant un domaine BRICHOS. Les protéines contenant ce domaine présenteraient une fonction chaperonne (Gautron and Nys, 2007a).

D'autres acteurs intervenant dans le repliement des protéines, la calnexine, DNAJB9, ERLEC1, FICD, FK 506 binding protein 9, GRIP2, HSPA5, HSPA13, HSP90B1/endoplasmine et HYOU1, ont pu être mis en évidence lors des études à haut débit (Mann *et al*, 2006, Jonchere *et al*, 2010, Sun *et al*, 2013, Brionne *et al*, 2014). Trois membres de la famille des cyclophilines, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, B et C, ont également été identifiés dans la matrice organique de la coquille et/ou le fluide utérin (Mann *et al*, 2006, Sun *et al*, 2013). Ces protéines catalysent l'isomérisation cis-trans de la liaison entre un acide aminé et une proline et peuvent être considérées comme des protéines chaperonnes (Fischer and Bang, 1985, Schmid, 1993).

4.2.2.2 Protéases et inhibiteurs de protéases

La deuxième catégorie est l'ensemble des protéases et anti-protéases identifiées dans la coquille. Les protéases peuvent agir sur la minéralisation soit en dégradant des protéines

actives dans la minéralisation soit en produisant des peptides actifs à partir de protéines inactives. Les inhibiteurs de protéases peuvent moduler l'action des protéases.

Différentes protéases telles que des membres de la famille des cathepsines (**cathepsines** A, B, D, K ou L1), GLIPR1, la β sécrétase 2 et la Protein C ont pu être identifiées lors des analyses à haut débit (Mann *et al*, 2006, Jonchere *et al*, 2010, Sun *et al*, 2013, Brionne *et al*, 2014).

Des inhibiteurs de protéases sont également retrouvés dans la coquille lors de ces mêmes analyses (Tableau 4). Ils contiennent des domaines connus pour leur activité inhibitrice, tels que les domaines de type Kazal ou Kunitz. Ces derniers sont deux domaines de longueur différente (le domaine de type Kazal est plus long que le domaine Kunitz) possédant dans leur séquence 6 cystéines qui forment des ponts disulfures et donnent leur structure aux domaines (Rehault-Godbert *et al*, 2011). Le domaine de type Kazal est ainsi retrouvé chez **l'ovoinhibiteur** et **l'ovomucoïde**, deux protéines majeures du blanc également présentes dans la coquille (Rehault-Godbert *et al*, 2011) et la follistatin related protein 1. **L'ovocalyxine-25** possède deux domaines inhibiteurs : un domaine Kunitz et un domaine WAP (Gautron and Nys, 2007a). **L'ovocalyxine-32**, qui présente une homologie avec la latexine est aussi présente dans la coquille et inhibe les carboxypeptidases (Xing *et al*, 2007).

Tableau 4 : Inhibiteurs de protéases retrouvés dans les études à haut-débit(Mann et al, 2006, Jonchere et al, 2010, Sun et al, 2013, Brionne et al, 2014)

Nom de la protéine	Caractéristiques	
ovocalyxine-25	1 domaine WAP et 1 domaine Kunitz-like	
ovocalyxine-32	inhibiteur de caboxypeptidase	
TIMP2	inhibiteur de metalloproteases	
Alpha-2-antiplasmin / SERPINF2	familla dag SEDDIN	
Heparin cofactor 2 / SERPIND1	Idilline des SERFIN	
amyloid β A4	domaines Kunitz-like	
β amyloid protein 751 isoform		
tissue pathway inhibitor 2		
follistatin related protein 1		
ovomucoïde	domaines Kazal-like	
ovoinhibiteur		
BMP binding endothelial regulator	1 domaine trypsin inhibitory like	
protein		

4.2.3 <u>Protéines potentiellement antimicrobiennes</u>

A côté de ces protéines directement ou indirectement impliquées dans le processus de minéralisation, diverses molécules antimicrobiennes sont retrouvées dans la coquille (Gautron and Nys, 2007b, Guerin-Dubiard *et al*, 2010, Gautron *et al*, 2011a). Elles permettent le maintien de la stérilité de l'œuf. Les protéines antimicrobiennes de la coquille ont été classées en différentes catégories, comme proposé par Réhault-Godbert et collaborateurs pour l'ensemble des protéines antimicrobiennes présentes dans l'œuf (Rehault-Godbert *et al*, 2011). Les informations mentionnées ci-après proviennent de ces revues. Les références supplémentaires correspondent à des informations spécifiques issues d'autres publications.

4.2.3.1 Protéines dégradant les composés microbiens

Différentes protéines sont connues pour fixer et dégrader certains composés des bactéries, comme des éléments de la paroi bactérienne. Cette dégradation peut conduire à la lyse des bactéries.

Le lysozyme fait partie de la famille des N-acétyl-muramidases. En plus de son rôle dans la minéralisation (4.2.1.1), il est principalement connu pour son activité hydrolytique des peptidoglycanes de la paroi cellulaire des bactéries Gram positives. De même, il pourrait lutter contre les bactéries Gram négatives, par un deuxième mécanisme.

Les β -défensines sont des peptides de 1 à 10 kDa présentant une structure en feuillet β composé de trois brins. Au niveau de leur séquence, six cystéines sont conservées au sein d'un motif consensus et forment des ponts disulfures. La structure tridimensionnelle expose des séquences riches en acides aminés cationiques qui se lient à certains composants bactériens chargés négativement. L'accumulation des peptides induit la formation de multimères qui vont eux-mêmes former des pores dans les parois bactériennes, conduisant à la lyse de la bactérie. Chez la poule, deux β -défensines ont été identifiées au niveau de la coquille, la β -défensine 10 et la β -défensine 11, une autre est exprimée par l'utérus, la β -défensine 9.

L'ovocalyxine-36 fait partie de la superfamille des BPI (Bactericidal Permeability-Increasing proteins) / LBP (Lipopolysaccharide Binding Protein) / PLUNC (Palate, LUng and Nasal epithelium Clone). Le gène de l'ovocalyxine-36 est intégré dans un cluster de gènes de la superfamille BPI/LBP/PLUNC et son organisation interne (succession des introns et des exons) est similaire à celle des gènes des LBP et BPI (Gautron *et al*, 2007a, Gautron *et al*, 2011b). De même que les protéines de cette superfamille, l'ovocalyxine-36 lie le lipide A du LPS (LipoPolySaccharide), présent en surface des bactéries Gram négatives, et induit une réponse immunitaire. De plus, l'ovocalyxine-36 limite la croissance bactérienne de *Staphylococcus aureus* (Cordeiro *et al*, 2013). Deux autres membres de cette même famille, les protéines **TENP** et **BPIL2**, ont pu être identifiés dans la coquille lors d'études à haut débit (Mann *et al*, 2006, Sun *et al*, 2013).

Différents membres des familles des histones H2A et H4, protéines de structure des chromosomes chez les eucaryotes, ont été mis en évidence par des analyses à haut débit (Mann *et al*, 2006, Sun *et al*, 2013). Les histones H2A présentent une activité antimicrobienne contre des bactéries à la fois Gram positives (*Bacillus subtilis*) et Gram négatives (*Escherichia coli* D31) (Li *et al*, 2007). Les histones H4 limitent la croissance de *Staphylococcus aureus* (Morita *et al*, 2013). Elles lient l'acide lipotéichoïque qui est un des constituants majeurs des parois des bactéries Gram positives. Cette liaison induirait une désorganisation des parois et une lyse des bactéries (Morita *et al*, 2013).

4.2.3.2 Protéines avec un domaine lectine de type C

En plus de son rôle dans la minéralisation (4.2.1.1), **l'ovocléidine-17** a un rôle antibactérien démontré puisqu'elle limite à la fois la croissance de *Bacillus subtilis*, de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomona aeruginosa* (Wellman-Labadie *et al*, 2008). Son domaine lectine de type C interviendrait dans sa liaison aux polysaccharides des membranes bactériennes. De même, **l'ansocalcine** limite également la croissance des bactéries (Wellman-Labadie *et al*, 2008). Un même rôle antimicrobien est supposé pour les différentes autres protéines possédant un domaine lectine de type C identifié dans la coquille telles que **la mannose binding protein C**, **le collagène XVIII** ou **DEC-205** (Mann *et al*, 2006, Jonchere *et al*, 2010).

4.2.3.3 Protéines inhibitrices de protéases

En plus de leur rôle dans la régulation de la fonction des protéines impliquées dans la minéralisation (4.2.2.2), les inhibiteurs de protéases peuvent avoir une activité antibactérienne par leur capacité à dégrader les protéases sécrétées par les bactéries. Ces protéases ont pour rôle, soit de détruire les molécules de l'immunité fabriquées par l'organisme, soit d'attaquer les tissus cibles et ainsi affaiblir leurs défenses pour permettre aux bactéries d'être plus virulentes. Certains inhibiteurs de protéases ont un rôle antibactérien démontré. Ainsi, **l'ovoinhibiteur** peut limiter la croissance de *Bacillus thuringiensis* (Bourin *et al*, 2011) et **l'ovocalyxine-32** celle de *Bacillus subtilis* (Xing *et al*, 2007). Un même rôle antibactérien peut être supposé pour les autres protéines de la coquille présentant une activité inhibitrice de protéases tels que l'ovomucoïde ou l'ovocalyxine-25.

4.2.3.4 Protéines stockant des nutriments essentiels

La diminution de la disponibilité en éléments essentiels, tels que le fer ou les vitamines, peut être un moyen de limiter la croissance des bactéries. Dans ce groupe, **l'ovotransferrine** a un rôle antibactérien en stockant le fer (Gautron *et al*, 2001b). **L'avidine**, **la riboflavin binding protein**, **la retinol binding protein 4** et **la vitamin D binding protein**, des protéines de liaison aux vitamines (Rehault-Godbert *et al*, 2011), ont également été identifiées dans la coquille et le fluide utérin (Mann *et al*, 2006, Sun *et al*, 2013).

4.2.3.5 Autres mécanismes

L'Ovalbumin related protein X (OVAX) fait partie de la famille des SERPIN, mais présente un domaine non fonctionnel. Cette protéine possède toutefois des activités anti-*Listeria monocytogenes* et anti-*Salmonella enterica* sv. Enteritidis, dont elle limite la croissance, grâce à son domaine de liaison à l'héparine (Rehault-Godbert *et al*, 2013).

4.3 <u>Caractérisation des protéines identifiées dans les matrices</u> organiques d'invertébrés biominéralisants

De nombreuses analyses protéomiques et transcriptomiques ont permis d'étudier la composition des matrices organiques associées aux biominéraux chez un certain nombre d'invertébrés biominéralisants, tant chez les mollusques (Bedouet *et al*, 2007b, Joubert *et al*, 2010, Marie *et al*, 2010a, Kinoshita *et al*, 2011, Marie *et al*, 2011a, Marie *et al*, 2011b, Marie *et al*, 2011c, Marie *et al*, 2012) que chez les coraux (Drake *et al*, 2013, Ramos-Silva *et al*, 2013) ou les oursins (Mann *et al*, 2010). Différentes protéines ont également été isolées et leurs fonctions ont pu être caractérisées. Certaines de ces fonctions, présentées ci-dessous, présentent une similarité avec celles identifiées chez la poule et ont retenu notre attention.

4.3.1 Protéines modifiant les cristaux de carbonate de calcium

La caspartine, identifiée chez *Pinna nobilis*, est une protéine de 17 kDa. Lorsque la protéine est ajoutée au milieu de cristallisation *in vitro*, une inhibition de la précipitation du carbonate de calcium et des modifications morphologiques des cristaux de calcite sont constatées (Marin *et al*, 2005).

La perlinhibine a été identifiée chez l'ormeau, *Haliotis laevigata*. Cette protéine est riche en cystéine (19,5%), en histidine (17%) et en arginine (14,6%). *In vitro*, des modifications morphologiques des cristaux de calcite apparaissent en présence de la protéine.

Différents creux et marches apparaissent sur les cristaux, suggérant que la perlinhibine inhibe la croissance des cristaux aux endroits où elle s'est fixée (Mann *et al*, 2007b).

La prisilkine-39 a été identifiée dans la fraction insoluble à l'EDTA de la matrice de l'huître perlière *Pinctada fucata* (Kong *et al*, 2009). Elle présente une structure modulaire constituée d'un domaine N-ter hydrophobe riche en alanine, de deux régions répétées, GYS I et GYS II et d'un domaine C-ter basique avec 4 Histidines et 1 Lysine. La région GYS I est constituée de douze répétitions quasi-identiques d'un même motif (les répétitions présentent un haut degré de similarité entre elles). La région GYS II possède des dipeptides Gly-Tyr, Tyr-Tyr, Gly-Ser et Tyr-Ser. Lorsqu'un test de cristallisation *in vitro* est réalisé en présence de cette protéine, des modifications morphologiques des cristaux de calcite sont constatées. Kong et collaborateurs suggèrent que ce sont les domaines GYS II et C-terminal qui seraient impliqués dans la liaison à certaines faces spécifiques des cristaux. De même, lorsque la fonction de la protéine est inhibée par l'injection d'anticorps dans l'espace extrapalléal, la structure de la couche nacrée apparaît désordonnée et des cristaux s'accumulent de façon aléatoire sur ceux déjà formés (Kong *et al*, 2009).

Pinctada Fucata Mantle Gene 1 (PFMG1), identifiée chez *Pinctada fucata*, possède 2 domaines EF-hand de liaison au calcium. *In vitro*, la protéine de fusion GST-PFMG1 induit une modification morphologique des cristaux de carbonate de calcium qui présentent une morphologie rhombique au lieu d'une morphologie cubique en condition contrôle (Liu *et al*, 2007).

MSI-7, identifiée chez *Pinctada fucata*, est une protéine de 7 kDa qui présente 3 domaines différents le long de sa séquence (un domaine hydrophile en N-terminal, un domaine riche en glycine et un domaine hydrophobe en C-terminal). *In vitro*, l'ajout de la protéine fusion GST-MSI-7 induit une modification de la morphologie de cristaux de carbonate de calcium avec des cristaux à bases hexagonales au lieu des cristaux rhombiques obtenus en condition contrôle. Un modèle est proposé par Zhang et collaborateurs pour expliquer ces modifications. Les protéines MSI-7 forment une couche, en étant reliées par leur domaine C-terminal, alors que les domaines N-terminaux vont lier les ions Ca²⁺ et ainsi agir sur la cristallisation du carbonate de calcium (Zhang *et al*, 2003).

La perlucine est une protéine possédant un domaine lectine de type C (analogue à l'OC-17 de la coquille d'œuf de poule) identifiée chez deux espèces du genre Haliotis, *Haliotis laevigata* (Mann *et al*, 2000) et *Haliotis dicus dicus* (Wang *et al*, 2008). Lorsque la protéine de fusion MBP (maltose binding protein)-perlucine est ajoutée *in vitro*, la morphologie des cristaux de calcite est modifiée. Leur forme à base hexagonale diffère de leur forme rhomboédrique normale (Wang *et al*, 2008). De plus, la présence de la perlucine accentue la baisse de pH consécutive à la précipitation du carbonate de calcium, ce qui suggère que la protéine accélérerait cette précipitation (Weiss *et al*, 2000, Wang *et al*, 2008). Un rôle antimicrobien est également évoqué (Blank *et al*, 2003, Wang *et al*, 2008).

L'aspeine, identifiée chez *Pinctada fucata*, est la protéine la plus acide connue à ce jour (point isoélectrique théorique de 1,67). Les résidus acide aspartique représentent 60% des 413 acides aminés formant cette protéine. L'aspeine est composée de trois parties : un domaine Nterminal, un domaine DA et un domaine poly-D. Deux constructions GST-Aspein-DD comprenant les domaines N-terminal et DA et GST-Aspein-D1 comprenant les domaines Nterminal et DA et le début du domaine poly-D sont réalisées afin de déterminer la fonction de chacun de ces domaines. Les deux constructions peuvent lier le calcium au contraire de la protéine GST seule. Un test de cristallisation du carbonate de calcium in vitro réalisé en présence de 50 mM de magnésium permet d'obtenir, en condition contrôle, de l'aragonite sous forme d'aiguilles et quelques cristaux de calcite polyèdre. En présence d'une faible concentration de la protéine recombinante GST-Aspein-D1, des modifications morphologiques sont constatées avec des cristaux d'aragonite de morphologie sphérique. A plus forte concentration, des modifications polymorphiques sont observées en plus des changements morphologiques et seule de la calcite, présentant une structure en haltère ou en fleur, est obtenue au lieu de l'aragonite (Tsukamoto et al, 2004, Takeuchi et al, 2008).

Les protéines AP7 et AP24 (Aragonite Protein of molecular weight 7kDa et 24kDa), mises en évidence chez l'ormeau *Haliotis rufences*, sont légèrement acides (pI de 5,17 et de 5,3 respectivement). Elles présentent une alternance hydrophobie/hydrophilie. La protéine AP24 semble glycosylée post-traductionnellement. Les fonctions de ces protéines ont été analysées par un test de croissance cristalline sur un échantillon de calcite géologique placé dans une solution de CaCl₂ et de NH₄HCO₃. En absence de protéine, la calcite vient se former de manière continue en surface de la précédente. Lors de l'ajout de peptides de synthèse correspondant aux 30 premiers acides aminés des protéines AP7 et AP24, cette croissance est modifiée avec l'apparition d'une structure en marches. Michenfelder et collaborateurs suggèrent que ces deux protéines agiraient en synergie pour inhiber la formation du cristal (Michenfelder *et al*, 2003).

La nacréine a été identifiée chez *Pinctada fucata*. Elle lie le calcium et Miyamoto et collaborateurs suggèrent que cette liaison se ferait par son domaine acide (Miyamoto *et al*, 1996). L'introduction dans les cellules du manteau de RNAi limitant l'expression de la nacréine conduit à des perturbations dans l'organisation de la couche nacrée (Fang *et al*,

2011). Lorsque des anticorps anti-nacréine sont ajoutés dans l'espace extrapalléal, les tablettes d'aragonite sont recouvertes de nanocristaux. Ce résultat tend à indiquer que la nacréine inhibe la croissance cristalline (Gong *et al*, 2008).

Les protéines Pif 80 et Pif 97 ont été identifiées lors d'une recherche de protéines pouvant se lier aux cristaux de carbonate de calcium, aragonite ou calcite (Suzuki et al, 2009). Ces deux protéines sont codées par le même gène Pif. La protéine précurseur unique obtenue par l'expression du gène Pif est maturée par clivage, celui-ci permettant l'obtention des deux protéines Pif 80 et Pif 97. Le site de clivage, composé des quatre acides aminés RMKR, est reconnu par les protéases de type Kex-2. Pif 80 est riche en acides aminés chargés et présente 17 répétitions d'un motif à quatre acides aminés Asp – Asp – Arg (ou Lys) – Lys (ou Arg) et une séquence riche en acides aminés acides en son centre (Asp₂ – Glu – Asp₇). Pif 97 présente deux domaines von Willebrand de type A (domaine connu pour être impliqué dans des interactions protéines/protéines) et un domaine de liaison à la chitine similaire à celui de la péritrophine A. Une injection d'ARN interférents conduit à une diminution de l'expression du gène et à une croissance anarchique et très diminuée de la couche nacrée. Suzuki et collaborateurs proposent un modèle fonctionnel où Pif 80 et 97 sont associées au sein d'un complexe protéique. Dans celui-ci, ils suggèrent que Pif 97 lie la chitine alors que Pif 80 attire le carbonate de calcium et intervient dans la formation des cristaux d'aragonite, ainsi que dans le contrôle de leur orientation (Suzuki et al, 2009).

Une famille de protéines riches en lysine (Lysine (K), Rich Matrix Proteins, KRMP) a été mise en évidence dans la matrice organique de l'huître perlière *Pinctada fucata*. Elle comporte trois membres : **KRMP 1 à 3**, d'une taille comprise entre 98 et 101 acides aminés. KRMP 1 et 2 sont identiques à l'exception d'un seul acide aminé. KRMP 3 présente plus de 80% d'identité de séquence avec les deux autres. Les protéines sont riches en lysine, glycine et tyrosine et sont basiques (pI entre 9,5 et 9,8). Leur structure primaire peut être divisée en trois régions : un peptide signal en N-terminal, une région basique riche en lysine et un C-terminal riche en Gly et en Tyr. Leur expression est limitée à la partie distale du manteau et l'introduction de RNAi spécifiques de ces gènes dans les cellules du manteau conduit à des perturbations dans l'organisation de la couche prismatique (Fang *et al*, 2011). Zhang et collaborateurs proposent que ces protéines jouent un rôle de liaison entre les protéines de structure de la coquille et les protéines impliquées dans la formation du cristal (Zhang *et al*, 2006).

4.3.2 Protéines liant le calcium

Différentes protéines identifiées chez les invertébrés possèdent un domaine de liaison au calcium (EFG-like ou EF-hand) et pourraient participer au processus de minéralisation en liant le calcium présent dans la phase minérale et en intervenant sur la morphologie des cristaux (Tableau 5). Cette hypothèse est confortée par des observations expérimentales ou des suggestions obtenues pour 2 de ces protéines. L'expression d'**EFCBP (EF-hand Calcium Binding Protein)** est augmentée très rapidement lorsqu'une entaille est faite dans la coquille. Par ailleurs, Li et collaborateurs (Li *et al*, 2004) émettent l'hypothèse que **la calmoduline** régule le transport d'ions Ca²⁺ vers le manteau par les Ca²⁺ATPases et la sécrétion des ions Ca²⁺ nécessaires à la formation de la coquille.

Tableau 5 : Protéines identifiées chez les invertébrés présentant des domaines EF-hand ou EGF-like

Espèce	Nom de la protéine	Caractéristiques	Références
	EFCBP (EF-hand Calcium Binding Protein)	2 domaines EF-hand	(Huang et al, 2007)
Pinctada fucata	calmoduline	4 domaines EF-hand	(Li et al, 2004, Li et al,
(mollusque bivalve)	calmodulin-like	4 domaines EF-hand	2005)
	gènes 000262, 000390, 000493, 000594, 002138	des domaines EF-hand	(Kinoshita et al, 2011)
<i>Pinctada margaritifera</i> (mollusque bivalve)	calconectine	2 domaines EF-hand	(Duplat <i>et al</i> , 2006)
Venerupis Philippinarum (mollusque bivalve)	IMSP5 (Insoluble Matrix Shell Protein 5)	2 domaines EF-hand	(Marie <i>et al</i> , 2011b)
<i>Hyriopsis schlegelii</i> (mollusque bivalve)	calmoduline	4 domaines EF-hand	(Zeng et al, 2012)
<i>Crassostrea gigas</i> (mollusque bivalve)	IMSP-2 (Insoluble Matrix Shell Protein-2)	2 domaines EGF-like	(Marie <i>et al</i> , 2011c)

Parmi les protéines identifiées chez des invertébrés fabriquant leur coquille selon un processus de biominéralisation carbonaté, des protéines liant le calcium sans présenter de domaine spécifique de liaison au calcium sont également identifiées (Tableau 6).

Espèce	Nom de la protéine	Caractéristiques	Références
	perline =N16-1 à 3	lient le calcium par les groupes sulfatés portés par les sucres (hypothèse)	(Samata <i>et al</i> , 1999, Miyashita <i>et al</i> , 2000)
Pinctada fucata (mollusque bivalve)	aspeine	lie le calcium par ses domaines riches en acides aspartiques (hypothèse)	(Tsukamoto <i>et al</i> , 2004, Takeuchi <i>et al</i> , 2008)
	MSI-31	lie le calcium par les motifs ESEEDX présents dans la région acide C- terminale (hypothèse)	(Sudo <i>et al</i> , 1997)
	MSI-60	lie le calcium par ses blocs poly aspartiques (hypothèse)	
Pinctada maxima (mollusque bivalve)	N14	homologue de la perline	(Kono et al, 2000)
Pinctada	homologue de N14		
margaritifera	homologue de MSI-31		(Bedouet <i>et al</i> , 2007b)
(mollusque bivalve)	homologue de MSI-60		
<i>Mytilus edulis</i> (mollusque bivalve)	EP (Extra Palleal) protein	lie le calcium	(Hattan <i>et al</i> , 2001)
Mytilus californianus (mollusque bivalve)	ho	mologue de MSI-60	(Marie <i>et al</i> , 2011a)
Patinopecten yessioensis (mollusque bivalve)	MSP-1/ MSP-2 (Matrix Shell Protein)	lient le calcium par leur domaine appelé D riche en acide aspartique (hypothèse)	(Sarashina and Endo, 2001, Hasegawa and Uchiyama, 2005)
Haliotis rufescens (mollusque gastéropode)	lustrine A	lie le calcium par son domaine "GS", situé en partie C-terminale de la protéine	(Shen <i>et al</i> , 1997, Wustman <i>et al</i> , 2003)
Penaeus japonicus (crustacé décapode)	crustocalcine	lie le calcium par sa partie centrale	(Endo <i>et al</i> , 2000)
Procambarus clarkii (crustacé décapode)	CAP 1 et 2 (Calcification Associated Peptide)	lient le calcium	(Inoue <i>et al</i> , 2003, Inoue <i>et al</i> , 2004)

4.3.3 Protéines stabilisant le carbonate de calcium amorphe

Trois protéines ou familles de protéines ont été démontrées comme pouvant stabiliser le carbonate de calcium amorphe.

La famille **Asprich**, identifiée chez le bivalve *Atrina rigida*, est composée de 10 membres, notés **Asprich 1 à 3 et Asprich a à g** (Gotliv *et al*, 2005). Ces protéines sont riches en acide aspartique et peuvent être considérées comme acides. Elles sont composées de six domaines principaux : un domaine N-ter hydrophobe, un domaine basique, un premier domaine acide, un deuxième domaine acide qui varie selon les différents membres de la famille, un domaine DEAD (nommé ainsi en raison de sa séquence en acides aminés) et un dernier domaine acide. Les protéines Asprich-c et Asprich-3 ont été montrées comme pouvant

stabiliser une phase amorphe de carbonate de calcium et ralentir la formation de calcite (Politi *et al*, 2007, Ndao *et al*, 2010). En condition contrôle, la diffusion de carbonate d'ammonium dans une solution de CaCl₂ induit la précipitation de quelques cristaux de calcite. Par contre, en présence d'Asprich-c dans la solution de CaCl₂, des particules colloïdales en suspension apparaissent dans la solution. Elles sont identifiées comme étant du carbonate de calcium amorphe et restent stables une vingtaine de jours à température ambiante (Politi *et al*, 2007). Lors d'un test de minéralisation *in vitro* en présence d'Asprich-3, les dépôts de carbonate de calcium obtenus présentent une morphologie arrondie au lieu de la structure rhomboédrique classique de la calcite. De plus, ils apparaissent composés à la fois de calcite et de carbonate de calcium amorphe (Ndao *et al*, 2010).

La **protéine ACCBP** (Amorphous Calcium Carbonate Binding Protein), identifiée chez le bivalve *Pinctada fucata*, comporte 240 acides aminés. Elle forme des décamères, euxmêmes constitués de deux pentamères superposés. Chaque monomère présente deux sites potentiels de liaison au calcium. Lorsque la protéine est ajoutée à une solution sursaturée de Ca(HCO₃)₂, seules des particules sphériques de carbonate de calcium amorphe sont obtenues à la place de cristaux de calcite (Ma *et al*, 2007, Su *et al*, 2013).

Trois phases de carbonate de calcium sont mises en évidence dans les spicules embryonnaires de *Strongylocentrus purpuratus* : une phase amorphe hydratée, une phase amorphe déshydratée et une phase stable composée de calcite (de l'extérieur vers l'intérieur du spicule). La phase cristalline stable est obtenue à la suite de la séquence de transformation suivante : ACC hydraté puis ACC déshydratée puis calcite. En plus de sa localisation en surface du spicule, l'ACC hydraté est retrouvé au sein de la calcite, suggérant alors une stabilisation de la phase amorphe à cet endroit. Un candidat intéressant pour la stabilisation apparaît être la **protéine SM50** qui est le constituant principal de la matrice organique des spicules embryonnaires d'oursin identifié chez *Strongylocentrus purpuratus*. Elle peut être divisée en trois domaines principaux : un domaine lectine de type C, un domaine riche en glycine et un domaine riche en proline. La capacité de cette protéine à stabiliser le carbonate de calcium amorphe a été confirmée par des approches *in vitro*. Cette propriété serait portée par le domaine riche en glycine (Gong *et al*, 2012, Rao *et al*, 2013).

4.3.4 <u>Protéines présentant une activité anhydrase carbonique</u>

En plus de modifier la morphologie des cristaux de carbonate de calcium (4.3.1), la nacréine présente une activité anhydrase carbonique. Miyamoto et collaborateurs (Miyamoto *et al*, 1996) ont proposé un modèle pour l'implication de cette protéine dans le processus de

minéralisation : la nacréine transforme le CO_2 en ion HCO_3^- au cours de la réaction d'hydratation puis fixe les ions Ca^{2+} et participe ainsi à la croissance du cristal par la formation de carbonate de calcium. Différentes autres protéines identifiées chez les mollusques et les coraux semblent posséder cette même activité anhydrase carbonique (Tableau 7).

Tableau 7 : Protéines identifiées chez les invertébrés possédant une activité anhydrase carbonique

Espèce	Nom de la protéine	Référence
<i>Pinctada fucata</i> (mollusque bivalve)	nacréine	(Miyamoto <i>et al</i> , 1996)
<i>Unio pictorum</i> (mollusque bivalve)	P50	(Marie <i>et al</i> , 2010b)
<i>Pinctada maxima</i> (mollusque bivalve)	N66	(Kono <i>et al</i> , 2000)
Pinctada margaritifera (mollusque bivalve)	homologue à nacréine/N66	(Bedouet et al, 2007b)
<i>Mytilus californianus</i> (mollusque bivalve)	nacreine-like	(Marie <i>et al</i> , 2011a)
Haliotis tuberculata (mollusque gastéropode)	htCA1 et htCA2	(Le Roy et al, 2012)
<i>Tubastrea aurea</i> (cnidaire)	carbonic anhydrase	(Tambutte et al, 2007)
Stylophora pistillata (cnidaire)	STPCA	(Moya <i>et al</i> , 2008)

4.3.5 <u>Protéines présentant un domaine lectine de type C</u>

En plus de la perlucine et de la protéine SM50, évoquées respectivement pour leurs capacités à modifier la morphologie des cristaux de calcite (4.3.1) et à stabiliser le carbonate de calcium amorphe (4.3.3), différentes autres protéines présentant un domaine lectine de type C sont retrouvées chez les invertébrés. Il est à noter que ce domaine est présent dans différentes protéines des matrices organiques de coquilles d'œufs d'oiseaux qui sont impliquées dans la minéralisation telles que l'ovocléidine-17 de poule et l'ansocalcine d'autruche.

Un homologue de la perlucine, appelé **perlucine-like**, a été identifié chez la moule (*Mytilus galloprovincialis*) (Marie *et al*, 2011a).
Quinze protéines présentant un domaine lectine de type C, dont les protéines SM30-A à E, et de la même famille que la protéine SM50 ont été mises en évidence chez l'oursin *Strongylocentrus purpuratus* (Livingston *et al*, 2006).

4.3.6 Protéines inhibitrices de protéases

Certaines protéines identifiées chez les invertébrés et associées aux matrices organiques des structures minéralisées contiennent des domaines connus pour leur activité inhibitrice de protéases : les domaines Kunitz-like, Kazal-like ou WAP (Tableau 8). Un rôle direct sur la biominéralisation est aussi proposé pour la perlwapine. Par incubation avec une solution saturée en carbonate de calcium, il est démontré que cette protéine se lie aux cristaux de carbonate de calcium (Treccani *et al*, 2006).

Espèce	Nom de la protéine	Caractéristiques	Références	
<i>Unio pictorum</i> (mollusque bivalve)	P12 P16	domaines de type Kunitz-like	(Marie <i>et al</i> , 2010b)	
Venerupis philippinarum (mollusque bivalve)	IMSP4 IMSP6	domaines de type Kazal-like	(Marie <i>et al</i> , 2011b)	
Pinctada fucata	PFMG10	domaine de type Kazal- like	(Liu <i>et al</i> , 2007)	
(mollusque bivalve)	PFMG12	domaine de type Kunitz-like		
Haliotis asinina (mollusque gastéropode)	EST P0012N13_463	2 domaines de type Kunitz	(Marie <i>et al</i> , 2010a)	
Haliotis laevigata (mollusque gastéropode)	perlwapine	3 domaines WAP	(Treccani et al, 2006)	
Mytilus edulis (mollusque bivalve)	perlwapine-like	homologue de la perwapine	(Marie <i>et al</i> , 2011a)	

Tableau 8 : Protéines identifiées chez les invertébrés présentant une activité inhibitrice de protéases

A côté de ces protéines identifiées, des fractions protéiques peuvent également être inhibitrices de protéases. Ainsi, la fraction soluble dans l'eau de la matrice organique de la nacre chez l'huître perlière *Pinctada margaritifera* a été séparée par dialyse en trois sous-fractions en fonction de la masse moléculaire (supérieur à 8000 Da, inférieur à 8000 Da et inférieur à 500 Da). Chacune des fractions présente une activité d'inhibition de protéases qui varie en termes d'efficacité et de spécificité (Bedouet *et al*, 2007a).

III-Objectifs de la thèse

Dans la synthèse bibliographique, j'ai montré le rôle fondamental de la matrice organique dans les processus de biominéralisation aboutissant à la formation de structures minérales faites de carbonate de calcium cristallin et aux propriétés mécaniques remarquables. La coquille d'œuf de poule Gallus gallus qui constitue mon modèle d'étude est une structure biominérale contrôlée par la matrice organique sécrétée par l'utérus de la poule pondeuse. Cette matrice interagit avec la partie minérale pour guider et orienter la croissance et la morphologie des cristaux de calcite, ce qui assurera la mise en place de l'ultrastructure de la coquille et déterminera les propriétés mécaniques qui en résultent (Nys et al, 2004, Hincke et al, 2011). Depuis un grand nombre d'années, l'identification des protéines de la coquille a donc fait l'objet d'une attention particulière afin de mieux comprendre les interactions matrice organique/minéraux et apporter des connaissances fondamentales sur le déroulement du processus de minéralisation. J'ai également indiqué les avancées importantes obtenues ces dernières années grâce à la génomique fonctionnelle. Ainsi, les différentes analyses protéomiques et transcriptomiques des constituants présents dans la matrice organique ont permis d'augmenter le nombre de protéines identifiées d'une dizaine à plus de 600 en moins de 10 ans (Miksik et al, 2003, Mann et al, 2006, Mann et al, 2007a, Miksik et al, 2007, Jonchere et al, 2010, Miksik et al, 2010, Rose-Martel et al, 2012, Sun et al, 2013, Brionne et al, 2014). Parmi celles-ci, il est observé des protéines présentes en concentration décelable et d'autres à l'état de traces pouvant résulter de desquamations cellulaires. L'ensemble de ces études permet désormais d'avoir une analyse globale et exhaustive de la matrice organique de la coquille. Toutefois, ces approches restent principalement qualitatives et il s'agit désormais de déterminer les fonctions potentielles des constituants ayant un rôle dans le processus de calcification et notamment de caractériser les protéines cruciales dans la minéralisation.

Mes recherches consistent donc à dépasser cette étape de criblage moléculaire pour atteindre une phase de caractérisation fonctionnelle des protéines afin de hiérarchiser les constituants de la matrice organique et de mettre en évidence les plus abondants et les plus actifs dans la minéralisation au cours des différentes phases de calcification de la coquille d'œuf de poule. Des approches quantitatives ont été réalisées par le passé sur des protéines majeures de la matrice organique, mais de manière individuelle, protéine par protéine. Au cours de cette thèse, il s'agit donc de proposer une approche quantitative à haut débit. Dans ce contexte, l'objectif de mes recherches a été d'identifier, de quantifier et de caractériser la fonction potentielle des constituants de la matrice organique aux différentes phases de minéralisation, et en particulier ceux associés à la phase initiale qui est cruciale pour l'élaboration de l'ultrastructure finale de la coquille.

Quels sont les constituants présents à chacun des stades et lesquels sont les plus abondants? Comment varient leurs profils d'abondance au cours des différentes phases du processus de minéralisation? Quels rôles jouent-ils dans celui-ci? Comment participent-ils à la mise en place de l'ultrastructure de la coquille? Le résultat de ce travail permettra d'identifier des constituants-clés de la matrice organique intervenant dans la détermination de la structure de la coquille pour que celle-ci continue à jouer son rôle de barrière protectrice.

Mon travail de recherche s'est orienté autour de deux axes principaux.

Dans une première partie, l'objectif était de quantifier les protéines de la matrice organique sécrétées dans le fluide utérin au cours des trois principaux stades de la minéralisation de la coquille et d'identifier plus particulièrement celles impliquées dans la calcification. Le fluide utérin a été choisi comme modèle car il contient tous les précurseurs organiques et minéraux nécessaires à ce processus (Gautron et al, 1997). Une collaboration a été établie avec le laboratoire de spectrométrie de masse de la Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomolécules et de Phénomique des Animaux d'Intérêt Bio-agronomique (PAIB2) du site INRA de Tours pour développer une approche de protéomique quantitative à haut débit sur des échantillons de fluides utérins recueillis aux trois principaux stades de minéralisation (initiation, croissance, et terminaison). Celle-ci a été réalisée en utilisant la méthode GeLC-MS/MS couplée à une analyse quantitative par la stratégie label free spectral counting. Cette approche est adaptée à notre étude puisqu'elle permet à la fois d'identifier et de quantifier des protéines présentes dans un échantillon donné (ici le fluide utérin) et de comparer les quantités de protéines entre plusieurs échantillons obtenus dans des conditions physiologiques différentes (ici les trois principaux stades de la biominéralisation). Cette étude nous a permis d'établir une classification des composants majeurs du fluide utérin en fonction des stades de la minéralisation de la coquille. Elle a été complétée par une approche d'analyse bioinformatique pour déterminer à chacun des stades les protéines plus particulièrement impliquées dans la calcification. Ce travail a fait l'objet de deux articles dont je suis premier auteur. L'article n°1 de ce manuscrit : Quantitative proteomics and bioinformatic analysis provide new insight into protein function during avian eggshell biomineralization présente l'ensemble de la démarche et des résultats obtenus. Il a été publié dans « Journal of Proteomics » en janvier 2015. L'article n°2 : Data set for the proteomic inventory and

quantitative analysis of chicken uterine fluid during eggshell biomineralization accompagne le premier article et donne des détails sur l'analyse fonctionnelle des résultats obtenus dans la première partie du travail précédent. Il a été publié dans « Data in Brief ».

Dans une seconde partie, l'objectif était de s'intéresser plus particulièrement à l'initiation de la minéralisation. En effet, ce stade apparaît crucial pour la mise en place de l'ultrastructure de la coquille et la détermination des propriétés mécaniques qui en résultent (Rodriguez-Navarro and Garcia-Ruiz, 2000). Dans cette partie, nous avons cherché à établir une relation entre les caractéristiques observables et physiques de la coquille et la composition de sa matrice organique lors des différents évènements précoces de la minéralisation.

Dans un premier temps, il s'agissait de décrire les évènements minéralogiques et cristallographiques (apparition et croissance des cristaux, détermination de la composition et du type polymorphique des cristaux) se déroulant au cours de l'initiation de la minéralisation de la coquille et ainsi de caractériser in situ le processus de minéralisation. Mon équipe d'accueil n'ayant pas l'expertise nécessaire en analyses physico-chimiques et cristallographiques des minéraux, ce travail a été réalisé grâce à l'expertise du Docteur Alejandro Rodriguez-Navarro, professeur associé du Département de Minéralogie et Pétrologie de l'Université des Sciences de Grenade (Espagne) avec lequel mon équipe collabore depuis plusieurs années. Au cours d'un séjour en juin 2013 au sein de son laboratoire, j'ai ainsi expérimenté plusieurs techniques nouvelles pour analyser d'un point de vue microscopique et minéralogique des échantillons de coquilles en cours de formation prélevés lors de la phase d'initiation de la minéralisation et comparés à ceux prélevés plus tardivement lors de la phase de croissance linéaire. La microscopie électronique à balayage a permis de visualiser les dépôts contrôlés de minéraux au cours du temps sur les différents échantillons. La diffraction aux rayons X a révélé la composition et le type polymorphique du minéral déposé dans la coquille au cours de cette cinétique. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a informé sur les différents types de liaisons chimiques présents dans les échantillons et ainsi mis en évidence les différentes formes de carbonate de calcium amorphe (ACC) et cristallin. Pour la première fois, du carbonate de calcium amorphe a été identifié dans la coquille d'œuf de poule et apparaît comme un élément essentiel du processus de minéralisation. Comme évoqué dans la synthèse bibliographique, cette forme de carbonate de calcium serait une source temporaire de calcium plus réactive et plus soluble que les formes cristallines de carbonate de calcium. En combinant les résultats de ces différentes expériences, un scénario explicatif des évènements se déroulant au cours de l'initiation de la minéralisation a pu être proposé. Cette étude a été conclue par la rédaction de l'article n°3 présenté dans ce manuscrit, intitulé *Amorphous calcium carbonate controls avian eggshell mineralization : a new paradigm for understanding rapid eggshell calcification* publié dans « Journal of Structural Biology » en juin 2015 et dont je suis le 2^{ème} auteur.

Dans un second temps, nous avons caractérisé les composants de la matrice organique au cours de la même cinétique de minéralisation que celle utilisée lors de l'étape précédente. Comme pour l'étude du fluide utérin, nous avons choisi une approche à haut débit en collaboration avec le laboratoire de spectrométrie de masse de la PAIB2 de l'INRA de Tours. Les analyses protéomiques ont été faites sur les mêmes échantillons de coquilles en cours de formation que ceux analysés précédemment (échantillons prélevés lors de la phase d'initiation de la minéralisation et de la phase de croissance linéaire pour comparaison). Les protéines de la matrice organique extraites de ces échantillons ont été analysées en utilisant une méthode de spectrométrie de masse (GeLC-MS/MS) couplée à une quantification (stratégie label free spectral counting) et à une analyse bioinformatique des séquences moléculaires pour établir leurs fonctions. Cette étude a mis en évidence des candidats protéiques majeurs intervenant dans la minéralisation et associés à chacun des évènements de l'initiation de la calcification. Deux articles dont je suis premier auteur ont été rédigés sur ce travail. L'article n°4 de ce manuscrit: Quantitative proteomics provides new insights into chicken eggshell matrix proteins functions during the primary events of mineralisation and the active calcification phase présente l'ensemble de la démarche et des résultats obtenus. Il a été publié dans « Journal of Proteomics » en aout 2015. L'article n°5 : Data set for the proteomic inventory and quantitative analysis of chicken eggshell matrix proteins during the primary events of eggshell mineralization and the active growth phase of calcification accompagne le premier article et donne des détails sur l'analyse fonctionnelle des résultats obtenus dans le travail précédent. Il a été publié dans « Data in Brief ».

IV-Résultats expérimentaux

Chapitre 1 : Quantification et analyse fonctionnelle des protéines sécrétées dans le fluide utérin et intervenant dans le processus de minéralisation au cours des trois stades principaux de la calcification de la coquille d'œuf de poule

Présentation des travaux réalisés dans ce chapitre (Articles n°1 et 2)

Introduction et objectif

La calcification de la coquille se déroule en trois stades principaux (Nys *et al*, 1991). Lors de la phase initiale (5-10 heures après l'ovulation), les premiers cristaux de calcite sont déposés autour des noyaux mamillaires. La phase de croissance consiste en un dépôt rapide de calcite (0,33 g/h) pour former la couche palissadique (10-22 heures). La phase terminale se caractérise par un arrêt de la minéralisation et le dépôt de la cuticule qui précède l'oviposition (22-24 heures). Au cours de ces trois phases distinctes, la matrice organique interagit avec le minéral pour donner à la coquille sa texture et sa microstructure. Les études protéomiques et transcriptomiques antérieures ont permis de mettre en évidence plus de 500 protéines de la matrice organique et plus de 600 transcrits (Miksik *et al*, 2003, Mann *et al*, 2006, Mann *et al*, 2013). L'emPAI a été utilisé pour discerner les protéines majeures des protéines mineures (Mann *et al*, 2007a), mais aucune étude quantitative n'a été réalisée pour déterminer l'abondance des protéines aux différentes étapes de la minéralisation.

Dans cette étude, nous avons posé comme hypothèse qu'une protéine jouant un rôle important dans une des phases du processus de minéralisation serait abondante à cette phase par rapport aux autres protéines. De plus, elle serait surabondante dans cette même phase par rapport aux autres phases de minéralisation. Cependant, une autre hypothèse valable considérerait une logique inverse: la soustraction au fluide utérin d'une protéine inhibitrice pourrait provoquer un dépôt minéral.

Nous avons utilisé le fluide utérin qui est le milieu baignant l'œuf au cours de la formation de la coquille. Il contient les précurseurs organiques et minéraux nécessaires à sa formation (Gautron *et al*, 1997). Ce milieu est parfaitement adapté à l'étude des protéines de la matrice organique car il ne nécessite pas d'étape préalable de dénaturation, contrairement aux études protéomiques antérieures faites sur la coquille qui ont nécessité une déminéralisation et une solubilisation préalables.

Nous avons identifié et quantifié les protéines de la matrice organique aux trois principaux stades de la calcification par une approche de protéomique quantitative. Elle a été complétée par une analyse bioinformatique de la fonction des protéines identifiées et quantifiées afin de regrouper les protéines selon leurs rôles potentiels à chacun de ces 3 stades de la calcification.

Résultats et discussion

1. Inventaire global des protéines du fluide utérin

Dans une première étape, un inventaire global des protéines du fluide utérin a été réalisé. Un échantillon unique, composé de quantités égales de protéines issues de fluides utérins collectés à chacun des stades de la minéralisation, a été séparé dans un gel SDS-PAGE 4-20%. Après migration, 20 bandes, couvrant la totalité du gel, ont été découpées. Les protéines présentes dans les bandes ont été digérées par la trypsine et les peptides obtenus ont été séparés par chromatographie liquide puis analysés sur un spectromètre de masse LTQ Velos Orbitrap. Les protéines ont ensuite été identifiées à l'aide des logiciels Mascot et Scaffold 3 à partir de trois banques de données (NCBI nr, IPI Chicken et SwissProt) qui peuvent être redondantes et dont une seule est spécifique du taxon *Gallus gallus*. Aussi, un traitement bioinformatique des données a été réalisé *a posteriori* et un protéome non redondant de 308 protéines identifiées dans le fluide utérin a été obtenu (Tableau Sup. 1, article n°2, http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352340914000183).

Ces 308 protéines du fluide utérin ont été comparées aux 550 récemment mises en évidence dans le même milieu (Sun *et al*, 2013). Au total, 214 protéines sont communes entre les deux études et correspondent aux plus abondantes avec les emPAI les plus élevés. Ce premier travail d'intégration des données a ainsi déterminé que le protéome total du fluide utérin était constitué de 644 protéines différentes à ce jour.

Les 1463 identifiants protéiques issus des différentes études protéomiques de la matrice organique de la coquille (Miksik *et al*, 2003, Mann *et al*, 2006, Mann *et al*, 2007a, Miksik *et al*, 2007, Miksik *et al*, 2010, Rose-Martel *et al*, 2012, Sun *et al*, 2013) ont été rassemblés et analysés par des outils bioinformatiques afin d'éliminer la redondance entre ces différentes études. Nous avons ainsi déterminé que le protéome de la coquille d'œuf de poule était constitué de 675 protéines différentes à ce jour, dont 174 protéines communes avec notre analyse protéomique du fluide utérin.

Les 675 protéines identifiées dans la coquille ont été comparées aux 644 constituant le protéome global du fluide utérin. Au total, 373 protéines du fluide utérin sont communes avec celles identifiées dans la coquille et présentent les emPAI les plus forts et correspondent donc

aux protéines majeures. Au contraire, il est à noter que 42,1% des protéines du fluide utérin (271) n'ont pas été identifiées dans la coquille. La majorité de ces protéines présente des emPAI moins élevés et correspondrait à des protéines mineures ou issues de dégradations cellulaires. Toutefois, certaines sont sécrétées en abondance sans être incorporées dans la matrice organique et jouent d'autres rôles biologiques dans le fluide utérin.

Une analyse fonctionnelle globale des 308 protéines identifiées dans le fluide utérin au cours de notre étude a également été réalisée. L'enrichissement des termes GO extraits a été déterminé par Genomatix. Cette analyse a permis de définir les fonctions et les processus biologiques et métaboliques les plus importants et les plus représentés dans le fluide utérin. En considérant les termes GO associés aux fonctions moléculaires (MF) et aux processus biologiques (BP), un total de 100 termes GO présente des p-values significatives, indiquant des enrichissements. Ces termes ont été groupés en 24 catégories. Les deux plus importantes regroupent respectivement 26 protéines impliquées dans le métabolisme des carbohydrates (dont la dégradation des hexoses et la libération d'énergie) et 25 dans le métabolisme des petites molécules. Un autre groupe de termes enrichis rassemble des protéines impliquées dans le métabolisme des protéines (structure, assemblage et repliement des protéines). Celles-ci pourraient être impliquées dans le contrôle des activités d'autres protéines participant à la formation de la coquille.

2. Protéomique quantitative aux trois stades principaux de la calcification de la coquille

Dans une seconde étape, nous avons réalisé une analyse quantitative pour déterminer la variation d'abondance des protéines au cours du processus de calcification. Les fluides utérins collectés ont été regroupés par stade de minéralisation, concentrés en bandes fines dans un gel SDS-PAGE 4-20% et les protéines colorées au bleu de Coomassie. Comme pour la première étape, les protéines ont été identifiées par une analyse protéomique utilisant un spectromètre de masse LTQ Velos Orbitrap grâce aux logiciels Mascot et Scaffold 3. Une quantification des protéines par la stratégie label free spectral counting a été menée à l'aide du logiciel Scaffold 3 Q+. Par cette méthode, des valeurs quantitatives ont été réalisée sur les valeurs quantitatives afin de déterminer les protéines avec des abondances significativement différentes à au moins un des trois stades (p-value < 0,05). Elle montre que 64 des 96 protéines quantifiées présentent une variation d'abondance en fonction du stade de calcification. Pour ces 64 protéines, une valeur quantitative moyenne centrée réduite a été

calculée pour chacun des stades. Une classification hiérarchique ascendante a déterminé 5 profils protéiques différents en fonction de l'abondance des protéines aux différents stades. Ainsi, 23 protéines sont surabondantes au stade initial, 7 au stade croissance et 17 au stade terminal. De plus, 15 protéines sont surabondantes à la fois aux stades croissance et terminal et 2 aux stades initial et terminal.

3. Analyse fonctionnelle des protéines quantifiées

La fonction potentielle des protéines présentes dans chacun de ces profils a été déterminée par l'analyse des données bibliographiques, des domaines fonctionnels et des bases de données protéiques. Trois groupes fonctionnels principaux ont été constitués.

Le premier regroupe 15 protéines dont la fonction est associée au processus de minéralisation (Tableau 2 de l'article n°1). Il est à noter que la majorité de ces protéines (9/15) sont surabondantes lors de l'initiation de la minéralisation qui est déterminante pour établir la structure finale de la coquille (texture et ultrastructure) et, par conséquent, dans la détermination des propriétés mécaniques de la coquille (Nys et al, 2004, Gautron and Nys, 2007b, Hincke et al, 2010). L'ovalbumine, le lysozyme et l'ovotransferrine sont abondantes dans le fluide utérin en cohérence avec leurs fortes concentrations dans les couches basales de la coquille. Elles sont connues pour intervenir dans la calcification par leurs capacités à lier le calcium et à modifier la morphologie des cristaux de calcite in vitro (Hincke, 1995, Gautron et al, 1997, Hincke et al, 2000, Gautron et al, 2001b). L'ovocléidine-17 modifie également la morphologie des cristaux de calcite in vitro (Reyes-Grajeda et al, 2004) et des études de modélisation dynamique prédisent que cette protéine pourrait induire la transformation du carbonate de calcium amorphe (ACC) en calcite (Freeman et al, 2010, Freeman et al, 2011). Des corrélations entre le polymorphisme du gène de l'ovocalyxine-32 et des mesures phénotypiques de qualité de coquille ont été établies (Dunn et al, 2009a, Dunn et al, 2012). Dans ce groupe, sont aussi identifiées MFGE8 et EDIL3 qui possèdent des domaines de liaison au calcium de type EGF-like et sont donc susceptibles d'interagir avec la phase minérale. Trois autres protéines, l'albumine, la gelsoline et l'hémopexine (Kraghhansen and Vorum, 1993, Mauk et al, 2005, Chumnarnsilpa et al, 2006) qui lient les ions calcium ou divalents ont été mises en évidence. Il est également observé dans ce groupe des protéines constitutives des protéoglycanes ou ayant une affinité pour ceux-ci. Ces derniers sont connus pour être des acteurs majeurs de la biominéralisation du fait de leur charge négative et leur capacité à attirer les ions calcium. Ainsi notre étude a révélé 2 protéines qui correspondent à des cœurs protéiques de protéoglycanes, l'ovocléidine-116 et le tsukushi, et 2 protéines liant les protéoglycanes (SERPINF1 et syndecan binding protein). La dernière protéine de ce groupe correspond à un isoforme du collagène, collagen type X alpha 1, présent dans les membranes coquillières.

Le second groupe fonctionnel est constitué de 10 protéines pouvant modifier l'activité des protéines sécrétées et impliquées dans la minéralisation et, de ce fait, influencer leurs propriétés lors du processus de calcification (Tableau 3 de l'article n°1). En agissant ainsi, ces protéines participent à la régulation de la minéralisation de la coquille qui se déroule dans un milieu acellulaire et doit donc se faire in situ. Ces protéines sont majoritairement présentes lors de l'initiation et de la terminaison de la calcification et peuvent être classées en trois catégories. Les protéines chaperonnes sont impliquées dans les interactions protéinesprotéines pour à la fois assurer le repliement approprié des protéines de la matrice organique et leur conformation permettant la minéralisation et réguler l'activité des autres protéines présentes dans le milieu par leurs interactions. Notre étude identifie l'ovocalyxine-21 et la clusterine comme 2 chaperons moléculaires (Mann et al, 2003, Gautron and Nys, 2007b). Les protéases peuvent dégrader les protéines ou activer des précurseurs en protéines matures ; les inhibiteurs de protéases régulant l'activité des protéases. Un total de 7 inhibiteurs de protéases est identifié dans cette étude dont l'ovomucoïde, l'ovoinhibiteur, la cystatine, l'ovocalyxine-25 et l'ovocalyxine-32. Le degré de phosphorylation des protéines est également un facteur important du processus de minéralisation puisqu'il a été montré qu'il peut en moduler la cinétique (Hincke and St. Maurice, 1998). Les kinases et les phosphatases joueraient ainsi un rôle important dans la régulation de la calcification et notre étude met en évidence une phosphatase, LOC428451.

Le troisième groupe fonctionnel rassemble 20 protéines potentiellement atimicrobiennes, réparties équitablement dans tous les profils d'abondance selon le stade. Ces molécules sont essentielles au processus de maintien de la stérilité de l'œuf au sein de l'utérus (Tableau 4 de l'article n°1). Les composés identifiés agissent selon différents mécanismes. Plusieurs chaines d'immunoglobulines ont été identifiées. Le lysozyme a une action lytique sur la paroi des bactéries Gram positives (Callewaert and Michiels, 2010). La famille des LBP/BPI est représentée par 2 membres, l'ovocalyxine-36 et BPIL2. Ces composés se lient aux lipopolysacharides de la paroi des bactéries Gram négatives (Gautron *et al*, 2011b, Cordeiro *et al*, 2013). D'autres captent et retiennent les nutriments essentiels à la croissance des bactéries,

réduisant ainsi leur disponibilité. C'est notamment le cas de l'ovotransferrine qui est un chélateur de fer (Rehault-Godbert *et al*, 2011). Les inhibiteurs de protéases représentent une autre catégorie de protéines antimicrobiennes. Ils limitent l'activité des protéases sécrétées par certaines bactéries virulentes. Parmi ceux identifiées dans le fluide utérin, l'ovoinhibiteur et l'ovocalyxine-32 sont deux inhibiteurs de protéases dont l'activité antibactérienne a été démontrée (Xing *et al*, 2007, Bourin *et al*, 2011). L'OVAX présente une activité antibactérienne portée par son domaine de liaison à l'héparine qui lui permet de se lier aux peptidoglycanes de la paroi bactérienne (Rehault-Godbert *et al*, 2013). L'ovocléidine-17 est une protéine possédant un domaine lectine de type C et aux propriétés antibactériennes démontrées (Wellman-Labadie *et al*, 2008).

Conclusion

Cette étude a conduit à l'identification de 308 protéines du fluide utérin dont 64 sont différentiellement abondantes selon les trois principaux stades de la calcification. Une classification hiérarchique a déterminé 5 profils protéiques d'abondance. Combinée aux résultats de l'emPAI, elle nous a permis de définir les protéines les plus importantes aux trois phases clés de la minéralisation. L'analyse de la fonction des protéines a mis en évidence 3 groupes fonctionnels principaux. Le premier regroupe les protéines potentiellement impliquées dans le processus de calcification principalement abondantes lors de l'initiation de la minéralisation. Parmi celles-ci, il est à noter la présence de l'ovotransferrine, l'ovalbumine et l'ovocléidine-17 qui modifient la morphologie des cristaux de calcite in vitro, ainsi que des protéines EDIL3 et MFGE8 qui présentent des domaines de liaison au calcium. Le second groupe est constitué de protéines du fluide utérin qui influencent indirectement la minéralisation par interaction avec les autres protéines du milieu. Dans ce groupe, l'ovocalyxine-21 est une protéine chaperonne majeure du fluide utérin. Le fluide utérin contient également de nombreuses protéines antimicrobiennes représentées dans tous les profils. Des études expérimentales supplémentaires seront nécessaires pour analyser les activités biologiques des protéines mises en évidence.

Cette étude a abouti à la rédaction des deux articles présentés ci-après.

- Article n°1 « Quantitative proteomics and bioinformatic analysis provide new insight into protein function during avian eggshell biomineralization » a été publié dans *Journal of Proteomics* (Impact factor 3,929).
- Article n°2 « Data set for the proteomic inventory and quantitative analysis of chicken uterine fluid during eggshell biomineralization » a été publié dans *Data in Brief*.

Ces travaux ont fait l'objet de présentations lors de congrès internationaux et nationaux :

- 15^{èmes} Journées Françaises de la Biologie des Tissus Minéralisés (30-31/05/2013), présentation orale effectuée par J. Gautron
- 12th International Symposium on Biomineralization (Freiberg, Allemagne, 27-30/08/2013), présentation orale (P. Marie)
- XVth European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products (Bergame, Italy, 15-19/09/2013), présentation orale effectuée par J. Gautron et rédaction d'un article pour le proceeding du congrès
- 29^{èmes} Journées Françaises de Spectrométrie de Masse (17-20/09/2012), présentation affichée (P. Marie)
- 29^{ème} Congrès de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyses Protéomiques (15-17/10/2012), présentation affichée (P. Marie)
- 15^{èmes} Journées de la Recherche Avicole et des Palmipèdes à Foie Gras (La Rochelle, France, 26-28 mars 2013), présentation affichée et rédaction d'un article pour le proceeding du congrès (P. Marie)
- 26^{ème} colloque BioTechnoCentre (10-11/10/2013), présentation affichée (P. Marie)

Chapitre 1

Chapitre 1

Article n°1 :

« Quantitative proteomics and bioinformatic analysis provide new insight into protein function during avian eggshell biomineralization » Chapitre 1



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

ARTICLE INFO

Article history: Received 29 August 2014 Accepted 26 September 2014

Keywords: Chicken Eggshell Mineralization Quantitative proteomics Uterine fluid

ABSTRACT

Gallus gallus eggshell is a bioceramic composed of 95% calcium carbonate in calcitic form and 3.5% extracellular organic matrix. The calcification process occurs in the uterine fluid where biomineralization follows a temporal sequence corresponding to the initiation, growth and termination stages of crystal growth. Eggshell texture and its ultrastructure are regulated by organic matrix proteins, which control mineralization process and influence the eggshell biomechanical properties. We performed proteomic qualitative analyses and identified 308 uterine fluid proteins. Quantitative analysis showed differential abundances at the three stages of shell biomineralization for 64 of them. Cluster analysis revealed a first group of proteins related to mineralization and mainly present at the onset of calcification including OVOT, OVAL, OC-17, and two novel calcium binding proteins (EDIL3, MFGE8). A second group of proteins mainly present at the initiation and termination of shell formation was potentially involved in the regulation of the activity of the uterine fluid proteins (e.g. molecular chaperones, folding proteins, proteases and protease inhibitors). OCX21, a protein highly concentrated in the fluid and the shell, belongs to this group. A third group equally represented at all stages of shell mineralization corresponded to antibacterial proteins that could protect the forming egg against microbial invasion.

Biological significance

The calcitic avian eggshell protects the developing embryo and, moreover, ensures that the nutritious table egg remains free of pathogens. The eggshell is formed by nucleation upon a fibrous scaffold (the eggshell membranes) followed by an interaction between the growing mineral crystals and the shell organic matrix. This interaction leads to a highly ordered shell microstructure and texture which contribute to its exceptional mechanical properties. Shell mineralization occurs in three distinct phases of calcification (initiation, growth and termination), which are associated with distinct populations of matrix proteins that are secreted into the acellular uterine fluid as modulators of the process. The recent development of high-throughput methods has led to the identification of many proteins in the shell, but little is known concerning their role in shell formation. In order to determine precisely the importance

* Corresponding author at: INRA, UR83 Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly, France. Tel.: +33 247427540. E-mail address: joel.gautron@tours.inra.fr (J. Gautron). of particular proteins relative to eggshell mineralization, this project used qualitative and quantitative proteomics of the uterine fluid constituents, coupled with bioinformatic analysis, to predict the functional role of proteins secreted at each of the three main stages of shell calcification. Besides its relevance to food production and to hen reproduction, eggshell calcification is furthermore a relevant model for studying calcium carbonate biomineralization on a two-dimensional membrane support. Better understanding of this process will provide insight into the fabrication of ceramics at ambient pressure and temperature.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The chicken egg is a giant reproductive cell composed of an oocyte surrounded by nutritive reserves (yolk and egg white), with the eggshell as a protective envelope. It is a completely self-sufficient and aseptic biological package for the extra-uterine development of the avian embryo. To resist physical and microbial assaults from the external milieu, the egg possesses protective systems. Chemical protection is ensured by antimicrobial components widely present in all egg compartments [1]. The mineralized eggshell constitutes the first physical natural barrier of the egg which resists microbial contamination and regulates transfer of metabolic gases and water [2,3].

The eggshell is a complex bioceramic material composed of 95% calcium carbonate (calcite polymorph), and 3.5% proteins and proteoglycans that constitute the shell membranes and the shell organic matrix. The organic matrix is believed to play a key role in shell formation as shown by in vitro and in vivo observations [2-5] and by analogies with other biominerals. This controlled biomineralization process occurs in a confined space where ionic concentrations (calcium and bicarbonate) are supersaturated relative to calcite. The shell formation process can be divided in three stages: initiation of crystal growth (first crystal deposition at the mammillary cores), linear crystal growth and, finally, termination of mineralization with an associated deposition of a proteinaceous cuticle layer [6]. These three steps coincide with a temporal sequence of organic matrix secretion into the acellular uterine fluid, as demonstrated by in vitro and in situ observations, which have been corroborated by genomic approaches [2,4,5,7]. During these three distinct phases of shell formation, matrix proteins interact with the mineral phase and influence crystal polymorph and shape, favoring a progressive crystal orientation that becomes roughly perpendicular to the egg surface. This process establishes the eggshell texture and microstructure, and influences its mechanical properties [2,4,5].

In such a context, the identification and characterization of the key shell matrix proteins are of major interest. Matrix proteins have been identified using biochemical, molecular and high-throughput methods (transcriptomics and proteomics) [8,9]. These methods led to the identification of more than 500 proteins in the shell [9–14] and more than 600 uterine transcripts [9,15,16]. The function of the majority of these proteins has not yet been analyzed in an organized manner, although it is our working hypothesis that a number of them regulate the calcification process. emPAI has been used to discern major from minor proteins in previous studies [10,14] but no quantitative studies have yet been performed to determine their abundance in accordance with the different step of shell formation. Our current hypothesis is that proteins playing a critical role would be more abundant at one of the pivotal stages of shell calcification.

Uterine fluid bathes the egg during eggshell calcification. Therefore, it contains all eggshell matrix components as soluble precursors [7] and probably additional proteins involved in other functions (egg protection, metabolism, regulation...). In this study, we have collected this milieu at the three main stages of shell calcification. We have used GeLC–MS/MS strategy and a label-free comparative proteomic approach based on spectral counting quantitative methodology [17] to identify and determine the abundance of uterine fluid proteins at the various phases of shell calcification. This information has allowed us to perform a bioinformatic analysis to propose functional grouping of the most abundant eggshell matrix components present in the uterine fluid and to explore their potential role at each of the three pivotal stages of shell calcification (initiation, growth and termination).

2. Materials and methods

2.1. Ethical statement, animals handling and housing

All experiments, including all animal handling protocols, were carried out in accordance with the European Communities Council Directives concerning the practice for the care and use of animals for scientific purposes and the French Ministry on Animal Experimentation under the supervision of authorized scientists (authorization # 7323, delivered by the DDPP, Direction Départementale de la Protection des Populations d'Indre et Loire). The experimental unit UE-PEAT 1295, where the birds were maintained, has the authorization for rearing birds and for the euthanasia of experimental animals (Decree No. B37-175-1 of August 28th, 2012 delivered by the Préfecture d'Indre et Loire following inspection by the Department of Direction of Veterinary Services). The protocol was approved by an ethical committee (Comité d'Éthique de Val de Loire, officially registered under number 19 of the French national ethics committee for animal experimentation) under agreement number 00159.02.

2.2. Collection of uterine fluid

Sixty brown-egg laying hens (ISA-Hendrix, 37 weeks old at time of sampling) were caged individually and subjected to a cycle of 14 h of light/10 h of darkness. Each cage was equipped with a device for automatic recording of oviposition (time of egg laying). Hens were fed a layer mash ad libitum as recommended by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Uterine fluids were collected as described previously [7]. Egg expulsion was induced by an intravenous injection of 50 μ g prostaglandin 2- α /hen at 7 h, 14 h and 22 h after previous oviposition (p.o.), after confirming the presence of an egg in utero (ovulation occurs about 15 min after oviposition of the previous egg). These time intervals correspond to the initiation (I), rapid growth (G) and termination (T) phases of shell mineralization, respectively. Uterine fluid was collected immediately after egg expulsion by gravity in a plastic tube placed at the entrance of the everted vagina. Uterine fluid was immediately diluted to 5× Laemmli buffer to get the following final composition (0.0415 M Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 10% glycerol, 1.66% ß mercaptoethanol and 0.01% bromophenol blue) and stored at -20 °C until electrophoresis. An additional aliquot of each individual uterine fluid was also collected for protein determination

2.3. Sample preparation for MS analysis

Protein concentration was determined in individual fluid samples using the protein DC kit (Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France) according to the manufacturer's instructions and using bovine serum albumin as a standard. For global protein inventory, equal amounts of protein from uterine fluids collected at each stage of shell calcification were pooled. A total of 135 µg of proteins was fractionated on a 4–20% SDS-PAGE gel (8.3 cm × 7.3 cm × 1.5 mm). Proteins on gels were stained with Coomassie blue and the entire SDS-PAGE lane was sectioned into 20 bands. For quantitative analyses, 18 individual uterine fluid samples were used. Six uterine fluids collected at the same stage were pooled in equal amounts of proteins for each stage (initial (I), growth (G) and terminal (T) stage samples). The three samples I, G and T (112 μ g of proteins/sample) were applied to a 4–20% SDS-PAGE gel (8.3 cm × 7.3 cm × 1.5 mm). A brief migration without fractionation was performed until samples were concentrated in a narrow band. The three resulting protein bands were stained with Coomassie blue and excised. Excised proteins were in-gel digested with bovine trypsin (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), as previously described [18], and analyzed by nanoscale liquid chromatography-tandem mass spectrometry (nano LC-MS/MS).

2.4. Nano LC–MS/MS analyses

All experiments were performed on a linear ion trap Fourier Transform Mass Spectrometer (FT-MS) LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) coupled to an Ultimate® 3000 RSLC Ultra High Pressure Liquid Chromatographer (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) as previously described [18]. Five microliters of each sample was loaded on an LC Packings trap column and desalted. The peptide separation was conducted using a LC Packings nano-column (Acclaim PepMap C_{18} , 75 μ m inner diameter × 50 cm long, 3 μ m particles, 100 Å pores). The gradient consisted of 4–55% B for 90 min (proteomic inventory), or 120 min (quantitative analysis), at 300 nl/min flow rate. Data were acquired using Chromeleon Software (version 6.8 SR11; Dionex, Amsterdam, The Netherlands) and Xcalibur software (version 2.1; Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). The LTQ Orbitrap Velos instrument was operated in a positive mode in data-dependent mode. Resolution in the Orbitrap was set to R = 60,000. In the scan range of m/z 300–1800, the 20 most intense peptide ions with charge states ≥ 2 were fragmented using Collision Ion Dissociation (CID). Dynamic exclusion was activated during 30 s with a repeat count of 1. Polydimethylcyclosiloxane (m/z, 445.1200025) ions were used as lock mass for internal calibration.

2.5. Protein identification and data validation

Raw data files were converted to MGF as previously described [18]. The identification of proteins was established using MASCOT search engine (v 2.3, Matrix Science, London, UK). The peptide and fragment masses obtained were matched automatically against IPI chicken (version 3.81) and against the chordata section of nr NCBI database (1601319 sequences, downloaded on 2012/03/22) and UniprotKB SwissProt (535248 sequences, downloaded on March 2012). Enzyme specificity was set to trypsin with two missed cleavages using carbamidomethylcysteine, oxidation of methionine and N-terminal protein acetylation as variable modifications. The tolerance of the ions was set to 5 ppm for parent and 0.8 Da for fragment ion matches. Mascot results obtained from the target and decoy database searches were incorporated in Scaffold 3 software (version 3.4, Proteome Software, Portland, USA). Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 95.0% probability as specified by the Peptide Prophet algorithm [19]. Peptides were considered distinct if they differed in sequence. Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 95.0% probability as specified by the Protein Prophet algorithm [20] and contained at least one sequence-unique peptide for global inventory and at least two sequence-unique peptides for quantitative analysis. A false discovery rate was calculated as < 1% at the peptide or protein level. The abundance of identified proteins was estimated by calculating the emPAI using Scaffold 4 Q+ software (version 4.2, Proteome Software, Portland, USA).

Additionally, to perform label-free quantitative proteomic analyses based on spectral counting method, Scaffold 3 Q+ software (version 3.4, Proteome Software, Portland, USA) was used to quantify the proteins at the three different stages of calcification. All proteins with greater than two sequenceunique peptides identified in database with high confidence were considered for protein quantification. To eliminate quantitative ambiguity within protein groups, we ignored all the spectra matching any peptide which is shared between proteins. Thereby, quantification performed with normalized spectral counts was carried out on distinct proteins.

2.6. Statistical, data mining and bioinformatic analyses

The mass spectrometry data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium [21] via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD000992.

Data originating from both proteomic inventory and quantitative analyses were treated as follows. Trypsin and keratin from mammals were eliminated from the lists as they appeared to be contaminants or resulting from the digestion process. Protein sequences from the three databases (NCBI nr, UniprotKb SwissProt and IPI chicken) were aligned to eliminate all redundancies. Protein groups were determined using Clustal Omega multi-alignment algorithm [22]. Sequences were blasted against nr NCBI database limited to Gallus gallus taxon using the blastp program (BLAST+ suite) [23]. This was performed using R language (http:/cran.r-project.org) and GI, Gene ID identifiers and descriptions were extracted. The resulting file constitutes the non-redundant proteome (See Table 1 in [24]). These protein sequences were compared to previous proteins already identified in the egg. Egg yolk, egg white, vitelline membranes, eggshell and cuticle proteins already identified were merged in a non-redundant egg proteome database. Using BLAST + suite, uterine fluid proteins were aligned with those already identified in the egg to determine common and specific proteins. GO terms were extracted from the protein sequences using GORetriever (http://agbase.msstate.edu/). GO terms enrichments were determined using Genomatix suite (www.genomatix.de).

Moreover, one way ANOVA was performed for protein abundance in each database to reveal proteins significantly different between the three stages of shell mineralization (p-value < 0.05). The mean abundance per phase of shell calcification (I, G and T), standardized by row, was used to perform hierarchical clustering. We used an average linkage algorithm from a distance matrix calculated with the Pearson correlation coefficient for the cluster analysis in MeV tool [25]. We produced a heat map and dendrogram showing the different groups of proteins with different abundances according to calcification stages.

Conserved and functional domains were extracted from protein sequences using BioMart and were classified in three main putative functions and reported in each individual cluster (http://www.ensembl.org/biomart/martview).

2.7. Western blotting

In order to consolidate mass spectrometry quantification, quantitative Western blotting analyses were performed on the same biological samples. Proteins were separated by SDS-PAGE (12.5% isocratic gel, 8.3 cm \times 7.3 cm \times 1 mm) and electroblotted on nitrocellulose membranes. The membranes were washed in distilled water and blocked overnight in Tris Buffered Saline (500 mM Tris-HCl, pH = 7.4), containing 10% Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France). The membranes were incubated either with rabbit antiovotransferrin [26] (1:3000 in TBS containing 5% Blotting-Grade Blocker and 0.2% Tween-20), or with rabbit antiovocalyxin-36 [27] (1:5000 in TBS containing 5% Blotting-Grade Blocker and 0.2% Tween-20) antibodies for 1 h at 37 °C. The membranes were washed three times for 10 min at room temperature in a washing solution (TBS containing 0.2% Tween-20 and 1.3% Blotting-Grade Blocker) under gentle shaking, followed by incubation for 1 h at 37 °C with the secondary antibody (1:5000 or 1:10000 goat antirabbit antibodies coupled to Alexa 680, Fisher, Illkirch, France) and washing again three times as above. Finally, an additional wash of 5 min was performed in TBS with shaking. Immunoreactive bands were detected by scanning the membranes with an Infrared Imaging System (Odyssey, LI-COR Biosciences Inc., Lincoln, NE, USA) in the 700 nm channel.

Prestained molecular weight standards (Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France) are also visible on the blot in this channel.

3. Results

3.1. Proteomic inventory of uterine fluid proteins

In a first approach, we performed a global inventory of all the soluble proteins that are present in the uterine fluid during the entire process of calcification. Equal amounts of protein collected at the three stages of shell calcification were analyzed by GeLC-MS/MS after SDS-PAGE fractionation (Fig. 1).

A total of 256, 298 and 98 proteins were identified using nr NCBI database, IPI chicken database, and UniProtKb/Swiss-Prot database, respectively. Additional bioinformatic analyses were performed in order to eliminate redundancies. A total of 308 non-redundant uterine fluid protein sequences were identified [24]. To discern the relative abundance of these proteins amongst this sample, we calculated the emPAI from the proteins identified in the IPI database. Furthermore, we added the proteins revealed in another study of the uterine



Fig. 1 – SDS-PAGE of equal amounts of uterine fluid proteins collected at the three stages of shell calcification and mixed together for a proteomics inventory of uterine fluid proteins. The mass of molecular weight markers is indicated in kDa (left arrows). The slices cut out for in-gel digestion are indicated (right numbers).

fluid [28]. They were analyzed to identify redundant proteins then were compared to our list [24]. Amongst the 550 and 308 proteins revealed by both studies, 214 proteins were common. The majority of them showed high emPAI.

A total of 1463 proteins IDS were previously identified by proteomics in the decalcified eggshell organic extract [10-14,28]. All available sequences were loaded and aligned to establish a non-redundant list of 675 proteins constituting the eggshell proteome to date. The 308 uterine fluid proteins described in the current study and the 550 revealed by Sun et al. [28] were assembled and revealed that the uterine fluid proteome comprises 644 different proteins. Of these, 373 proteins present in the uterine fluid were also observed in the eggshell matrix and are expected to correspond to eggshell protein precursors (Fig. 2). However, only 174 are present in both uterine fluid studies and in the eggshell matrix. It is likely that they include the major proteins involved in the process of mineralization. It is noteworthy that a large number of uterine fluid proteins (271, 42.1%) were not previously observed in the eggshell (Fig. 2).

We determined the potential functions of the 308 uterine fluid proteins of our study using Gene Ontology terms (GO) (www.geneontology.org) and Gene set enrichment tools from Genomatix suite (www.genomatix.de). When considering GO terms associated to molecular functions (MF) and biological process (BP), a total of 100 GO terms were found to be significantly enriched (p-values range from $9.78.10^{-3}$ to 6.04.10⁻⁷) and grouped in 24 various categories which represent the biological and molecular functions over-represented in the uterine fluid (see Table 2 in [24]). Groups of importance are composed of uterine fluid proteins involved in protein metabolism and which might be involved in the control of activity of proteins participating in shell formation. There are 13 proteins related to protein assembly, seven proteins involved in folding and 19 related to protein structure and integrity. Five proteins belonging to the latter are also reported in the "cellular component assembly and organization" group composed of six proteins.



Fig. 2 – Venn diagrams representing the common, shared and specific proteins previously reported in shell and uterine fluid proteomics studies. The entire eggshell-described protein sequences [10–14,28] were reduced to a non-redundant list of 675 proteins (blue circle), which were compared to the 550 uterine fluid proteins revealed by Sun et al. [28] (green circle) and to the 308 determined in our study (red circle).

3.2. Quantitative proteomics at the 3 stages of shell calcification

In a second approach, GeLC-MS/MS analyses combined with label free quantitative analysis based on spectral counting quantitative method were used to compare the respective abundance of distinct proteins at the three stages of shell calcification. A total of 85 proteins were identified using the nr NCBI database, 92 proteins using the IPI chicken database, and 50 proteins with the UniProtKb/Swiss-Prot database. Additional bioinformatic analyses were performed to eliminate redundancies. A total of 96 non-redundant proteins were identified (see Table 3 in [24]). These 96 proteins were previously observed amongst the 308 proteins and represent a partial uterine fluid proteome inventory, but are the most abundant (60 of them are on the top 100 of the most abundant uterine fluid proteins). Amongst these 96 proteins, 83 were previously described as eggshell matrix proteins and 13 (13.5%) were not previously observed in the eggshell. Amongst them, three proteins (alpha D-globin, cyclophilin A and BPIL2) exhibited relatively high emPAIs of 107.8, 15 and 2.63, respectively [24].

Ovotransferrin (OVOT) and ovocalyxin-36 (OCX36) were selected for verification of relative protein abundance using quantitative Western blotting on the same biological samples as those used for quantitative proteomics. Quantitative comparisons for the three stages were similar with both methods, with highest abundance at the initial stage for ovotransferrin, and at the growth and terminal phases for ovocalyxin-36 (Fig. 3). These observations validated the quantitative proteomic results.

ANOVA statistical analysis revealed a total of 64 non-redundant proteins with differential abundance according to the three main stages of shell calcification (see Table 3 in [24]). Additional hierarchical clustering analysis (HCA) was then applied to this restricted list of proteins. A dendrogram (Fig. 4) reveals five different clusters corresponding to different profiles of protein abundances throughout the three stages of shell calcification. Table 1 reports the different proteins present in each cluster. Cluster B is composed of 23 proteins whose abundance is the highest at the initial stage. Proteins most abundant during the active growth of shell are represented in cluster E, made of 7 distinct proteins. The 15 proteins constituting cluster D are present at high and equivalent levels in the uterine fluid during the active growth and terminal phases. In contrast, cluster A (2 proteins) is composed of proteins absent during the growth phase and abundant during the initiation and termination of shell calcification. Proteins related to the termination of mineralization are present in cluster C (17 proteins).

Potential functions of the 64 proteins were examined according to the literature descriptions, data annotations and functional domain databases, with particular emphasis on three potential roles in the uterus during shell formation. The first of these functional groups (mineralization) is composed of 15 proteins with potential roles in the calcification of the shell (Table 2). The majority of them (9 proteins, 60%) are present in cluster B, which corresponds to proteins with increased abundance at the onset of shell calcification (Fig. 5). The second group is made of 10 proteins potentially



Fig. 3 – Comparison of protein abundance at the three stages of shell calcification in the uterine fluid from proteomics and Western blot analyses. Relative abundance of these proteins was determined by both methods for ovotransferrin (a.) and ovocalyxin-36 (b.) and expressed in normalized spectrum counts (left vertical axis) and in band intensity (right vertical axis).

involved in the uterine fluid regulation of the activity of proteins and is annotated as "regulation of process" (Table 3). The proteins belonging to this group are found to be mainly present in clusters associated with the initiation and termination of shell formation (Fig. 5). Another group of importance is made up of 20 proteins with demonstrated or potential antimicrobial activity, which is found in all protein clusters (Table 4, Fig. 5). It is also notable that many of the 64 proteins exhibited potential functions described in two or even three functional groups (Tables 2, 3 and 4). Finally, 30 proteins could not be ascribed to any of these three functional groups, but rather are classified as proteins with other roles (see Table 4 in [24]).

4. Discussion

The objective of this study was to obtain a harmonized inventory of uterine fluid proteins, and to relate their presence to each particular stage of eggshell calcification to obtain insight into their functional role. Therefore, our study aims to advance from the global molecular screening phase to a functional characterization of the identified proteins by carrying out a quantitative inventory of proteins in the uterine fluid associated with different stages of eggshell formation. We expected to reveal stage-specific proteins according to the previously assigned temporal sequence of shell calcification. The work was carried out with the uterine fluid because this milieu bathes the forming egg during shell calcification in the uterus and is hypothesized to contain all organic eggshell matrix precursors and ions in a soluble form before being possibly incorporated in the compact shell [7,29]. Eggshell extracts have previously been used after demineralization and solubilization by detergents to identify eggshell proteins by proteomic approaches [10,11,14]. The matrix is only partially soluble using these methods [30]. Therefore, proteomic studies have additionally been performed on the insoluble extract [13] but only a limited number of proteins (28) were revealed, the majority of them (26) being also present in the soluble extract. The uterine fluid is therefore a good alternative to study eggshell proteins, as this milieu does not require any chemical treatment or denaturation step prior to its proteomic investigation.

4.1. Identification of uterine fluid proteins to investigate eggshell matrix proteins

Our priority was to quantify major proteins and the changes occurring in relationship to sequence of shell formation, rather than performing an in-depth inventory of the complete set of proteins present in the uterine fluid. Therefore, the number of uterine fluid proteins identified in this study (308) is lower than the number of proteins (558) previously observed in the eggshell extract [10-14,31]. In a recent proteomic study, Sun et al. [28] described a total of 466 and 577 proteins from soluble eggshell extract and from uterine fluid collected during the growth phase, respectively. Using these datasets, we have performed additional bioinformatic analysis to establish that 675 and 644 proteins constitute the eggshell and uterine fluid proteomes, respectively, in the merged data sets (Fig. 2). Amongst the uterine fluid proteins, 373 were previously identified in eggshell proteomic studies [10-14,28]. Fig. 2 also showed that 174 uterine fluid proteins were common between our study, the only other uterine fluid proteome [28] and the proteins identified in the shell [10-14,31]. These proteins showed the highest emPAI values and therefore should correspond to the most active proteins involved in shell formation or egg protection. This list includes all the eggshell proteins previously identified (ovocalyxins and ovocleidins) and also numerous proteins present in the egg white. We originally hypothesized that all proteins present in the eggshell matrix should transit via the uterine fluid as soluble precursors [7] and this is currently

Fig. 4 – Hierarchical classification analysis performed on 64 uterine fluid proteins with differential abundance at the three stages of shell calcification. Dendrogram (left) and graphs of the five different clusters (right) representing the variation in protein abundance (vertical axis) collected at the initiation (I), growth (G) and termination (T) stages of shell calcification (horizontal axis).



confirmed for a large number of proteins including the major eggshell proteins. Nevertheless, it is noteworthy that 271 proteins of the uterine fluid (42.1%) were not previously identified in the shell proteome. Their emPAI is in general minor so it might correspond to cellular decay of oviduct or alternatively could be involved in other functions.

4.2. Protein profiling according to pivotal stages of shell calcification

Quantitative data are described in the Results section for 64 proteins to establish their abundance according to the pivotal stages of shell formation (initiation, growth and termination). Furthermore, some of the 64 proteins could be classified into three main putative functions ascribed to the uterine fluid (Table 1, Fig. 5). It revealed three main families of proteins: (1) those showing affinity for calcium and some proteoglycans which could favor mineral crystallization, (2) proteins interacting with others to biologically activate or inactivate other uterine fluid proteins or to ensure their proper folding during matrix assembly, and finally, (3) antimicrobial proteins involved in keeping the forming egg free of microbes. The following discussion focuses on these three groups of uterine fluid proteins.

4.2.1. Uterine fluid proteins associated to shell mineralization process

The first functional group is constituted by 15 proteins related to the process of shell mineralization and classified in Table 2 according to their specific overabundance at particular stages of shell calcification. Of particular interest is a major group of proteins (9/15) overabundant at the initiation of shell formation, a stage considered to be crucial for establishing the final structure of the shell (texture and ultrastructure), and consequently, determining its unique mechanical properties [2,4,5]. Four of them have been previously described as proteins playing a role in the calcification process. Ovalbumin (OVAL) and ovotransferrin (OVOT) are amongst the most abundant proteins in uterine fluid with emPAI values superior to 10. Their overabundance in uterine fluid at the initial stage was previously reported, in coherence with their demonstration in the basal part of the shell (mammillary layer) [26,32] and also with their extremely high concentration in egg white. The observation that ovalbumin and ovotransferrin bind Ca²⁺ ions and modify calcite crystal morphology in vitro [26,33-35], suggests that they might play an active role during the initial phase of shell calcification. Ovocleidin-17 (OC-17) was detected in our study with a high emPAI (53) in accordance with its elevated levels in the eggshell (40 μ g/g shell) [36] and in uterine fluid at the initial stage [7,37]. OC-17 influences calcite crystal morphology in vitro [38]. Molecular dynamic simulations have predicted that OC-17 can induce the transformation of amorphous calcium carbonate (ACC) to calcite, the crystalline calcium carbonate polymorph present in the shell [39]. OC-17 may be involved in this process, as we recently detected the presence of ACC on eggshell membranes in situ at the earliest stage of shell formation [40]. This result is also in accordance with OC-17 distribution throughout the shell matrix with a predominant concentration in mammillary bodies that make up the inner eggshell [37]. Ovocalyxin-32

shell calcification and their potential functions in uterus.							
Cluster	Symbols	Accession IDs*	Potential functions in uterus				
			Mineralization	Regulation of process	Antimicrobial		
A (2 proteins)	BPIL2, GPX3	771461, 427638			BPIL2		
B (23 proteins)	OC-17, HPX, OCX32, OVOT, EDIL3, LOC771972, SERPINF1, COL10A1, OVAL, MFGE8, OVM, LOC428451, CLU, OVST, AVD, OVAX, ABI3BP, Ig-alpha-heavy, OVAY, ACTG1, QSOX1, TPI1, LDHB	100313508, 419076, 395209, 396241, 427326, 771972, 417561, 100126150, 396058, 415494 428451, 395722, 396151, 396260, 420898, 769237, gi]5705960, 420897, 415296, 373914, 396435, 373997	OC-17 HPX OCX32 OVOT EDIL3 SERPINF1 COL10A1 OVAL MEGE8	OCX32 LOC771972 OVM LOC428451 CLU OVST	OC-17 OCX32 LOC771972 OVOT OVM OVST AVD OVAX Iz-alpha-beavy		
C (17 proteins)	SDCBP, GSN, OIH, CST3, NTM, SEMA3C, C4BPA, PSCA, EZR, FAM3D, MSLN, APOH, LOC100859272, LOC423008, AVBD10, UBB, TUBB2C	421136, 395774, 416235, 396497, 395450, 374090, 395384, 420302, 395701, 416069, 416534, 417431, 100859272, 423008, 414341, 396190, 417255	SDCBP GSN	OIH CST3 LOC- 100859272	OIH CST3 LOC-100859272 AVBD10		
D (15 proteins)	OCX21, ALB, OCX36, TSKU, Ig-gamma-heavy, SEMA3G, Ig-heavy-1, TTR, PIT54, APOA1, FOLR1, LOC100857973, GC, TUBA1C, VNN1	419515, 396197, 419289, 419088, gi 86318, 415945, gi 1741925, 396277, 395364, 396536, 395638, 100857973, 395696, gi 135393, 421702	ALB TSKU	OCX21	OCX36 Ig-gamma-heavy Ig-heavy-1 GC		
E (7 proteins)	OC-116, VTG2, HBAA, HBG2, HBAD, LRRC19, LYZ	395256, 424533, 416652, 396485, 416651, 424561, 396218	OC-116 LYZ		VTG2 LYZ		
* Accession I	Ds are Entrez Gene IDs when available	or protein sequence GI.					

Table 1 - Uterine fluid proteins in the five different clusters according to their profile abundances at the different stages of

Table 2 – Uterine fluid proteins potentially associated with the process of shell mineralization.						
Stage specificity	Symbols	Entrez Gene IDs	emPAI	Description	Other potential functions in uterus	
Initial (cluster B)	OVOT	396241	30220	Ovotransferrin, egg white protein able to modify calcite crystal morphology in shell	Antimicrobial	
	OVAL	396058	318.86	Ovalbumin, major egg white protein, interacts with calcite		
	OC-17	100313508	52.97	Ovocleidin-17, major eggshell matrix protein, interacts with calcite	Antimicrobial	
	HPX	419076	5.88	Hemopexin, binds heme and divalent ions		
	OCX32	395209	4.16	Ovocalyxin-32, eggshell matrix protein related to eggshell quality traits	Regulation of process, antimicrobial	
	SERPINF1	417561	2.60	Serpin peptidase inhibitor, member 1, glycosaminoglycans binding properties		
	EDIL3	427326	1.67	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3, calcium		
	MFGE8	415494	0.93	Milk fat globule-EGF factor 8 protein, calcium		
	COL10A1	100126150	0.47	Collagen, type X, alpha 1, fibrous protein present in eggshell membranes		
Growth	LYZ	396218	39650	Lysozyme, modifies calcite crystal morphology in shell	Antimicrobial	
(cluster E)	OC-116	395256	47.02	Ovocleidin-116, eggshell matrix protein, protein core of dermatan sulfate proteoglycan		
Growth and terminal	ALB	396197	7481.5	Albumin, plasma protein, calcium binding properties		
(cluster D)	TSKU	419088	1.34	Tsukushi small leucine rich proteoglycan homolog		
Terminal	SDCBP	421136	1.67	Syndecan binding protein, interacts with proteoglycans		
(cluster C)	GSN	395774	0.35	Gelsolin, calcium-binding protein		

(OCX32) is present in uterine fluid and eggshell [41]. A genetic correlation between ovocalyxin-32 gene polymorphism and different eggshell quality phenotypes such as crystal orientation or eggshell strength [42–46] supports its involvement in the regulation of eggshell texture.

We also paid particular attention to five additional proteins overabundant at the initial stage, three of them with emPAI > 1 in uterine fluid. Collagen-10 (COL10A1) is an eggshell membrane protein [47]. We also reported the presence of two calcium binding proteins EDIL3 and MFGE8 [48]. These calcium binding proteins (CaBPs) could interact with calcium to favor crystal nucleation or to change crystal morphology by selective interaction with certain crystallographic faces. EGF-like repeats and Discoidin I-like domain 3 protein (EDIL3) and Milk Fat Globule-EGF factor 8 protein (MFGE8) (or lactadherin) belong to the same protein family and are quite abundant in the uterine fluid (emPAI of 1.67 and 0.93). They contain respectively three and two EGF-like domains followed by two discoidin-I like domains. The two main known functions of these proteins in mammals are related to apoptotic cell clearance and angiogenesis [49,50]. The presence of active calcium binding domains, their overabundance at the initiation stage and the recent report of proteins with similar calcium binding domains as over-expressed in uterus when a shell was undergoing calcification [16] are strong evidence supporting an extracellular functional role for these proteins in the uterine fluid which requires further investigation. Hemopexin (HPX) is a heme-binding plasma glycoprotein [51] identified in our uterine fluid study as a major protein (emPAI 5.9). HPX binds divalent metal ions [52]. Hemopexin might have a similar role as ovotransferrin which is known to modify calcite crystal morphology in vitro [26]. Finally, the last protein associated with the onset of mineralization in our study is SERPINF1, a glycosaminoglycan binding protein [53]. Proteoglycans are major actors of calcification in the biomineralization process and have been detected in the chicken eggshell [54,55]. These molecules combine a protein core with negatively charged complex polysaccharides, and can interact with calcium and are suspected to play a major role in the process of shell mineralization.

We identified four additional proteins, mainly present during the active growth and terminal phases of shell calcification. Lysozyme (LYZ) and ovocleidin-116 (OC-116) were present in cluster E which is composed of proteins abundant during the active growth phase. Both were abundant in the fluid (emPAI 39650 and 47.02, respectively). OC-116, the core protein of an eggshell dermatan sulfate proteoglycan [56], is the most abundant eggshell matrix protein. Its high level is coherent with previous observations describing OC-116 as a major protein of the uterine fluid during the active growth phase and showing its presence throughout the palisade region of the shell [56]. These results are validating our quantitative proteomic approach. LYZ, as ovalbumin and ovotransferrin, has been shown to be able to modify calcite crystal morphology in vitro [57]. Albumin (ALB) is a calcium binding protein [58] with an extremely high emPAI (7482) and mainly present during active and terminal phases of calcification. Tsukushi (TSKU) belongs to the family of proteoglycan proteins containing small leucine-rich repeat [59]. This protein has a key role in coordinating multiple extracellular signaling pathways during embryonic development of chicken, frog and mouse and was recently reported as over-expressed in uterine cells when a shell is calcifying [15].

Two proteins are highly present at the terminal stage of shell mineralization. There are syndecan binding protein (SDCBP), reported as proteoglycans binding protein able to bind to syndecan, a heparan sulfate proteoglycan [60], and gelsolin (GSN) which exhibits calcium binding properties [61]. In the plasma, calcium interacts with gelsolin and induces conformational changes in its structure [62]. This protein also binds actin monomers and severs actin filaments in the presence of calcium. This contributes to actin clearance from extracellular milieu [63–65].

Our study also revealed *sentan* (SNTN) as a highly abundant uterine fluid (emPAI of 26.1). The level of this protein is not

modified throughout the shell calcification as revealed by ANOVA (p-value = 0.46). Nevertheless, sentan appears to be an important potential functional candidate which might be active at all stages of shell mineralization. This protein has been shown to join peripheral microtubules and cell membrane in multiple-ciliated epithelia and is related to the S-100 family protein that is conserved amongst vertebrates that



Fig. 5 – Classification of uterine fluid proteins according to the three stages of shell calcification and to their putative functions. Clusters emphasize the protein abundant at initial (I), growth (G), terminal (T) phases, or both growth and terminal and both initial and terminal phases of shell calcification. In silico analysis was performed to determine in each group the proteins associated to mineralization (blue), the proteins involved in the regulation of activity of proteins during mineralization (red), the antimicrobial proteins (green), and proteins with other or unknown roles (white).

have air respiration systems [66]. In common with other members of this family, it contains EF-hand calcium binding domains.

4.2.2. Proteins involved in the regulation of the activity of secreted proteins

This second group (10 proteins, five with emPAI superior to 10, Table 3) corresponds to proteins which can modify other proteins and could therefore influence their properties toward the regulation of the calcification process. The activities of the eggshell matrix proteins might rely on the interaction with these proteins of the uterine fluid which could inhibit or activate the proteins directly involved in controlling the calcification process. These proteins are mainly identified in groups associated with the onset and with the termination of mineralization (6 and 3 proteins respectively).

The function of these proteins can be classified as follows.

Proteins involved in protein-protein interactions to ensure the proper folding of eggshell matrix proteins and regulation of their activity. The current study revealed several molecular chaperones. Ovocalyxin-21 (OCX21), described in database as Gastrokine-2, is an eggshell specific matrix protein which contains a BRICHOS domain that is present in molecular chaperones [67]. This protein showed one of the highest emPAI (value of 1942) amongst proteins in our study, in agreement with its abundant presence in the soluble eggshell proteome [10] and, consequently, appears to be an important functional candidate to explore in further investigations. Clusterin (CLU) is a chaperone protein reported to prevent the premature aggregation and precipitation of eggshell matrix components before and during their assembly into the rigid protein scaffold necessary for ordered mineralization [68]. The mRNA coding for OCX21 and CLU are up-regulated in chicken uterus during eggshell calcification [15]. Molecular chaperones are proteins that assist folding or unfolding and the assembly or disassembly of macromolecular proteinaceous structures. They

prevent assembled subunits from aggregating into non-functional structures. *Clusterin* (*CLU*) is present at significantly increased levels at the initial stage, and is thus potentially involved in the onset of shell formation by regulating the assembly of matrix proteins or their interactions with the mineral phase. In contrast, *ovocalyxin-21* (*OCX21*) is highest during the active growth and terminal phases and is potentially associated with the regulation of proteins driving the active calcification and the arrest of shell formation.

Amongst such regulating proteins, proteases and protease inhibitors are involved in many biological functions including blood coagulation, cell migration and proliferation, innate defense or gamete maturation. Proteases and protease inhibitors are secreted by the hen uterus, and could control the calcification process, either by degrading proteins or by modifying the processing of precursors to mature proteins [15,16]. Our proteomic study identified seven proteins belonging to this group, four having an emPAI higher than 10. They were only present in clusters associated with the onset and the arrest of shell calcification. Ovomucoid (OVM) (emPAI 61.9) and ovoinhibitor (OIH) (emPAI 15.7) are two major egg white proteins belonging to the category of Kazal-type protease inhibitors. These domains contain six cysteine residues engaged in a specific pattern of disulfide bonding [1]. Ovocalyxin-25 (LOC771972) contains WAP and Kunitz-type protease inhibitor domains belonging to the MEROPS inhibitor database (http://merops.sanger.ac.uk) [67]. WAP domain (also called four-disulfide core) comprises eight cysteine residues involved in disulfide bonds in a conserved arrangement and exhibiting antiproteinase functions [69]. WAP four-disulfide core domain protein 2-like (LOC100859272) also contains two WAP domains. Cystatin (CST3) (emPAI 10.5) is distributed in all compartments of eggs [1] and is a cysteine protease inhibitor. Ovocalyxin-32 (OCX32) is an abundant eggshell matrix specific protein (emPAI 4.16) containing a latexin domain which is a carboxypeptidase A inhibitor [41,70].

Table 3 – Uterine fluid proteins that are proposed to regulate the activity of secreted proteins. Pro	oteins only identified in
uterine fluid but not in eggshell are underlined.	

Stage specificity	Symbols	Entrez Gene IDs	emPAI*	Description	Other potential functions in uterus	
Initial (cluster B)	OVM	416236	61.86	Ovomucoid, serine protease inhibitor, Kazal-like domains	Antimicrobial	
	LOC771972	771972	22.55	Ovocalyxin-25, eggshell matrix protein, protease inhibitor domains	Antimicrobial	
	OCX32	395209	4.16	Ovocalyxin-32, eggshell matrix protein, protease inhibitor	Mineralization, antimicrobial	
	CLU	395722	1.38	Clusterin, molecular chaperone		
	OVST	396151	0.12	Ovostatin, multi-class protease inhibitor	Antimicrobial	
	LOC428451	428451	n.d.	Prostatic acid phosphatase-like, removes a phosphate group on amino acids		
Growth and terminal (cluster D)	OCX21	419515	1942.3	Ovocalyxin-21, eggshell matrix protein, BRICHOS domain, chaperone protein		
Terminal (cluster C)	OIH	416235	15.71	Ovoinhibitor, serine protease inhibitor, Kazal-like domains	Antimicrobial	
	CST3	396497	10.50	Cystatine C, cysteine protease inhibitor	Antimicrobial	
	LOC-100859272	100859272	<u>n.d.</u>	WAP four-disulfide core domain protein 2-like, protease inhibitor	Antimicrobial	
* n.d. Not determined.						

Ovostatin (OVST) is a macroglobulin-like antiprotease able to inhibit all four classes of proteases by a unique trapping mechanism [1]. Ovostatin is present in all egg compartments.

We paid particular attention to a third family corresponding to protein kinases and phosphatases because it has previously been demonstrated that the degree of phosphorylation of osteopontin, an eggshell matrix phosphoprotein, influences the kinetics of calcium carbonate precipitation [71]. Osteopontin seems to be a major actor in shell mineralization, as unusual patterns of its expression are associated with defects in shell [5]. Furthermore, uterine osteopontin is up-regulated daily during egg calcification [15,72]. These proteins might indirectly modulate the kinetics of mineralization by controlling the degree of phosphorylation. Phosphoprotein detection required specific proteomic experiments to be detected. They were reported in an eggshell phosphoproteome survey [11]. Our proteomic investigation was not adapted to reveal phosphoproteins, and consequently, osteopontin was not detected in this study. We have identified one protein related to these activities. LOC428451 corresponds to phosphatases with the ability to remove phosphate groups. It was mainly present at the onset of calcification.

We also paid particular attention to peptidylprolyl isomerase A (PPIA) and to Phosphatidyl Ethanolamine-binding Protein 1 (PEBP1) which are abundant in the uterine fluid (emPAI of 15.01 and 4.08 respectively), but with no differential level between the three stages of shell calcification (ANOVA p-values of 0.84 and 0.96 respectively). PPIA is involved in protein folding through the process of cis-trans isomerization [73,74]. PEPB1 belongs to the Phosphatidyl Ethanolamine-binding Protein family, a highly conserved group of proteins that have been identified in organisms from bacteria to mammals. The various functions described for members of this family comprise serine protease inhibition including thrombin, neuropsin and chymotrypsin [75].

Table 4 – Uterine fluid proteins that are potentially antimicrobial. Proteins only identified in uterine fluid but not in eggshell are underlined.

Initial (cluster B) OVOT 396241 30220 Ovotrasferrin, egg white protein able to chelate ion ions Mineralization OVM 416236 61.66 Ovomucoid, serine protease inhibitor, Kazal-like domains Regulation of process OC-17 100313505 52.97 Ovocalytin-72, eggshell matrix protein, C-type lectin protein, exhibiting antimicrobial properties Mineralization LOC771972 71972 22.55 Ovocalyxin-25, eggshell matrix protein, protease inhibitor domains Regulation of process, inhibitor domains OCX32 395209 4.16 Ovocalyxin-25, eggshell matrix protein, protease inhibitor, exhibiting antibacterial properties Regulation of process, inneralization AVD 396200 2.60 Avoiln, vitamin binding protein Ovoxal yzin - Regulation of process inhibitor, exhibiting antibacterial properties Regulation of process inhibitor domains Growth (cluster J) OVST 396218 0.12 Ovostatin, multi-class protease inhibitor Hydrolyses bacterial cell wall Mineralization Hydrolyses bacterial Protein, InsP/BPI/ Hydrolyses bacterial Protein, InsP/BPI/ Hydrolyses bacterial Protein, InsP/BPI/ Hydrolyses bacterial Protein, protein, Insp./BPI/BH/ Hydrolyses bacterial Protein, protein, Insp./BPI/BH/ Hydrolyses bacterial Protein Regulation of process Hydrolyses bacterial Protein Growth and terminal (cluster D) OCX36 19289 <	Stage specificity	Symbols	Accession IDs [*]	emPAI	Description	Other potential functions in uterus
OVM 416236 61.86 Ovonucoid, serine protease inhibitor, Kazal-like domains Regulation of process protein, exhibiting antimicrobial properties COC-17 10031305 2.97 Ovoceldin-17, eggshell matrix protein, C-type lectin inhibitor domains Mineralization COC-71972 771972 22.55 Ovoceldyin-25, eggshell matrix protein, protease inhibitor domains Regulation of process, mineralization OCX32 395209 4.16 Ovocalyxin-32, eggshell matrix protein, protease inhibitor domains Regulation of process, mineralization AVD 395600 2.60 Avidin, vitamin binding protein Regulation of process, mineralization OVAX 39661 0.79 Avidin, vitamin binding protein Regulation of process, mineralization Growth (cluster E) 0VST 39651 0.12 Ovoslburin-related protein X, Serpin family member exhibiting antibacterial properties Regulation of process, mineralization Growth (cluster E) 0XST 396218 0.4 [alpha chain, fragment of immunoglobulin Mineralization Growth and terminal (cluster D) 0CX36 419289 6.5 Ovocalyxin-36, eggshell matrix protein, iron chelating Feudation of process, mineralization Growth and terminal (cluster C) 0CX36 19289 6.6 Growcalyxin-36, eggshell matrix protein, iron chelating Feudation of procesa, proteas/ comanin	Initial (cluster B)	OVOT	396241	30220	Ovotransferrin, egg white protein able to chelate iron ions	Mineralization
OC-1710031350852.97Ovocelsin-17, eggshell matrix protein, C-type letin protein, exhibiting antimicrobial propertiesMineralizationIOC77197277197222.55Ovocal yxin-25, eggshell matrix protein, protease inhibitor domainsRegulation of process, mineralizationOCX323952094.16Ovocal yxin-23, eggshell matrix protein, protease inhibitor, exhibiting antibacterial propertiesRegulation of process, mineralizationAVD OVAX3962082.60Avidin, vitamin binding protein OVAXRegulation of process, mineralizationGrowth (cluster F)396110.12Ovosaltymin-related protein X, Serpin family member exhibiting antibacterial propertiesRegulation of process, mineralizationGrowth and terminal (cluster D)39621839610Lysozyme, antimicrobial egg white protein, hydrolyses bacterial cell wallMineralizationGrowth and terminal (cluster D)OCX364192896.54Ovocalyxin-36, eggshell matrix protein, LBP/BPI/ Lysozyme, antimicrobial egg white protein, protein, protein, barlydrolyse bacterial cell wallMineralizationGrowth and terminal (cluster D)GC4192896.54Ovocalyxin-36, eggshell matrix protein, LBP/BPI/ Lysozyme, antimicrobial egg white protein, chalting protein, protein, barlydrolyse bacterial cellMineralizationGrowth and terminal (cluster D)GC192896.54Ovocalyxin-36, eggshell matrix protein, LBP/BPI/ Lysozyme, antimicrobial egg white protein, fragment of immunoglobulinRegulation of process mineralizationGrowth and terminal (cluster C)		OVM	416236	61.86	Ovomucoid, serine protease inhibitor, Kazal-like domains	Regulation of process
LOC771972 771972 22.55 Ovocalyxin-25, eggshell matrix protein, protease inhibitor domains Regulation of process inhibitor domains OCX32 395209 4.16 Ovocalyxin-32, eggshell matrix protein, protease inhibitor, exhibiting antibacterial properties Regulation of process, mineralization AVD 396260 2.60 Avidin, vitamin binding protein Regulation of process, mineralization OVAX 420898 0.79 Ovalbumin-related protein X, Serpin family member exhibiting antibacterial properties Regulation of process Growth Ig-alpha-heavy (cluster E) 396150 0.12 Ovosatin, multi-class protease inhibitor Regulation of process Growth and termina (cluster D) OCX36 419289 6.54 Ovocalyxin-36, eggshell matrix protein, iron chelating properties Mineralization Growth and termina (cluster D) OCX36 419289 6.54 Ovocalyxin-36, eggshell matrix protein, LBP/BPI/		OC-17	100313508	52.97	Ovocleidin-17, eggshell matrix protein, C-type lectin protein, exhibiting antimicrobial properties	Mineralization
OCX323952094.16Ovocalyxin-32, eggshell matrix protein, protease inhibitor, exhibiting antibacterial properties mineralizationRegulation of process, mineralizationAVD3962602.60Avidin, vitamin binding protein ovalbumin-related protein X, Serpin family member exhibiting antibacterial propertiesRegulation of process mineralizationOVAX4208980.79Ovalbumin-related protein X, Serpin family member exhibiting antibacterial propertiesRegulation of processOVST3961510.12Ovostatin, multi-class protease inhibitorRegulation of processGrowthIYZ3962180.12Ovostatin, multi-class protease inhibitorRegulation of process(cluster E)VTG24245330.73Vitellogenin 2, egg-yolk protein, iron chelating propertiesMineralization(cluster D)OCX364192896.54Ovocalyxin-36, eggshell matrix protein, LBP/BPI/ PLUNC superfamily, antibacterial		LOC771972	771972	22.55	Ovocalyxin-25, eggshell matrix protein, protease inhibitor domains	Regulation of process
AVD OVAX996260 420892.60Avidin, vitamin binding protein Ovalbumin-related protein X, Serpin family member exhibiting antibacterial propertiesOVAX4208980.79Ovalbumin-related protein X, Serpin family member exhibiting antibacterial propertiesOVST3961510.12Ovostatin, multi-class protease inhibitorRegulation of processIg-alpha-heavy (cluster E)gj570590n.d.Ig alpha chain, fragment of immunoglobulin hydrolyses bacterial cell wallMineralization hydrolyses bacterial cell wallGrowth and termina (cluster D)OCX364245330.73Vitellogenin 2, egg-yolk protein, iron chelating propertiesGrowth and termina (cluster D)OCX363956960.54Ovocalyxin-36, eggshell matrix protein, LBP/BPI/ protein/, potentially antibacterialIg-gamma-heavy (cluster D)gj86318n.d.Ig gamma chain, fragment of immunoglobulin protein/, potentially antibacterialIg-gamma-heavy (cluster C)gj86318n.d.Ig gamma chain, fragment of immunoglobulin immunoglobulin heavy chain, fragment of immunoglobulinTerminal (cluster C)OIH41623515.71Ovoinhibitor, serine protease inhibitor, Kazal-like domains, antibacterial proteiaRegulation of process domains, antibacterial proteinTerminal (cluster A)ID-01085927210859272n.d.ViAP four-disulfide core domain protein 2-like, protease inhibitorRegulation of process protease domains, antibacterial proteinTerminal (cluster A)BPIL27714612.63Katericidal/permeability-increas		OCX32	395209	4.16	Ovocalyxin-32, eggshell matrix protein, protease inhibitor, exhibiting antibacterial properties	Regulation of process, mineralization
OVAX4208980.79Ovalbumin-related protein X, Serpin family member exhibiting antibacterial propertiesOVST3961510.12Ovostatin, multi-class proteases inhibitorRegulation of processIg-alpha-heavy (cluster E)39621839650Ig alpha chain, fragment of immunoglobulin Lysozyme, antimicrobial egg white protein, hydrolyses bacterial cell wallMineralizationGrowth (cluster E)VTG24245330.73Vitellogenin 2, egg-yolk protein, iron chelating propertiesMineralizationGrowth and terminal 		AVD	396260	2.60	Avidin, vitamin binding protein	
OVST Ig-alpha-heavy (cluster E)3961510.12Ovostatin, multi-class protease inhibitorRegulation of processGrowth (cluster E)IVZ39621839650Ig alpha chain, fragment of immunoglobulin hydrolyses bacterial cell wallMineralizationVTG24245330.73Vitellogenin 2, egg-yolk protein, iron chelating propertiesMineralizationGrowth and terminal (cluster D)OCX364192896.54Ovocalyxin-36, eggshell matrix protein, LBP/BPI/ PLUNC superfamily, antibacterialVitel openin 2, egg-yolk protein, iron chelating propertiesGrowth and terminal (cluster D)GC3956964.59Group-specific component (vitamin D binding protein), potentially antibacterialIg-gamma-heavy (cluster C)gilg8318n.d.Ig gamma chain, fragment of immunoglobulin munoglobulinRegulation of processTerminal (cluster C)OIH4162515.71Ovoinhibitor, serine protease inhibitor, Kazal-like aminoglobulinRegulation of processTerminal (cluster C)Ser543969710.50Cystatine C, cysteine protease inhibitor, Kazal-like protein, bordeni suntibacterial pertideRegulation of processTerminal (cluster A)OIM4143410.50Avian beta defensin 10, small cationic antibacterial protein-like 2, proteise inhibitorRegulation of processTerminal (cluster A)BPIL27714612.63Bactericidal/permeability-increasing protein-like 2, member of the LBP/BIP/LUNC superfamilyRegulation of process		OVAX	420898	0.79	Ovalbumin-related protein X, Serpin family member exhibiting antibacterial properties	
Ig-alpha-heav Crowth (cluster E)Ig-alpha-heavy JYZgij570590 		OVST	396151	0.12	Ovostatin, multi-class protease inhibitor	Regulation of process
Growth (cluster E)LYZ39621839650Lysozyme, antimicrobial egg white protein, hydrolyses bacterial cell wallMineralization(cluster E)VTG24245330.73Vitellogenin 2, egg-yolk protein, iron chelating propertiesFranceGrowth and terminal (cluster D)OCX364192896.54Ovocalysin-36, eggshell matrix protein, LBP/BPI/ PLUNC superfamily, antibacterialFranceGC3956964.59Group-specific component (vitamin D binding protein), potentially antibacterialFranceIg-gamma-heavy (cluster C)gil8618n.d.Ig gamma chain, fragment of immunoglobulin immunoglobulinFranceTerminal (cluster C)OIH41623515.71Ovoinhibitor, serine protease inhibitor, Kazal-like domains, antibacterialRegulation of process domains, antibacterialTerminal (cluster C)CST339649710.50Cystatine C, cysteine protease inhibitor wPtideRegulation of process protease inhibitorInitial and terminal (cluster A)BPIL27714612.63Bactericidal/permeability-increasing protein-like 2, member of the LBP/BIP/PLUNC superfamilyRegulation of process protease inhibitor		Ig-alpha-heavy	gi 5705960	<u>n.d.</u>	Ig alpha chain, fragment of immunoglobulin	
VTG2V2G2V245330.73Vitellogenin 2, egg-yolk protein, iron chelating propertiesGrowth and terminal (cluster D)OCX364192896.54Ovocalyxin-36, eggshell matrix protein, LBP/BPI/ PUNC superfamily, antibacterialGC3956964.59Group-specific component (vitamin D binding protein), potentially antibacterialIg-gamma-heavy (gl-heavy-1)gil8318n.d.Ig gamma chain, fragment of immunoglobulin immunoglobulin lap-heavy-1Terminal (cluster C)OIH41623515.71Ovoinhibitor, serine protease inhibitor, Kazal-like domains, antibacterialRegulation of process domains, antibacterialTerminal (cluster C)CST339649710.50Cystatine C, cysteine protease inhibitor peptideRegulation of process domains, antibacterialInitial and terminal (cluster A)BPIL27714612.63Bactericidal/permeability-increasing protein-like 2, member of the LBP/BIP/PLUNC superfamilyRegulation of process protease inhibitor	Growth (cluster E)	LYZ	396218	39650	Lysozyme, antimicrobial egg white protein, hydrolyses bacterial cell wall	Mineralization
Growth and terminal (cluster D)OCX364192896.54Ovocalyxin-36, eggshell matrix protein, LBP/BPI/ PLUNC superfamily, antibacterial PCUNC superfamily, antibacterial protein), potentially antibacterial Ig-gamma-heavy Ig-heavy-1GC3956964.59Group-specific component (vitamin D binding 		VTG2	424533	0.73	Vitellogenin 2, egg-yolk protein, iron chelating properties	
GC 395696 4.59 Group-specific component (vitamin D binding protein), potentially antibacterial Ig-gamma-heavy gi 86318 n.d. Ig gamma chain, fragment of immunoglobulin Ig-heavy-1 gi 1741925 n.d. Immunoglobulin heavy chain, fragment of immunoglobulin Terminal (cluster C) OIH 416235 15.71 Ovoinhibitor, serine protease inhibitor, Kazal-like domains, antibacterial Regulation of process domains, antibacterial CST3 396497 10.50 Cystatine C, cysteine protease inhibitor antibacterial Regulation of process domains, antibacterial LOC-100859272 10.0859272 n.d. WAP four-disulfide core domain protein 2-like, protease inhibitor Regulation of process protease inhibitor Initial and terminal (cluster A) BPIL2 771461 2.63 Bactericidal/permeability-increasing protein-like 2, member of the LBP/BIP/PLUNC superfamily Kegulation of process protease inhibitor	Growth and terminal (cluster D)	OCX36	419289	6.54	Ovocalyxin-36, eggshell matrix protein, LBP/BPI/ PLUNC superfamily, antibacterial	
Ig-gamma-heavy gi]86318 n.d. Ig gamma chain, fragment of immunoglobulin Ig-heavy-1 gi]1741925 n.d. Immunoglobulin heavy chain, fragment of immunoglobulin Terminal OIH 416235 15.71 Ovoinhibitor, serine protease inhibitor, Kazal-like domains, antibacterial Regulation of process (cluster C) CST3 396497 10.50 Cystatine C, cysteine protease inhibitor antibacterial Regulation of process AVBD10 414341 0.50 Avian beta defensin 10, small cationic antibacterial Regulation of process Initial and terminal BPIL2 771461 2.63 Bactericidal/permeability-increasing protein-like 2, member of the LBP/BIP/PLUNC superfamily Kegulation of process		GC	395696	4.59	Group-specific component (vitamin D binding protein), potentially antibacterial	
Ig-heavy-1 gil741925 n.d. Immunoglobulin heavy chain, fragment of immunoglobulin Terminal (cluster C) OIH 416235 15.71 Ovoinhibitor, serine protease inhibitor, Kazal-like domains, antibacterial Regulation of process domains, antibacterial CST3 396497 10.50 Cystatine C, cysteine protease inhibitor Regulation of process domains, antibacterial AVBD10 414341 0.50 Avian beta defensin 10, small cationic antibacterial peptide LOC-100859272 100859272 n.d. WAP four-disulfide core domain protein 2-like, protease inhibitor Regulation of process protease inhibitor Initial and terminal (cluster A) BPIL2 771461 2.63 Bactericidal/permeability-increasing protein-like 2, member of the LBP/BIP/PLUNC superfamily		Ig-gamma-heavy	gi 86318	n.d.	Ig gamma chain, fragment of immunoglobulin	
Terminal (cluster C) OIH 416235 15.71 Ovoinhibitor, serine protease inhibitor, Kazal-like domains, antibacterial Regulation of process CST3 396497 10.50 Cystatine C, cysteine protease inhibitor Regulation of process AVBD10 414341 0.50 Avian beta defensin 10, small cationic antibacterial peptide Regulation of process LOC-100859272 100859272 n.d. WAP four-disulfide core domain protein 2-like, protease inhibitor Regulation of process Initial and terminal (cluster A) BPIL2 771461 2.63 Bactericidal/permeability-increasing protein-like 2, member of the LBP/BIP/PLUNC superfamily Kegulation of the LBP/BIP/PLUNC superfamily		Ig-heavy-1	gi 1741925	n.d.	Immunoglobulin heavy chain, fragment of immunoglobulin	
CST3 396497 10.50 Cystatine C, cysteine protease inhibitor Regulation of process AVBD10 414341 0.50 Avian beta defensin 10, small cationic antibacterial peptide LOC-100859272 100859272 n.d. WAP four-disulfide core domain protein 2-like, protease inhibitor Regulation of process Initial and terminal (cluster A) BPIL2 771461 2.63 Bactericidal/permeability-increasing protein-like 2, member of the LBP/BIP/PLUNC superfamily Kegulation of process	Terminal (cluster C)	OIH	416235	15.71	Ovoinhibitor, serine protease inhibitor, Kazal-like domains, antibacterial	Regulation of process
AVBD10 414341 0.50 Avian beta defensin 10, small cationic antibacterial peptide LOC-100859272 100859272 n.d. WAP four-disulfide core domain protein 2-like, protease inhibitor Initial and terminal (cluster A) BPIL2 771461 2.63 Bactericidal/permeability-increasing protein-like 2, member of the LBP/BIP/PLUNC superfamily		CST3	396497	10.50	Cystatine C, cysteine protease inhibitor	Regulation of process
LOC-100859272 100859272 n.d. WAP four-disulfide core domain protein 2-like, protease inhibitor Initial and terminal BPIL2 771461 2.63 Bactericidal/permeability-increasing protein-like 2, member of the LBP/BIP/PLUNC superfamily		AVBD10	414341	0.50	Avian beta defensin 10, small cationic antibacterial peptide	
Initial and terminal (cluster A) BPIL2 771461 2.63 Bactericidal/permeability-increasing protein-like 2, member of the LBP/BIP/PLUNC superfamily		LOC-100859272	100859272	<u>n.d.</u>	WAP four-disulfide core domain protein 2-like, protease inhibitor	Regulation of process
	Initial and terminal (cluster A)	BPIL2	771461	2.63	Bactericidal/permeability-increasing protein-like 2, member of the LBP/BIP/PLUNC superfamily	

Accession IDs are Entrez Gene IDs when available or protein sequence GI. n.d. Not determined.

4.2.3. Antimicrobial uterine fluid proteins

The egg remains sterile in the oviduct during its formation in the lumen of the organ due to the presence in the uterine fluid of numerous antimicrobial proteins [1] which protect the egg before the hard eggshell is complete. These protective molecules correspond to a third group of proteins (Table 4), and are secreted by the uterine cells in accordance with previous observations [15,16]. Antimicrobial proteins are incorporated into the shell and are not likely to be effective in their soluble form. However, they might be dissolved later during embryonic development, and regain their protective function.

Therefore, it is not surprising that the 20 uterine fluid proteins that are potentially antimicrobial are widely present in all clusters and could protect the egg during all phases of shell construction. Egg antimicrobial proteins have been previously classified in various categories, according to their mode of antimicrobial action (immunoglobulins, molecules degrading microbial components, those reducing availability of nutrients for bacteria and proteases) [1]. These groups were all observed in this study.

The uterine fluid contains only a few representatives of the adaptive humoral response as only three different proteins derived from heavy and light chains of immunoglobulins were observed (Ig-gamma-heavy, Ig-heavy-1, Ig-alpha-heavy). In contrast, the uterine fluid contains numerous proteins of the innate molecular system. One category of them corresponded to proteins degrading microbial components. Lysozyme (LYZ) is a key factor of the egg natural defense system against bacterial aggression in the egg white. It is well known for its antibacterial properties, due to its ability to hydrolyze 1,4-beta-linkages between N-acetylmuramic acid and N-acetyl-D-glucosamine residues in peptidoglycans of Gram-positive bacteria [76]. It shows the highest emPAI (39650). We confirmed in this study the presence of avian β -defensin-10 (AVBD10) reported in the shell by proteomic approach [10]. Avian β -defensins are small cationic peptides with a three-stranded β -sheet structure connected with a β -hairpin loop that protects against Grampositive and Gram-negative bacteria [77,78].

Lipopolysaccharide Binding (LBP) and Bactericidal Permeability Increasing (BPI) proteins are well known in mammals for their involvement in defense against bacteria. Ovocalyxin-36 (OCX36) belongs to the group of Lipopolysaccharide Binding (LBP) and Bactericidal-Permeability Increasing (BPI) proteins. It showed the highest emPAI in the cluster corresponding to active growth and terminal calcification phases in agreement with its strong up-regulation during shell calcification [27,79]. This protein belongs to the BPI fold superfamily containing PLUNC/PSP/BSP30/SMGB proteins [80]. Members of the LBP/BPI family bind to the lipid A portion of lipopolysaccharide cell wall in Gram-negative bacteria, leading to the death of bacteria. Pure OCX36 extracted from eggshell membranes binds to lipopolysacharide (LPS) from E. coli and possesses antibacterial activities [81]. BPI-like-2 (BPIL2), another member of the LBP/BPI/ PLUNC-like superfamily [79], was not previously identified in the shell. It shows a high emPAI and is highly abundant at both initial and terminal shell calcification phases in the uterine fluid.

Ovocleidin-17 (OC-17) is largely present at the initial stage of calcification in uterine fluid. Purified OC-17 has shown bactericidal effects against Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa [82]. Ovalbumin-related protein X (OVAX) is a member of the ovalbumin family present in the egg white at a level corresponding to 1% of that of ovalbumin, the most abundant egg white protein. Egg white OVAX was recently characterized as a heparin-binding protein exhibiting antimicrobial activities against Listeria monocytogenes and Salmonella enteritidis [83], in contrast to ovalbumin which showed no antimicrobial activity. OVAX is quite abundant in the uterine fluid at the initial stage of shell calcification.

An additional subgroup of antibacterial components of the uterine fluid corresponded to proteins which affect growth and survival of bacteria by binding iron or vitamins, thus diminishing the bioavailability of these nutrients for microorganisms. Ovotransferrin (OVOT) was the second major protein present at the initiation of mineralization in the uterine fluid. It chelates iron which is essential for bacterial growth. It is also a major egg white protein with a wide range of antimicrobial activities (antibacterial, antiviral, antifungal) [84]. A similar role is suspected for vitellogenin-2 (VTG2) which is largely present during the active growth phase in the uterine fluid. We additionally identified two potential antimicrobial proteins that could act by chelation of vitamins. Avidin (AVD), a major egg white and vitelline membrane protein which has a high affinity for biotin. It was highly present in the uterine fluid at the initial stage of shell calcification. Another protein involved in providing vitamins to the egg, the vitamin D binding protein (GC), was present at both growth and terminal phases (cluster D).

Most microorganisms secrete proteases which can hydrolyze host proteins to inactivate them or to facilitate their assimilation by microorganisms as nutrients. Therefore, protease inhibitors have an antibacterial role by limiting the deleterious activity of exogenous bacterial proteases [1]. Five antiproteases were present in the uterine fluid at high concentration. Ovomucoid (OVM), ovocalyxin-25 (LOC771972) and ovocalyxin-32 (OCX32) are mainly present at the initial stage. Ovocalyxin-32 is an eggshell specific protein (see above [41]), and has been shown to reduce B. subtilis growth [70]. Ovoinhibitor (OIH) and cystatin C (CST3) are observed in the terminal phase of calcification. Ovoinhibitor is a major egg white protein of the Kazal-type of protease inhibitors showing antimicrobial activity against Bacillus thuringiensis, an example of a bacterium which facilitates tissue invasion by secreting a protease [85]. A similar role can be suspected for the two additional protease inhibitors identified in this study, albeit at low levels (WAP four-disulfide core domain protein 2-like (LOC100859272) and ovostatin (OVST)).

5. Conclusion

This study reported here highlights 308 uterine fluid proteins and quantifies the changes in the abundance of 64 major uterine fluid proteins according to three progressive stages of eggshell biomineralization. This approach, combined with the estimation of protein levels using the emPAI, prioritizes the hundreds of proteins recently identified in the eggshell according to our hypothesis that the most abundant proteins are those that are most likely to strongly influence shell formation. Hierarchical clustering analysis allowed the determination of different protein profile abundances at different stages of shell biomineralization. This study assigns uterine fluid proteins into three main functional groups. The first group of proteins is directly involved in the process of eggshell mineralization. These proteins (15 including six with emPAI > 10) predominate at the initial stage corresponding to the first events of nucleation. This stage influences the calcite crystal orientation and hence the resulting structure of the shell, and will require further study in order to fully appreciate its impact. Amongst them are three highly abundant proteins (OVOT, OVAL and OC-17) and two calcium binding proteins (EDIL3 and MFGE8) which are promising candidates to play this role. Secondly, we hypothesized that proteins of the uterine fluid can indirectly influence the mineralization process by interaction with additional proteins and by regulating their activity during the process of mineralization. We observed that these proteins were mainly secreted during the initiation and the arrest of shell calcification. Seven protease inhibitors and two chaperone proteins predominated in this group. Ovocalyxin-21, a major eggshell protein, is of particular interest. Finally, the uterine fluid contains numerous antimicrobial proteins (five with emPAI > 10) that would exert antimicrobial protection in the forming egg. They were widely represented at all stages of shell calcification. This study identifies a limited group of proteins, according to relative abundance, amongst the very large group of candidate proteins revealed by numerous proteomic studies on eggshell [10-14,28]. Further experiments will be necessary to analyze the biological activities of the purified proteins. This experimental approach will be completed by quantifying matrix proteins deposited in the eggshell at different time points during its formation.

Conflict of interest

Authors claim no conflict of interest.

Acknowledgments

This research was funded by the French National Research Agency ANR (ANR-13-BSV6-0007-01 and ANR-13-BSV6-0007-02). The high resolution mass spectrometer was financed (SMHART project) by the European Regional Development Fund (ERDF), the Conseil Régional du Centre, the French National Institute for Agricultural Research (INRA) and the French National Institute of Health and Medical Research (Inserm).

The authors are grateful to the experimental units (UE-PEAT) for the care of birds, and to the GenoToul bioinformatics platform Toulouse Midi-Pyrenees for providing help and/or computing and/or storage resources. The authors thank and acknowledge Dr. Maxwell Hincke, University of Ottawa for a critical reading of the manuscript.

REFERENCES

 Réhault-Godbert S, Hervé V, Gautron J, Cabau C, Nys Y. Molecules involved in chemical defence of the chicken egg. In: Nys Y, Bain M, Van Immerseel F, editors. Improving the safety and quality of eggs and egg products. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2011. p. 183–208.

- [2] Nys Y, Gautron J, Garcia-Ruiz JM, Hincke MT. Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. C R Palevol 2004;3:549–62.
- [3] Hincke MT, Nys Y, Gautron J, Mann K, Rodriguez-Navarro AB, McKee MD. The eggshell: structure, composition and mineralization. Front Biosci 2012;17:1266–80.
- [4] Gautron J, Nys Y. Function of eggshell matrix proteins. In: Huopalahti R, Lopez-Fandino R, Anton M, Schade R, editors. Bioactive egg compounds. Germany: Springer-Verlag; 2007. p. 109–15.
- [5] Hincke MT, Nys Y, Gautron J. The role of matrix proteins in eggshell formation. J Poult Sci 2010;47:208–19.
- [6] Nys Y, Zawadzki J, Gautron J, Mills AD. Whitening of brown-shelled eggs: mineral composition of uterine fluid and rate of protoporphyrin deposition. Poult Sci 1991;70: 1236–45.
- [7] Gautron J, Hincke MT, Nys Y. Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens. Connect Tissue Res 1997;36:195–210.
- [8] Gautron J, Nau F, Mann K, Guerin-Dubiard C, Rehault S, Hincke MT, et al. Molecular approaches for the identification of novel egg components. Worlds Poult Sci J 2007;63:82–90.
- [9] Gautron J, Réhault-Godbert S, Nys Y. Use of high-throughput technology to identify new egg components. In: Nys Y, Bain M, Van Immerseel F, editors. Improving the safety and quality of eggs and egg products. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2011. p. 133–50.
- [10] Mann K, Macek B, Olsen JV. Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer. Proteomics 2006;6:3801–10.
- [11] Mann K, Olsen JV, Macek B, Gnad F, Mann M. Phosphoproteins of the chicken eggshell calcified layer. Proteomics 2007;7:106–15.
- [12] Miksik I, Eckhardt A, Sedlakova P, Mikulikova K. Proteins of insoluble matrix of avian (Gallus gallus) eggshell. Connect Tissue Res 2007;48:1–8.
- [13] Miksik I, Sedlakova P, Lacinova K, Pataridis S, Eckhardt A. Determination of insoluble avian eggshell matrix proteins. Anal Bioanal Chem 2010;397:205–14.
- [14] Rose-Martel M, Du JW, Hincke MT. Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle. J Proteomics 2012;75:2697–706.
- [15] Brionne A, Nys Y, Hennequet-Antier C, Gautron J. Hen uterine gene expression profiling during eggshell formation reveals putative proteins involved in the supply of minerals or in the shell mineralization process. BMC Genomics 2014;15:220.
- [16] Jonchere V, Rehault-Godbert S, Hennequet-Antier C, Cabau C, Sibut V, Cogburn LA, et al. Gene expression profiling to identify eggshell proteins involved in physical defense of the chicken egg. BMC Genomics 2010;11:57.
- [17] Nahnsen S, Bielow C, Reinert K, Kohlbacher O. Tools for label-free peptide quantification. Mol Cell Proteomics 2013; 12:549–56.
- [18] Labas V, Grasseau I, Cahier K, Gargaros A, Harichaux G, Teixeira-Gomes AP, et al. Qualitative and quantitative peptidomic and proteomic approaches to phenotyping chicken semen. J Proteomics 2014. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.</u> jprot.2014.07.024 [in press].
- [19] Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. Anal Chem 2002;74:5383–92.
- [20] Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. Anal Chem 2003;75:4646–58.
- [21] Vizcaino JA, Deutsch EW, Wang R, Csordas A, Reisinger F, Rios D, et al. ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. Nat Biotechnol 2014;32:223–6.
- [22] Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li WZ, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Mol Syst Biol 2011;7.
- [23] Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST plus: architecture and applications. BMC Bioinforma 2009;10.
- [24] Marie P, Labas V, Brionne A, Harichaux G, Hennequet-Antier C, Nys Y, et al. Data set for the proteomic inventory and quantitative analysis of chicken uterine fluid during eggshell biomineralization. Data Brief 2014 [in press].
- [25] Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. Biotechniques 2003;34:374.
- [26] Gautron J, Hincke MT, Panheleux M, Garcia-Ruiz JM, Boldicke T, Nys Y. Ovotransferrin is a matrix protein of the hen eggshell membranes and basal calcified layer. Connect Tissue Res 2001;42:255–67.
- [27] Gautron J, Murayama E, Vignal A, Morisson M, McKee MD, Rehault S, et al. Cloning of ovocalyxin-36, a novel chicken eggshell protein related to lipopolysaccharide-binding proteins, bactericidal permeability-increasing proteins, and PLUNC family proteins. J Biol Chem 2007;282:5273–86.
- [28] Sun C, Xu G, Yang N. Differential label-free quantitative proteomic analysis of avian eggshell matrix and uterine fluid proteins associated with eggshell mechanical property. Proteomics 2013;13:3523–36.
- [29] Jonchere V, Brionne A, Gautron J, Nys Y. Identification of uterine ion transporters for mineralisation precursors of the avian eggshell. BMC Physiol 2012;12:10.
- [30] Panheleux M, Nys Y, Williams J, Gautron J, Boldicke T, Hincke MT. Extraction and quantification by ELISA of eggshell organic matrix proteins (ovocleidin-17, ovalbumin, ovotransferrin) in shell from young and old hens. Poult Sci 2000;79:580–8.
- [31] Miksik I, Charvatova J, Eckhardt A, Deyl Z. Insoluble eggshell matrix proteins — their peptide mapping and partial characterization by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. Electrophoresis 2003;24:843–52.
- [32] Hincke MT. Ovalbumin is a component of the chicken eggshell matrix. Connect Tissue Res 1995;31:227–33.
- [33] Wang XQ, Wu CM, Tao K, Zhao K, Wang JQ, Xu H, et al. Influence of ovalbumin on CaCO(3) precipitation during in vitro biomineralization. J Phys Chem B 2010;114:5301–8.
- [34] Schwahn D, Balz M, Tremel W. Crystallization of the CaCO(3) mineral in the presence of the protein ovalbumin. Phys B 2004;350:E947–9.
- [35] Pipich V, Balz M, Wolf SE, Tremel W, Schwahn D. Nucleation and growth of CaCO(3) mediated by the egg-white protein ovalbumin: a time-resolved in situ study using small-angle neutron scattering. J Am Chem Soc 2008; 130:6879–92.
- [36] Mann K, Hincke MT, Nys Y. Isolation of ovocleidin-116 from chicken eggshells, correction of its amino acid sequence and identification of disulfide bonds and glycosylated Asn. Matrix Biol 2002;21:383–7.
- [37] Hincke MT, Tsang CP, Courtney M, Hill V, Narbaitz R. Purification and immunochemistry of a soluble matrix protein of the chicken eggshell (ovocleidin 17). Calcif Tissue Int 1995;56:578–83.
- [38] Reyes-Grajeda JP, Moreno A, Romero A. Crystal structure of ovocleidin-17, a major protein of the calcified Gallus gallus eggshell — implications in the calcite mineral growth pattern. J Biol Chem 2004;279:40876–81.
- [39] Freeman CL, Harding JH, Quigley D, Rodger PM. Simulations of ovocleidin-17 binding to calcite surfaces and its implications for eggshell formation. J Phys Chem C 2011;115: 8175–83.

- [40] Rodriguez-Navarro AB, Marie P, Nys Y, Hincke MT, Gautron J. Amorphous calcium carbonate controls avian eggshell mineralization: a new paradigm for understanding rapid eggshell calcification. J Struct Biol 2014 [submitted for publication].
- [41] Gautron J, Hincke MT, Mann K, Panheleux M, Bain M, McKee MD, et al. Ovocalyxin-32, a novel chicken eggshell matrix protein — isolation, amino acid sequencing, cloning, and immunocytochemical localization. J Biol Chem 2001;276: 39243–52.
- [42] Dunn IC, Joseph NT, Bain M, Edmond A, Wilson PW, Milona P, et al. Polymorphisms in eggshell organic matrix genes are associated with eggshell quality measurements in pedigree Rhode Island Red hens. Anim Genet 2009;40:110–4.
- [43] Dunn IC, Rodriguez-Navarro AB, McDade K, Schmutz M, Preisinger R, Waddington D, et al. Genetic variation in eggshell crystal size and orientation is large and these traits are correlated with shell thickness and are associated with eggshell matrix protein markers. Anim Genet 2012;43:410–8.
- [44] Takahashi H, Yang D, Sasaki O, Furukawa T, Nirasawa K. Mapping of quantitative trait loci affecting eggshell quality on chromosome 9 in an F-2 intercross between two chicken lines divergently selected for eggshell strength. Anim Genet 2009;40:779–82.
- [45] Fulton JE, Soller M, Lund AR, Arango J, Lipkin E. Variation in the ovocalyxin-32 gene in commercial egg-laying chickens and its relationship with egg production and egg quality traits. Anim Genet 2012;43:102–13.
- [46] Takahashi H, Sasaki O, Nirasawa K, Furukawa T. Association between ovocalyxin-32 gene haplotypes and eggshell quality traits in an F-2 intercross between two chicken lines divergently selected for eggshell strength. Anim Genet 2010; 41:541–4.
- [47] Arias JL, Nakamura O, Fernandez MS, Wu JJ, Knigge P, Eyre DR, et al. Role of type X collagen on experimental mineralization of eggshell membranes. Connect Tissue Res 1997;36:21–33.
- [48] Schurpf T, Chen Q, Liu JH, Wang R, Springer TA, Wang JH. The RGD finger of Del-1 is a unique structural feature critical for integrin binding. FASEB J 2012;26:3412–20.
- [49] Fan YF, Zhu W, Yang M, Zhu YQ, Shen FX, Hao Q, et al. Del-1 gene transfer induces cerebral angiogenesis in mice. Brain Res 2008;1219:1–7.
- [50] Raymond A, Ensslin MA, Shur BD. SED1/MFG-E8: a bi-motif protein that orchestrates diverse cellular interactions. J Cell Biochem 2009;106:957–66.
- [51] Delanghe JR, Langlois MR. Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine. Clin Chim Acta 2001;312:13–23.
- [52] Mauk MR, Rosell FI, Lelj-Garolla B, Moore GR, Mauk AG. Metal ion binding to human hemopexin. Biochemistry 2005;44:1864–71.
- [53] Alberdi E, Hyde CC, Becerra SP. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) binds to glycosaminoglycans: analysis of the binding site. Biochemistry 1998;37:10643–52.
- [54] Fernandez MS, Araya M, Arias JL. Eggshells are shaped by a precise spatio-temporal arrangement of sequentially deposited macromolecules. Matrix Biol 1997;16:13–20.
- [55] Fernandez MS, Moya A, Lopez L, Arias JL. Secretion pattern, ultrastructural localization and function of extracellular matrix molecules involved in eggshell formation. Matrix Biol 2001;19:793–803.
- [56] Hincke MT, Gautron J, Tsang CPW, McKee MD, Nys Y. Molecular cloning and ultrastructural localization of the core protein of an eggshell matrix proteoglycan, ovocleidin-116. J Biol Chem 1999;274:32915–23.
- [57] Hincke MT, Gautron J, Panheleux M, Garcia-Ruiz J, McKee MD, Nys Y. Identification and localization of lysozyme as a component of eggshell membranes and eggshell matrix. Matrix Biol 2000;19:443–53.

- [58] Kraghhansen U, Vorum H. Quantitaive analyses of the interaction between calcium ions and human serum albumin. Clin Chem 1993;39:202–8.
- [59] Dellett M, Hu W, Papadaki V, Ohnuma S-i. Small leucine rich proteoglycan family regulates multiple signalling pathways in neural development and maintenance. Dev Growth Differ 2012;54:327–40.
- [60] Grootjans JJ, Zimmermann P, Reekmans G, Smets A, Degeest G, Durr J, et al. Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94: 13683–8.
- [61] Chumnarnsilpa S, Loonchanta A, Xue B, Choe H, Urosev D, Wang H, et al. Calcium ion exchange in crystalline gelsolin. J Mol Biol 2006;357:773–82.
- [62] Kinosian HJ, Newman J, Lincoln B, Selden LA, Gershman LC, Estes JE. Ca²⁺ regulation of gelsolin activity: binding and severing of F-actin. Biophys J 1998;75:3101–9.
- [63] Lind SE, Smith DB, Janmey PA, Stossel TP. Role of plasma gelsolin and the vitamin-D-binding properties in clearing actin from the circulation. J Clin Invest 1986;78:736–42.
- [64] Janmey PA, Stossel TP, Lind SE. Sequential binding of actin monomers to plasma gelsolin and its inhibition by vitamin-D-binding protein. Biochem Biophys Res Commun 1986;136:72–9.
- [65] Chaponnier C, Janmey PA, Yin HL. The actin filament severing domain of plasma gelsolin. J Cell Biol 1986;103: 1473–81.
- [66] Kubo A, Yuba-Kubo A, Tsukita S, Tsukita S, Amagai M. Sentan: a novel specific component of the apical structure of vertebrate motile cilia. Mol Biol Cell 2008;19:5338–46.
- [67] Gautron J, Nys Y. Eggshell matrix proteins. In: Huopalahti R, Lopez-Fandino R, Anton M, Schade R, editors. Bioactive egg compounds; 2007. p. 103–8.
- [68] Mann K, Gautron J, Nys Y, McKee MD, Bajari T, Schneider WJ, et al. Disulfide-linked heterodimeric clusterin is a component of the chicken eggshell matrix and egg white. Matrix Biol 2003;22:397–407.
- [69] Ranganathan S, Simpson KJ, Shaw DC, Nicholas KR. The whey acidic protein family: a new signature motif and three-dimensional structure by comparative modeling. J Mol Graph 1999;17:106–13.
- [70] Xing J, Wellman-Labadie O, Gautron J, Hincke MT. Recombinant eggshell ovocalyxin-32: expression, purification and biological activity of the glutathione S-transferase fusion protein. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2007;147: 172–7.
- [71] Hincke MT, St Maurice M. Phosphorylation-dependent modulation of calcium carbonate precipitation by chicken eggshell matrix proteins. In: Goldberg M, Boskey A, Robinson C, editors. Chemistry and biology of mineralized tissues.

Rosemont, IL 60018: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2000. p. 13–7.

- [72] Lavelin I, Yarden N, Ben-Bassat S, Bar A, Pines M. Regulation of osteopontin gene expression during egg shell formation in the laying hen by mechanical strain. Matrix Biol 1998;17: 615–23.
- [73] Fischer G, Bang H. The refolding of urea-denaturated ribonuclease A is catalyzed by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. Biochim Biophys Acta 1985;828:39–42.
- [74] Fischer G, Wittmannliebold B, Lang K, Kiefhaber T, Schmid FX. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. Nature 1989;337:476–8.
- [75] Hengst U, Albrecht H, Hess D, Monard D. The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors. J Biol Chem 2001;276:535–40.
- [76] Mine Y, D'Silva I. Bioactive components in egg white. In: Mine Y, editor. Egg bioscience and biotechnology. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2008. p. 141–84.
- [77] Herve-Grepinet V, Rehault-Godbert S, Labas V, Magallon T, Derache C, Lavergne M, et al. Purification and characterization of avian beta-defensin 11, an antimicrobial peptide of the hen egg. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54:4401–8.
- [78] van Dijk A, Veldhuizen EJA, Haagsman HP. Avian defensins. Vet Immunol Immunopathol 2008;124:1–18.
- [79] Gautron J, Rehault-Godbert S, Pascal G, Nys Y, Hincke MT. Ovocalyxin-36 and other LBP/BPI/PLUNC-like proteins as molecular actors of the mechanisms of the avian egg natural defences. Biochem Soc Trans 2011;39:971–6.
- [80] Bingle CD, Seal RL, Craven CJ. Systematic nomenclature for the PLUNC/PSP/BSP30/SMGB proteins as a subfamily of the BPI fold-containing superfamily. Biochem Soc Trans 2011;39: 977–83.
- [81] Cordeiro CMM, Esmaili H, Ansah G, Hincke MT. Ovocalyxin-36 is a pattern recognition protein in chicken eggshell membranes. PLoS One 2013;8.
- [82] Wellman-Labadie O, Lakshminarayanan R, Hincke MT. Antimicrobial properties of avian eggshell-specific C-type lectin-like proteins. FEBS Lett 2008;582:699–704.
- [83] Rehault-Godbert S, Labas V, Helloin E, Herve-Grepinet V, Slugocki C, Berges M, et al. Ovalbumin-related protein X is a heparin-binding Ov-Serpin exhibiting antimicrobial activities. J Biol Chem 2013;288:17285–95.
- [84] Wu JP, Acero-Lopez A. Ovotransferrin: structure, bioactivities, and preparation. Food Res Int 2012;46:480–7.
- [85] Bourin M, Gautron J, Berges M, Attucci S, Le Blay G, Labas V, et al. Antimicrobial potential of egg yolk ovoinhibitor, a multidomain Kazal-like inhibitor of chicken egg. J Agric Food Chem 2011;59:12368–74.

Article n°2 :

« Data set for the proteomic inventory and quantitative analysis of chicken uterine fluid during eggshell biomineralization »

Data in Brief 1 (2014) 65-69



Contents lists available at ScienceDirect

Data in Brief

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

Data set for the proteomic inventory and quantitative analysis of chicken uterine fluid during eggshell biomineralization



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

^a INRA, UR83 Recherches avicoles, Fonction et Régulation des protéines de l'œuf, F-37380 Nouzilly, France
^b INRA, UMR INRA85, UMR CNRS 7247, Université de Tours, IFCE, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomolécules, Laboratoire de Spectrométrie de Masse, F-37380 Nouzilly, France

ARTICLE INFO

Article history: Received 30 September 2014 Accepted 30 September 2014 Available online 14 October 2014

ABSTRACT

Chicken eggshell is the protective barrier of the egg. It is a biomineral composed of 95% calcium carbonate on calcitic form and 3.5% organic matrix proteins. Mineralization process occurs in uterus into the uterine fluid. This acellular fluid contains ions and organic matrix proteins precursors which are interacting with the mineral phase and control crystal growth, eggshell structure and mechanical properties. We performed a proteomic approach and identified 308 uterine fluid proteins. Gene Ontology terms enrichments were determined to investigate their potential functions. Mass spectrometry analyses were also combined to label free quantitative analysis to determine the relative abundance of 96 proteins at initiation, rapid growth phase and termination of shell calcification. Sixty four showed differential abundance according to the mineralization stage. Their potential functions have been annotated. The complete proteomic, bioinformatic and functional analyses are reported in Marie et al., J. Proteomics (2015) [1].

© 2014 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

DOI of original article: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.09.024 *E-mail address:* joel.gautron@tours.inra.fr (J. Gautron).

http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2014.09.006

2352-3409/© 2014 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Specifications table.

Subject area	Biology
More specific subject area	Chicken uterine fluid proteome during eggshell biomineralization
Type of data	Raw and processed/analyzed mass spectrometry data obtained by nanoliquid chromatography combined to high resolution tandem mass spectrometry, .xls tables with identified/validated and quantified proteins tables
How data was acquired	LC–MS/MS using a LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer
Data format	Raw data: raw.mzml and Processed and analyzed data using Mascot Search engine: .dat. Analyzed: Further assembled sequences using Clustal Omega multi-alignment algorithm and BLAST+ suite
Experimental factors	None applied
Experimental features	Uterine fluid samples were collected at three stages of mineralization process and in gel digested using trypsin. Resulting peptides were analyzed by LC–MS/MS and further treated using data mining and bioinformatic analysis
Data source location	Nouzilly, France, INRA Centre Val de Loire
Data accessibility	Data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium Vizcaino et al., Nat. Biotechnol. 32 (2014) 223–226, via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD000992 [2]

Value of the data

- Proteomic analysis of 308 chicken uterine fluid proteins.
- Gene ontology terms enrichments to investigate potential functions of uterine fluid proteins
- Quantitative data on protein abundances according to mineralization stage.
- Functional annotation on quantified uterine fluid proteins.

1. Collection of uterine fluid samples and preparation for MS analyses

Uterine fluid were collected as described previously [3] on brown-egg laying hens at 7 h, 14 h and 22 h after previous oviposition (p.o). These time intervals correspond to the initiation (I), rapid growth (G) and termination (T) phases of shell mineralization, respectively.

For global protein inventory, equal amounts of protein from uterine fluids collected at each stage of shell calcification were pooled. A total of 135 μ g of proteins was fractionated on a 4–20% SDS-PAGE gel (8.3 cm \times 7.3 cm \times 1.5 mm). Proteins on gels were stained with Coomassie blue and the entire SDS-PAGE lanes were sectioned into 20 bands. For quantitative analyses, 18 individual uterine fluid samples were used. Six uterine fluids collected at the same stage were pooled in equal amount of proteins for each stage (initial (I), growth (G) and terminal (T) stage samples). The three samples I, G and T (112 μ g of proteins/sample) were applied to a 4–20% SDS-PAGE gel (8.3 cm \times 7.3 cm \times 1.5 mm). A brief migration without fractionation was performed until samples were concentrated in a narrow band. The three resulting protein bands were stained with Coomassie blue and excised. Excised proteins for both approaches were in-gel digested with bovine trypsin (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), as previously described [4], and analyzed by nanoscale liquid chromatography-tandem mass spectrometry (nano LC–MS/MS).

2. Nano LC MS/MS analyses

All experiments were performed on a linear ion trap Fourier Transform Mass Spectrometer (FT-MS) LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) coupled to an Ultimate[®] 3000 RSLC Ultra High Pressure Liquid Chromatographer (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) as previously

described [4]. Raw data files were converted to MGF as previously described [4]. The identification of proteins was established using MASCOT search engine (v 2.3, Matrix Science, London, UK). The peptide and fragment masses obtained were matched automatically against IPI chicken (version 3.81) and against the chordata section of nr NCBI database (1601319 sequences, downloaded on 2012/03/ 22) and UniprotKB SwissProt (535248 sequences, downloaded on March 2012). Enzyme specificity was set to trypsin with two missed cleavages using carbamidomethylcysteine, oxidation of methionine and N-terminal protein acetylation as variable modifications. The tolerance of the ions was set to 5 ppm for parent and 0.8 Da for fragment ion matches. Mascot results obtained from the target and decoy databases searches were incorporated in Scaffold 3 software (version 3.4, Proteome Software, Portland, USA). Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 95.0% probability as specified by the Peptide Prophet algorithm [5]. Peptides were considered distinct if they differed in sequence. Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 95.0% probability as specified by the Protein Prophet algorithm [6] and contained at least one sequence-unique peptide for global inventory and at least two sequence-unique peptides for quantitative analysis. A false discovery rate was calculated as < 1% at the peptide or protein level. The abundance of identified proteins was estimated by calculating the emPAI using Scaffold 4 Q+ software (version 4.2, Proteome Software, Portland, USA). Additionally, to perform label-free quantitative proteomic analyses based on spectral counting method, Scaffold 3 Q+ software (version 3.4. Proteome Software, Portland, USA) was used to quantify the proteins at the three different stages of calcification. All proteins with greater than two sequence-unique peptides, identified in database with high confidence were considered for protein quantification. To eliminate quantitative ambiguity within protein groups, we ignored all the spectra matching any peptide which is shared between proteins. Thereby, quantification performed with normalized spectral counts was carried out on distinct proteins. Data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium [2] via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD000992.

3. Data mining and bioinformatic analysis

For proteomic inventory, a total of 256, 298 and 98 proteins were identified using nr NCBI database, IPI chicken database, and UniProtKb/Swiss-Prot database, respectively. For quantitative analysis, a total of 85 proteins were identified using the nr NCBI database, 92 proteins using the IPI chicken database, and 50 proteins with the UniProtKb/Swiss-Prot database. Data originating from both proteomic inventory and quantitative analyses were treated as follows. Trypsin and keratin from mammals were eliminated from the lists as they appeared to be contaminants or resulting from the digestion process. Protein sequences from the three databases (NCBI nr, UniprotKb SwissProt and IPI chicken) were aligned to eliminate all redundancies. Protein groups were determined using Clustal Omega multi-alignment algorithm [7]. Sequences were blasted against nr NCBI database limited to *Gallus gallus* taxon using the blastp program (BLAST+ suite) [8]. This was performed using R language (http://cran.r-project.org).

4. Data set analysis of avian uterine fluid proteome

A total of 308 non-redundant uterine fluid protein sequences were identified. The resulting file (Supplementary Table 1) is made of EntrezGene Ids, GI numbers, protein symbols, short descriptions, and information on their previous identification in the shell. To discern the relative abundance of these proteins among this sample, we calculated the emPAI from the proteins identified in IPI database. This calculation was made from the proteins identified in IPI database which allows us to identify the largest number of proteins. Nevertheless, a total of 35 proteins were not reported in IPI and consequently their emPAI were not determined. Furthermore, we also mentioned in Supplementary Table 1 the proteins common with those revealed in a parallel study of the uterine fluid [9]. This list of uterine fluid proteins was analysed to suppress redundant proteins and compared to our list.

In order to determine the potential functions of the 308 uterine fluid proteins, we have determined in this list, Gene Ontology terms (GO) which are widely used for the overall interpretation of the functions of proteins in proteomic or transcriptomic studies (www.geneontology.org). A total of 4277 GO terms were extracted from the 308 non-redundant uterine fluid proteins, CateGOrizer, previously known as "GO Terms Classifications Counter", was used as a tool (http://www.animalgenome.org/tools/ catego/), to analyse GO term data sets in terms of GO classes [10]. The 4277 GO terms were grouped in 98 different parent term categories using GoSlim2 method. Additionally, GO terms enrichments were determined using Gene set enrichment tools from Genomatix suite (www.genomatix.de). When considering GO terms associated to molecular functions (MF) and biological process (BP), a total of 100 GO terms were found to be significantly enriched (p-values ranges from $9.78.10^{-3}$ to $6.04.10^{-7}$), and grouped in 24 various categories (Supplementary Table 2), which represent the biological and molecular functions over-represented in the uterine fluid. The most prominent enriched group was composed of 26 proteins involved in catabolic process involving the breakdown of hexoses and the liberation of energy. Furthermore, some of these proteins were common to the enriched term associated to the chemical reactions and pathways involving small molecules. Other groups of importance were composed of uterine fluid proteins involved in protein metabolism. They corresponded to 13 proteins related to protein assembly, 7 proteins involved in folding and 19 related to protein structure and integrity. Five proteins belonging to the later were also reported in the "cellular component assembly and organization" group composed of 6 proteins. Also notable were enrichments of 6 proteins acting as protease inhibitors and 5 related to regulation of protein localization and 13 with enzyme regulator activities. Five enriched groups were associated to proteins with binding properties (cell surface-, oxygen-, lipid-, cytoskeletal- and G-protein-binding proteins). GO terms were also enriched for 13 proteins with oxido-reductase activity. Amongst them, three exhibit antioxidant activities. Oxygen transporter activity (3 proteins), transferase activity (3 proteins), response to inorganic substance (4 proteins), nutrient reservoir activity (3 proteins) and coagulation and anticoagulant activity (4 proteins) were also reported in this study. Finally, the uterine fluid proteome also exhibited an enrichment of 8 antimicrobial proteins (response to biotic stimulus).

5. Quantitative dataset at the three main stages of shell calcification

In a second approach, GeLC–MS/MS analyses combined to label free quantitative analysis based on spectral counting quantitative method were used to compare the respective abundance of distinct proteins at the initiation (I), rapid growth (G) and termination (T) phases of shell mineralization. A total of 96 non redundant proteins were identified. Supplementary Table 3 describes these proteins and is made of EntrezGene Ids, GI numbers, protein symbols, short descriptions, *p*-values, information on their previous identification in the shell, the calculated emPAI and their hierarchical ranking (reported from Supplementary Table 1, according to the 308 proteins constituting the uterine fluid proteome and identified in IPI database). Finally, the last three columns represent quantitative data, at the three stages of shell calcification.

Moreover, one way ANOVA was performed for protein abundance in each database, in order to reveal proteins which were significantly different between the three stages of shell mineralization. Statistically significant differences were considered for *p*-value < 0.05. Amongst the 96 proteins, 64 showed differential abundance according to the three mineralization stages. Potential functions of the 64 proteins were examined according to the literature descriptions, data annotations and functional domain databases, with particular emphasis on three potential roles in the uterus during shell formation (involvement in mineralization, regulation of mineralization process and antimicrobial properties) [1]. Supplementary Table 4 reports 30 proteins that could not be ascribed to any of these three functional groups, but rather are classified as proteins with other roles.

Conflict of interest

Authors claim no conflict of interest.

Acknowledgments

This research was funded by the French National Research Agency ANR (ANR-13-BSV6-0007-01 and ANR-13-BSV6-0007-02). The high resolution mass spectrometer was financed (SMHART project 35069) by the European Regional Development Fund (ERDF), the Conseil Régional du Centre, the French National Institute for Agricultural Research (INRA) and the French National Institute of Health and Medical Research (Inserm).

The authors are grateful to the experimental units (UE-PEAT) for care of birds, and to the genotoul bioinformatics platform Toulouse Midi-Pyrenees for providing help and/or computing and/or storage resources. The authors thank and acknowledge Dr. Maxwell Hincke, University of Ottawa for a critical reading of the manuscript.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at http://dx.doi. org/10.1016/j.dib.2014.09.006.

References

- P. Marie, V. Labas, A. Brionne, G. Harichaux, C Hennequet-Antier, Y. Nys, et al., Quantitative proteomics and bioinformatic analysis provide new insight into protein function during avian biomineralization, J. Proteomics 113 (2015) 178–193.
- [2] J.A. Vizcaino, E.W. Deutsch, R Wang, A. Csordas, F. Reisinger, D. Rios, et al., ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination, Nat. Biotechnol. 32 (2014) 223–226.
- [3] J. Gautron, M.T. Hincke, Y. Nys, Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens, Connect. Tissue Res 36 (1997) 195–210.
- [4] V. Labas, I. Grasseau, K Cahier, A. Gargaros, G. Harichaux, A.P. Teixeira-Gomes, et al., Qualitative and quantitative peptidomic and proteomic approaches to phenotyping chicken semen, J. Proteomics (2014). (In press).
- [5] A. Keller, A.I. Nesvizhskii, E. Kolker, R. Aebersold, Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search, Anal. Chem. 74 (2002) 5383–5392.
- [6] A.I. Nesvizhskii, A. Keller, E. Kolker, R. Aebersold, A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry, Anal. Chem. 75 (2003) 4646–4658.
- [7] F. Sievers, A. Wilm, D Dineen, T.J. Gibson, K. Karplus, W.Z. Li, et al., Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, Mol. Syst. Biol. (2011) 7.
- [8] C. Camacho, G. Coulouris, V. Avagyan, N Ma, J. Papadopoulos, K. Bealer, et al., BLAST plus: architecture and applications, BMC Bioinf. (2009) 10.
- [9] C. Sun, G. Xu, N. Yang, Differential label-free quantitative proteomic analysis of avian eggshell matrix and uterine fluid proteins associated with eggshell mechanical property, Proteomics 13 (2013) 3523–3536.
- [10] Z.L. Hu, J Bao, J.M. Reecy, CateGOrized: a web-based program to batch analyse gene ontology classification categories, Online J. Bioinfor. 9 (2008) 108–112.

Chapitre 2 : Relation entre les caractéristiques physiques du processus de minéralisation et la composition de la matrice organique au cours de l'initiation de la calcification de la coquille d'œuf de poule

Présentation des travaux réalisés dans ce chapitre (Articles n°3, 4 et 5)

Introduction et objectif

L'étude décrite dans le chapitre précédent a permis de hiérarchiser les protéines les plus importantes aux différentes phases de la minéralisation de la coquille d'œuf de poule (initiation, croissance, terminaison).

Parmi ces trois étapes, la phase d'initiation apparaît comme l'étape cruciale pour la mise en place de l'ultrastructure de la coquille et la détermination des propriétés mécaniques qui en résultent. Au cours de cette étape, les noyaux mamillaires sont déposés sur les membranes coquillières environ 5 heures après l'ovulation puis les premiers cristaux sont initiés sur ces noyaux environ 6 heures après l'ovulation et une croissance cristalline des cristaux de calcite avec une orientation privilégiée se met progressivement en place à partir de 7 heures après l'ovulation. Ces différents évènements sont primordiaux pour aboutir à la construction de la texture et de la structure finale de ce biomatériau.

Dans ce chapitre, nous rapportons deux études expérimentales différentes qui utilisent des approches physiques et protéomiques pour caractériser, dans un premier temps, la minéralogie et la cristallographie de la coquille et, dans un second temps, les constituants de la matrice organique associés à ces différentes phases précoces déterminantes pour l'élaboration de l'ultrastructure globale de la coquille.

Travaux réalisés

La première partie des travaux (section 2.1) explore les évènements de nucléation et d'élaboration des cristaux formant la coquille au cours d'une cinétique précoce de la calcification. Différentes techniques d'analyse physique ont été utilisées. Cette étude a été réalisée à l'Université de Grenade (Docteur Alejandro Rodriguez-Navarro) et j'y ai participé au cours d'un séjour financé par les universités de Grenade et de Tours. Cette première partie a fait l'objet de l'article n°3.

La seconde partie des travaux (section 2.2) consiste en une analyse protéomique quantitative de la matrice organique au cours de cette même cinétique lors de l'initiation de la calcification. Elle révèle différents profils d'abondance des protéines au cours de cette phase. Cette seconde partie a fait l'objet des articles n°4 et n°5.

Section 2.1:

Caractérisation physique du processus de minéralisation au cours de la cinétique de l'initiation de la calcification de la coquille d'œuf de poule

Présentation de l'article n°3

Introduction et objectif

La compréhension des processus de biominéralisation carbonatée et des mécanismes de formation et de croissance des cristaux a fortement évolué au cours de ces dix dernières années (Banfield *et al*, 2000, Addadi *et al*, 2003, Weiner and Addadi, 2011). La présence et l'importance du carbonate de calcium amorphe (ACC) et son rôle pivot dans le processus de biominéralisation comme forme plus réactive et soluble que la forme cristalline ont été mis en évidence. Sa présence dans différents organismes (crustacés, spicules d'oursins) comme forme de stockage de calcium ou/et précurseur transitoire de la forme cristalline a été rapportée (Addadi *et al*, 2003).

La minéralisation de la coquille d'œuf de poule est un autre processus de minéralisation dans lequel le carbonate de calcium amorphe pourrait être un intermédiaire transitoire important pour l'élaboration de la structure minérale en calcite. Dans cette étude, nous avons utilisé différentes techniques physiques (microscopie électronique à balayage, diffraction aux rayons X, spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier) pour suivre l'évolution de la composition chimique, minéralogique et cristalline de la coquille afin de mieux comprendre les phases précoces du processus de minéralisation et le rôle des formes désordonnées (*e.g.* ACC) du carbonate de calcium dans ce système.

Résultats et discussion

Des coquilles en cours de formation ont été prélevées à trois temps différents de la phase initiale de la minéralisation : 5 heures, 6 heures et 7 heures après l'ovulation. Dans cette première phase, le dépôt de carbonate de calcium est lent. La masse de la coquille évolue de 0,18 g à 0,39 g entre 5 et 7 heures après l'ovulation. Des coquilles ont également été prélevées au cours de la phase de croissance linéaire (16 heures après l'ovulation) qui correspond au développement de la couche palissadique formée de colonnes cristallines avec une orientation privilégiée de la calcite. Dans cette seconde phase, le dépôt de carbonate de calcium est plus rapide (0,33 g/heure). La masse de la coquille qui est de 2,7 g 14 heures après l'ovulation atteint 3,3 g 16 heures après l'ovulation.

Les coquilles ainsi prélevées ont été analysées à l'aide de différentes techniques physiques :

- la microscopie électronique à balayage pour réaliser des observations *in situ* des échantillons.

- la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pour étudier la composition chimique globale de la coquille (détermination des liaisons chimiques présentes) ainsi que les différents états du minéral déposé (forme amorphe ou cristalline et type polymorphique).

- la diffraction aux rayons X pour déterminer la composition chimique et le type polymorphique du minéral déposé.

Les observations en microscopie électronique à balayage conduisent aux résultats suivants. Sur les échantillons prélevés 5 heures après l'ovulation, seuls les noyaux mamillaires (amas de matière organique), répartis de façon régulière sur les membranes coquillières, sont observés. Des particules minérales réparties sur toute la surface des membranes sont visibles sur certains des échantillons. Les résultats de l'analyse dispersive aux rayons X montrent que ces particules sont majoritairement formées de calcium et de carbone, ce qui laisse à penser qu'il s'agit de carbonate de calcium. Cependant, ce carbonate de calcium ne présente pas de caractéristique cristalline. Il serait sous forme amorphe. Les échantillons prélevés 6 heures après l'ovulation présentent des dépôts minéraux sur les noyaux mamillaires. Pour certains des échantillons, ces dépôts ont les caractéristiques cristallines de la calcite. De larges cristaux de calcite rhomboédrique sont observés 14 heures après l'ovulation, seule la surface des cristaux ayant fusionné est visible en microscopie électronique.

Les premières observations microscopiques sont complétées par les deux autres techniques employées.

Les différents pics correspondant au carbonate de calcium sont analysés par étude des spectres infrarouges. Au stade 5 heures après l'ovulation, sont présents deux pics à 1390 cm⁻¹ et à 873 cm⁻¹ qui correspondent au carbonate de calcium total (amorphe et cristallin, Figure 3 A de l'article n°3). L'absence d'un pic spécifique du carbonate de calcium sous forme cristalline indique que la quasi-totalité du carbonate de calcium présent 5 heures après l'ovulation est sous forme amorphe, en cohérence avec les observations microscopiques précédentes. Aux stades 6, 7 et 14 heures après l'ovulation, le pic correspondant à la calcite

(713 cm⁻¹) apparaît en plus des deux autres pics de façon de plus en plus marquée au cours du temps (Figure 3 A de l'article n°3). Aucun autre pic caractéristique de l'un des deux autres polymorphes cristallins du carbonate de calcium n'est visible, indiquant que la coquille est uniquement formée de calcite. L'aire des deux pics à 873 cm⁻¹ et 713 cm⁻¹ a été déterminée et le ratio aire pic carbonate de calcium total/aire du pic calcite calculé. Ce ratio est élevé (>10) pour les échantillons prélevés 5 heures après l'ovulation, ce qui signifie que la grande majorité du carbonate de calcium présent est sous forme amorphe. Il diminue pour les autres échantillons prélevés 6, 7 et 14 heures après l'ovulation jusqu'à atteindre un peu plus de 4 pour les échantillons prélevés 14 heures après l'ovulation (Figure 4 C de l'article n°3). Cette diminution du ratio ainsi que l'apparition du pic spécifique de la calcite traduisent la transformation progressive du carbonate de calcium amorphe en calcite. Le léger déplacement du pic de carbonate de calcium total vers une valeur de 869 cm⁻¹ pour les échantillons prélevés à 5 heures après l'ovulation suggère la présence de deux phases de carbonate de calcium amorphe : une instable et rapidement dissoute et l'autre métastable qui est présente avec la calcite tout au long de la minéralisation. De plus, les positions des pics à 1390 cm⁻¹ et à 873 cm⁻¹ presque identiques quel que soit le stade de prélèvement indiquent que le carbonate de calcium amorphe a une pré-orientation calcitique. La forme du pic à 1390 cm⁻¹ est également la même pour tous les échantillons et ne présente pas de dédoublement (caractéristique des polymorphes carbonatés hydratés tels que la monohydrocalcite), ce qui prouve que le carbonate de calcium amorphe présent est anhydre.

Les échantillons prélevés 5 heures après l'ovulation ne diffractent pas les rayons X, indiquant qu'aucune forme cristalline n'est présente dans l'échantillon. Cela confirme la nature amorphe du minéral déposé. Les échantillons prélevés 6 heures, 7 heures et 14 heures après l'ovulation diffractent les rayons X de façon de plus en plus importante. Les diffractogrammes obtenus sont caractéristiques de la calcite, confirmant la présence de cette unique forme cristalline dans la coquille. La faible diffraction des rayons X pour les échantillons prélevés 6 heures après l'ovulation indique la présence de nanocristaux de calcite. Par contre, la diffraction plus intense pour les échantillons prélevés 7 heures après l'ovulation suggère la présence de microcristaux de calcite. Pour les échantillons prélevés à 14 heures après l'ovulation, la diffraction plus marquée et la présence d'un faible nombre de spots d'une luminosité importante montre la présence de larges unités cristallines de calcite dans la coquille (Figure 5 de l'article n°3).

Les résultats de ces différentes expériences sont complémentaires et mettent en évidence *in situ* pour la première fois du carbonate de calcium amorphe chez un vertébré. Ce carbonate de calcium amorphe présente plusieurs avantages. Il apparaît plus réactif et plus soluble que les formes cristallines : l'énergie nécessaire à chacune des transformations des ions en solution en carbonate de calcium amorphe et du carbonate de calcium amorphe en calcite est ainsi plus faible que celle nécessaire à la transformation directe des ions en solution en calcite. Il pourrait de même servir de réserve temporaire de calcium et être dissous au cours de la minéralisation. Plusieurs orientations cristallines de faible ordre sont observées pour le carbonate de calcium amorphe (concept de polyamorphisme) (Cartwright et al, 2012). Elles détermineraient le type polymorphique du carbonate de calcium cristallin ensuite formé (calcite pour la coquille d'œuf de poule et les spicules d'oursins, calcite ou aragonite pour les coquilles de mollusques bivalves nacro-prismatiques). Un scénario des différents évènements se déroulant lors de l'initiation de la minéralisation est représenté Figure 8 de l'article n°3. La calcification de la coquille débute environ 5 heures après l'ovulation par le dépôt des noyaux mamillaires et du carbonate de calcium désordonné de type amorphe sur toute la surface des membranes coquillières. La majorité de ce carbonate de calcium amorphe est dissous 6 heures après l'ovulation pour former les premiers cristaux de calcite localisés autour des noyaux mamillaires. La conversion du carbonate de calcium amorphe en calcite se ferait selon un processus de transformation directe à l'état solide. De larges unités cristallines se sont développées 7 heures après l'ovulation. Une certaine quantité d'ACC est toutefois présente au front de minéralisation. Les unités cristallines ont fusionné 14 heures après l'ovulation pour laisser apparaître la structure finale de la coquille.

Tous ces évènements se produisent au sein du fluide utérin où les conditions physicochimiques sont contrôlées. Le dépôt d'une phase minérale aboutissant à la structure ordonnée de la calcite implique un contrôle et une stabilisation de l'ACC par les protéines de la matrice organique. Les observations expérimentales réalisées dans cette étude sont cohérentes avec les observations *in vitro* qui montrent que l'ovalbumine a la capacité de stabiliser le carbonate de calcium sous forme amorphe (Wang *et al*, 2009a, Wang *et al*, 2010, Wolf *et al*, 2011), et les simulations moléculaires qui indiquent que l'ovoclédine-17 pourrait catalyser la transformation du carbonate de calcium amorphe en calcite (Freeman *et al*, 2010, Freeman *et al*, 2011). La prochaine étude expérimentale consistera donc en une analyse protéomique de la matrice organique de la coquille sur les mêmes échantillons afin d'identifier les constituants intervenant dans les différents évènements minéralogiques mis en évidence par cette étude.

110

Conclusion

Cette étude a permis de définir les différentes étapes de l'initiation de la minéralisation de la coquille et d'établir un scénario des transformations minérales résultantes. La mise en évidence *in situ* du carbonate de calcium amorphe chez un vertébré constitue l'avancée majeure de ce travail. Ce dernier, présentant une structure proto-calcitique, est dissous pour fournir les ions nécessaires à la calcification.

Cette étude a été élaborée et dirigée par le docteur Alejandro Rodriguez-Navarro, de l'université de Sciences de Grenade (Espagne). J'ai collaboré à cette dernière lors d'un séjour au sein de son laboratoire en 2013. Cette étude a abouti à la rédaction de l'article présenté ci-après, dont je suis le deuxième auteur :

 Article n°3, intitulé « Amorphous calcium carbonate controls avian eggshell mineralization: a new paradigm for understanding rapid eggshell calcification » a été publié dans *Journal of Structural Biology* (Impact factor 3.369).

Ces travaux ont fait l'objet de présentations lors de congrès internationaux et nationaux :

- XIVth European Poultry Conference (23-26/06/2014), présentation affichée (P. Marie)
- 16^{èmes} Journées Françaises de la Biologie des Tissus Minéralisés (14-16/05/2014), présentation orale (P. Marie)

Article n°3 :

« Amorphous calcium carbonate controls avian eggshell mineralization : a new paradigm for understanding rapid eggshell calcification »

Journal of Structural Biology 190 (2015) 291-303

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Structural Biology

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

Amorphous calcium carbonate controls avian eggshell mineralization: A new paradigm for understanding rapid eggshell calcification



^a Departmento de Mineralogia y Petrologia, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

^b INRA. UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France

^c Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Ottawa, Ottawa K1H 8M5, Canada

ARTICLE INFO

Article history: Received 12 March 2015 Received in revised form 21 April 2015 Accepted 22 April 2015 Available online 28 April 2015

Keywords: Biomineralization Laying hens Eggshell Amorphous calcium carbonate Calcite

ABSTRACT

Avian eggshell mineralization is the fastest biogenic calcification process known in nature. How this is achieved while producing a highly crystalline material composed of large calcite columnar single crystals remains largely unknown. Here we report that eggshell mineral originates from the accumulation of flat disk-shaped amorphous calcium carbonate (ACC) particles on specific organic sites on the eggshell membrane, which are rich in proteins and sulfated proteoglycans. These structures known as mammillary cores promote the nucleation and stabilization of a amorphous calcium carbonate with calcitic short range order which predetermine the calcite composition of the mature eggshell. The amorphous nature of the precursor phase was confirmed by the diffuse scattering of X-rays and electrons. The nascent calcitic short-range order of this transient mineral phase was revealed by infrared spectroscopy and HRTEM. The ACC mineral deposited around the mammillary core sites progressively transforms directly into calcite crystals without the occurrence of any intermediate phase. Ionic speciation data suggest that the uterine fluid is equilibrated with amorphous calcium carbonate, throughout the duration of eggshell mineralization process, supporting that this mineral phase is constantly forming at the shell mineralization front. On the other hand, the transient amorphous calcium carbonate mineral deposits, as well as the calcite crystals into which they are converted, form by the ordered aggregation of nanoparticles that support the rapid mineralization of the eggshell. The results of this study alter our current understanding of avian eggshell calcification and provide new insights into the genesis and formation of calcium carbonate biominerals in vertebrates.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Polymorphs of calcium carbonate are among the most common materials used by organisms for many different functions, especially for building highly sophisticated protective mineral structures (i.e., mollusk shell, avian eggshell (Addadi and Weiner, 1992; Nys et al., 1999)). The formation and properties of biomineralized structures have been extensively studied. As a result, our understanding of certain aspects of biomineralization and crystal growth mechanisms has radically changed in the last decade (Addadi et al., 2003; Banfield et al., 2000; Weiner and Addadi, 2011). In particular, the importance and ubiquity of amorphous mineral phases have been demonstrated in several organisms, in which they are used either as calcium storage deposits (i.e. crustaceans) or as a precursor transient mineral phase during the early

* Corresponding author. *E-mail address:* anava@ugr.es (A.B. Rodríguez-Navarro). stages of tissue calcification (i.e. sea urchin spicules) (Addadi et al., 2003). The amorphous mineral form is more soluble and reactive than its crystalline counterpart and can be used as a temporary calcium store, and solubilized as needed to supply calcium for rapid calcification (Ziegler, 1994; Levi-Kalisman et al., 2002; Luquet, 2012). The role of amorphous calcium carbonate (ACC) as a transient phase was first demonstrated during the initial stages of formation of the sea urchin spicule and the larval mollusk shell: in these invertebrate organisms, calcification is preceded by the formation of ACC as a transient phase that is later converted into more stable crystalline mineral phases (i.e., calcite, aragonite; Addadi et al., 2003; Beniash et al., 1997; Weiss et al., 2002). An important advantage is that amorphous phases can more easily adopt the complex morphologies found in biomineral structures, which are more difficult to attain by a single crystal; this recognition has inspired the development of new methods to fabricate highly sophisticated single crystal materials (Aizenberg et al., 2003; Fratzl et al., 2010). Additionally, amorphous phases can grow more



Structural Biology



rapidly than crystalline ones (Raiteri and Gale, 2010; Smeets et al., 2015).

Avian eggshell formation is another biomineralization model system in which the presence of amorphous mineral phases could be highly relevant, although it has never been detected. The eggshell is sequentially assembled as the egg traverses the oviduct (Fernandez et al., 2001; Nys et al., 1999). The shell formation process can be divided into three stages (initiation, linear growth and termination). At the initiation stage, a quasi-periodic array of organic-rich nucleation sites are secreted on the outer fibers of the eggshell membranes, beginning at approximately 4.5 h postovulation (p.o.), when the egg briefly passes through the red isthmus, and then enters the uterus (the shell gland) where mineralization at these sites is initiated during several hours. During the subsequent linear growth stage (between 10 and 22 h p.o., while the forming egg is fully inflated and rotates in the uterus), the eggshell is rapidly mineralized until shell deposition is actively arrested at about 22 h p.o., two hours before oviposition (expulsion) (Nys et al., 1999). During the entire process, the egg is bathed in the uterine fluid, an acellular milieu which contains all necessary organic and inorganic precursors for eggshell formation. Shell mineralization requires the continuous supply of large amounts of calcium and carbonate ions from the uterine fluid, which are derived from the blood stream via trans-epithelial transport across the uterine gland cells (Jonchere et al., 2012). Ionic transporters, actively involved in the secretion of calcium, and carbonic anhydrase, which catalyzes the hydration of CO_2 to HCO_3^- , are highly overexpressed in the uterus gland cells during eggshell mineralization (Brionne et al., 2014; Jonchere et al., 2012). The organic matrix of the eggshell (proteins, polysaccharides and proteoglycans), is also concomitantly secreted into the uterine fluid (Brionne et al., 2014; Gautron et al., 1997). As in other biomineralization processes, the organic matrix is believed to play a key role in the modulation of shell formation, since at each stage a particular profile of specific proteins are present in the uterine fluid (Gautron et al., 1997). In situ and in vitro experiments reveal that these organic matrix components modulate the precipitation of calcium carbonate, including polymorph selection, and demonstrate that there is a functional correlation of the organic composition of the uterine fluid with each stage of the calcification process (Gautron et al., 1997; Hernandez-Hernandez et al., 2008). Moreover, during eggshell mineralization, the genes encoding for these proteins are selectively and highly expressed (Brionne et al. 2014).

Eggshell calcium carbonate precipitates from the uterine fluid, which is highly supersaturated with respect to calcite, the only mineral constituent of the mature eggshell (Nys et al., 1991). Surprisingly, even under these extreme conditions, eggshell mineralization occurs under precise control and produces a material with a well-defined ultrastructural organization (consisting of large columnar calcite crystal units) and monomineral composition (only calcite). Furthermore, the mineralization rate is modulated precisely during the phases of initiation, rapid growth and termination of eggshell formation (Nys et al., 2004). Though there many studies analyzing different aspects of the process of eggshell calcification (see above), there is no detailed study of the evolution of the mineralogy and crystallinity of the eggshell at the early stages of its calcification, and during the phase of linear deposition. These stages are of particular interest as other mineral phases different from calcite may be present. In particular, the formation of amorphous calcium carbonate (ACC) phases during eggshell formation has been recently implied. For instance, molecular dynamic simulations predict that one specific eggshell matrix protein (ovocleidin-17) could catalyze the transformation of ACC to calcite (Freeman et al., 2011). In additional, in vitro experiments reveal that different egg proteins (ovalbumin), eggshell organic extracts and mixtures of matrix proteins can induce the formation and stabilization of ACC as well as other metastable forms of calcium carbonate (vaterite) (Lakshminarayanan et al., 2006; Pipich et al., 2008; Wang et al., 2010; Wolf et al., 2011). Amorphous or noncrystalline solids might have short range order but lack translational periodicity or long range order characteristic of crystalline materials and therefore do not diffract X-rays (De Graef and McHenry, 2012). Consequently, amorphous mineral phases (i.e., ACC) are difficult to detect with traditional techniques used for mineral characterization (i.e., X-ray diffraction) and can be easily overlooked. Furthermore, the amorphous nature of mineral is often ambiguously defined as it depends on the structural resolution of analytical technique used for its characterization (optical microscopy, X-ray diffraction, infrared spectroscopy, X-ray absorption spectroscopy, TEM; Mahamid et al., 2008; Levi-Kalisman et al., 2002; Addadi et al., 2003; Gago-Duport et al., 2008).

In this work, the evolution of the mineralogy and crystallinity of eggshell mineral during its formation process have been reexamined using complementary analytical techniques (i.e., X-ray diffraction, infrared spectroscopy and HRTEM) which are able to detect and characterize in detail amorphous or poorly crystalline mineral phases (Addadi et al., 2003; Politi et al., 2006; Gueta et al., 2007; Poduska et al., 2010). These techniques provide information about the local structural conformation of amorphous or nanocrystalline materials at different level, enabling the detection of any incipient short range order in precursor amorphous phases which might predetermine the crystalline phases into which they will ultimately convert (Addadi et al., 2003; Cartwright et al., 2012) and help us understand the mechanisms controlling calcium carbonate precipitation in this complex biomaterial. In this report, we demonstrate for the first time the occurrence of a transient amorphous calcium carbonate mineral with calcitic short range order, during eggshell calcification, and reveal the importance of this mineral phase to explain the unique characteristics of eggshell mineralization

2. Materials and methods

2.1. Ethical statement, animals handling and housing

All experiments, including all animal handling protocols, were carried out in accordance with the European Communities Council Directives concerning the practice for the care and Use of Animals for Scientific purposes and the French ministerial on Animal experimentation under the supervision of authorized scientists (authorization # 7323, delivered by the DDPP, direction départementale de la protection des populations, d'Indre et Loire). The experimental unit UE-PEAT 1295 where the birds were kept has authorization for rearing birds and for the euthanasia of experimental animals (decree N° B37-175-1 of August 28th 2012 delivered by the Préfecture d'Indre et Loire following the inspection of the Department Direction of Veterinary Services). The protocol was approved by an ethical committee (comité d'éthique de Val de Loire, officially registered under number 19 of the French national ethic committee for animal experimentation) under the authorization number 00159.02.

2.2. Materials

Brown egg laying hens (48–50 weeks old, ISA Hendrix, France) were caged individually and subjected to a cycle of 14 h of light/ 10 h of night. Each cage was equipped with a device for automatic recording of the time of oviposition (egg expulsion). Hens were fed a layer mash *ad libitum* as recommended by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Eggshell samples were

collected either at the initial phase of eggshell mineralization (5, 6 and 7 h after ovulation, p.o.) when the nucleation sites appear and early mineralization starts, or during the linear growth phase of rapid calcification (14 and 16 h p.o.). Eight eggs were collected after animal euthanasia at each time point. To preserve any amorphous mineral phases that might be present, the eggshell membranes and forming eggshells were rapidly washed with distilled water to remove egg white, air dried and frozen. Alternatively, 15 additional samples collected at the initial phase (5 h p.o.) were stored in absolute alcohol to preserve any amorphous calcium carbonate that might be present in the samples.

2.3. Microscopy

Eggshell membranes collected at different times were embedded in epoxy resin for sectioning. Double polished thin-sections (<30 µm) of eggshell membranes were prepared for microstructure analysis by polarized light optical microscopy (OM) (Jenapol U, Zeiss, Germany). Also, 1 µm thin sections were cut with a LEICA Ultracut R (Germany) and stained with 1% toluidine blue for OM observation. Intact eggshell membranes were observed by scanning electron microscopy (SEM) using a Zeiss Auriga SEM (Germany). The same system was used for energy dispersive Xray (EDX) analyses to determine the elemental composition of the samples. Prior to observation, samples were carbon coated (Hitachi UHS evaporator). For high resolution transmission electron microscopy (HRTEM), eggshell samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde and cacodylate buffer (0.1 M pH = 7.4) for 4 h at 4 °C. Later on samples were dehydrated using an ethanol gradient (50%, 70%, 90%, and 100%), embedded in EMbed 812 resin and ultra-thin sectioned (50-70 nm thick) with a LEICA Ultracut R (Germany). Ultra thin sections were collected in water and transferred to TEM Cu 300 mesh grids and carbon coated. Samples were analyzed using a FEI TITAN G2 (The Netherlands) and/or a Carl Zeiss LIBRA 120 PLUS (Germany) TEM microscope equipped with electron energy loss spectroscopy (EELS) and EDX detectors and operated at 300 or 120 kV, respectively. EELS spectra were recorded using a 60 µm aperture, an emission current of 1 µA and a 1.5 eV/channel spectral resolution. To determine the crystallinity of calcium carbonate deposits, selected area electron diffraction (SAED) patterns were collected using a 10 µm aperture. Electron diffraction patterns (EDP), calculated by radial integration of SAED patterns, were compared to simulated EDP patterns to study any short-range order that might be present in amorphous calcium carbonate deposits. For EDP simulations, the Debye function of spherical clusters of atoms, with different arrangements corresponding to calcite, aragonite, vaterite or monohydrocalcite, was calculated as described in detail elsewhere (Rodriguez-Navarro et al., 2015). The crystallization of amorphous calcium carbonate was induced by prolonged exposure to the electron beam for a few tens of seconds at 300 keV.

2.4. Infrared spectroscopy

For Infrared spectroscopy (IR) analyses, the outer surface of intact eggshell samples were pressed against an attenuated total reflection (ATR) diamond crystal window (Pike MIRACLE) and the IR spectra was recorded at a 2 cm^{-1} resolution over 100 scans

using a Fourier transform infrared (FTIR) spectrometer (model 6200, JASCO Analytical Instruments, Japan). The amount of water, protein, sulfate, carbonate, polysaccharide and lipid were determined from the absorption peak areas associated with characteristic molecular group of each component (e.g. O–H: water; C–H: lipids or fatty acids; amide bond: proteins; C–O: carbonates; S–O: sulfates; COC: sugars/polysaccharides). Overlapping peaks were resolved and their integrated areas measured using specially inhouse designed curve-fitting software. Calculated peak areas of the main bands were normalized to the total area of the spectrum.

2.5. X-ray diffraction

The mineralogy and microtextural properties (crystal size and orientation) of eggshell samples were analyzed by X-ray diffraction. Eggshell samples were analyzed with a Panalytical Expert Pro X-ray powder diffractometer (The Netherlands) in reflection mode using copper radiation to determine theta-2theta scans (using and 0.017 deg step size and 63 s integration time per step). In order to determine the presence of amorphous calcium carbonate, selected samples were heated on a furnace at 350 C for 20 min to induce its crystallization. Additionally, eggshell samples were analyzed using a Bruker D8 SMART APEX X-ray single crystal diffractometer equipped with a CCD area detector (Germany) using molybdenum radiation and a pin-hole collimator of 0.5 mm in diameter. Each sample was analyzed in transmission mode at three different locations using an exposure time of 30 s. The 2theta scan profiles were obtained by radial integration of the 2D patterns using XRD2DScan software.

3. Results

3.1. Kinetics of eggshell deposition

The progress of eggshell mineralization and the kinetics of this process were determined by measuring the weight of the forming eggshell (eggshell membranes + deposited mineral) collected at predefined times after ovulation and which were at different stages of calcification (see Table 1). The forming egg initially has a wrinkled appearance because the albumen requires hydration (plumping) in order to attain its distinctive ovoid shape by 10 h p.o. During the first hours of eggshell formation (5–7 h p.o.), the egg-shell membrane slowly gains weight (0.1 g per hour), as calcium carbonate is deposited. The deposition of calcium carbonate is gradually accelerated and the eggshell weight gain reaches a constant rate (0.33 g of shell per h) from 10 to 22 h p.o. (Nys et al., 1999). Thus, there are two clearly distinct kinetic phases of egg-shell formation which correspond to the identified initiation and linear growth stages.

3.2. Optical microscopy

The process of eggshell mineralization at specific stages of shell calcification was followed by optical microscopy using the forming eggshell samples collected at different times after ovulation. Eggshell membrane mineralization starts at around 5 h p.o., right after the deposition of rounded organic-rich structures

Table 1

Kinetics of eggshell deposition, monitored as eggshell weight at different times from ovulation. The number of samples at each time was 8. Errors are calculated as the standard deviation.

Time (p.o.)	5 h	6 h	7 h	14 h	16 h
Eggshell weight (g)	0.18 ± 0.04	0.28 ± 0.08	0.39 ± 0.07	2.73 ± 0.39	3.33 ± 0.42

(mammillary cores) pseudoperiodically on the fibers of the outer surface of the external membrane (Fig. 1A). These structures show a fainter degree of staining with toluidine blue compared to the rest of the membranes. The differential staining of these structures is due to their different chemical composition as they are rich in globular proteins and proteoglycans, whereas the membrane fibers are rich in fibrous proteins (Fernandez et al., 2001; Nys et al., 1999). At the earliest stages of development (5 and 6 h p.o.), most of the membranes do not show any visible mineral deposits. At 7 h, there are only mineral deposits at discrete sites around the outer rim of the mammillary cores. A closer inspection under cross-polarized light shows that these deposits are calcite crystals, which have formed around the perimeter of these rounded structures (Fig. 1B). The calcitic nature of the crystals was evidenced by their strong birefringence under cross-polarized light, which is characteristic of this carbonate mineral. On the other hand, as eggshell deposition progresses, calcite crystals radiate from the mammillary cores and continue growing outwards to give raise to large columnar calcite crystals (palisades) which make up most of the full eggshell thickness. Adjacent columnar calcite units show varying degrees of light extinction under cross-polarized light due to differences in their crystallographic orientation (Fig. 1D). Although columnar units are single calcite crystals (they have a homogeneous light extinction due to their coherent crystallographic orientation), they also have a significant amount of occluded organic matter which is not homogeneously distributed across the eggshell thickness, as can be observed under parallel light (Fig. 1C).

3.3. Scanning electron microscopy

The eggshell mineralization process was monitored by SEM observation of eggshell membranes collected at different stages of eggshell deposition (Fig. 2). Some of the membranes collected

at the earliest stages (at 5 h p.o.) are not yet mineralized (no Ca was detected by EDX spectroscopy; Fig. S1) and only show the protruding organic-rich structures (mammillary cores) distributed pseudoperiodically over the membrane surface (Fig. 2A). These structures will develop into the nucleation centers of calcite crystals. In some of the membranes collected at 5 h, there is an incipient mineralization by particles that nucleate on the membrane fibers (Fig. 2B and C). They grow radially, developing a flat diskshaped morphology (typically 1–10 µm in diameter; Fig. 2B and C). They appear on most of the membrane surface and accumulate particularly over the mammillary cores, covering these individual organic structures (Fig. 2B). These particles are made of CaCO₃ (as determined by EDX analyses; Fig. S1) but do not show any distinctive crystalline feature and are identified as amorphous calcium carbonate (ACC). The disk-shaped calcium carbonate particles are in turn formed by the aggregation of spherical nanoparticles (<100 nm: see inset in Fig. 2B). At 6 h. the accumulation of these flat disk-shaped mineral particles has resulted in the formation of massive mineral deposits on the mammillary core sites (Fig. 2D). The shape of the flat particles adapts to the rounded shape of the mammillary cores and form convex shoulders at their base. These massive deposits do not show any distinctive crystalline feature. Nevertheless, some of them show some protuberances arranged with a threefold symmetry characteristic of calcite crystals, which are observed to be emerging from these structures. A closer view of the surface of the massive mineral deposits reveals that they also have a granular nanostructure formed by the aggregation of spherical nanoparticles (about 100-300 nm in size; Fig. 2E) that in some instances have been transformed into calcite nanocrystals, which are co-oriented (inset in Fig. 2E). In some of the samples collected at this stage, the massive deposits have been partially dissolved (Fig. 2F). In these samples, collected at 6 h (p.o.), there are fewer disk-shaped mineral



Fig.1. Optical microscopy of forming and complete eggshell. (A) Optical microscopy image of a thin section of an eggshell membrane collected at 7 h and stained with toluidine blue. (B) View under cross-polarized light showing the calcite crystals forming at the outer rim of the mammillary cores. (C) A cross-section of a fully developed hen eggshell as viewed under parallel light showing the distribution of occluded organic matter. (D) Cross-polarized light view showing the eggshell columnar calcite crystal units extending from the bases of the mammillary cores. Scale bars correspond to 50 µm.



Fig.2. SEM microphotographs of forming eggshell collected at different stages of mineralization. (A) At 5 h p.o., non-mineralized eggshell with organic-rich structures (mammillary cores) distributed uniformly. (B) In some samples collected at 5 h, an incipient mineralization by flat disk-shaped ACC particles nucleating on membrane fibers is observed. Inset: detail of a disk-shape particle showing an inner granular nanostructure. (C) In these samples, the ACC disk-shaped particles cover most of the eggshell surface and accumulate over the mammillary cores. (D) At 6 h, massive mineral deposits showing emerging calcite crystals. (E) Close-up view of the surface of a massive deposit, showing a granular nanostructure or co-oriented nanosized calcite crystals. (F) Close view of a partially dissolving massive mineral deposit. (G) After 6 h, in a more developed sample, there are only rounded crystal units with a developing rhombohedral morphology, which is typical of calcite. (H) After 7 h, only large calcite crystals bounded by well-defined rhombohedral faces remain. (I) After 14 h, a continuous and fully mineralized shell has been formed by coalescing calcite crystal units. Inset: the surface of the crystal unit is formed by the aggregation of aligned nanoparticles. Scale bars: (A, D and I) 10 µm; (B, C, E, F and G) 1 µm. Insets: (E) 1 µm; (B and I) 300 nm.

particles remaining on the membrane surface around the islands of massive mineral deposits. In other samples collected after 6 h, and which are at a slightly more developed stage, the massive mineral structures have transformed into rounded calcite crystals which nevertheless show an incipient rhombohedral morphology characteristic of calcite while preserving small shoulders at the base (Fig. 2G). After 7 h, only large rhombohedral calcite crystals with well-defined crystal faces are observed (Fig. 2H). At this point, calcite crystals are either isolated or forming spherical aggregates of a few calcite crystals, and are uniformly distributed over the membranes exclusively at the mammillary core sites. Still, the surface of crystals has a granular nanostructure which seems to be formed by the aggregation of rounded nanoparticles. At this stage, there are not any flat disk-shaped particles, or any other type of mineral deposits left between the calcite spherulitic aggregates, as those remaining on the surface of the membranes have been cleared out and only the naked membrane fibers are visible. At later stages (14 h p.o.), the large calcite crystal aggregates of the mammillary cores have coalesced and formed a continuous surface of mineralizing shell (Fig. 2I). The shell surface shows a smooth undulating topography with depressions at the polygonal boundaries of joining crystal units. Between some of the adjacent crystal units,

conspicuous pore openings are observed. At high magnification, it is observed that the surface of calcite units have also a granular nanostructure formed by aligned spherical nanoparticles (about 100 nm in size) arranged in layers (see inset in Fig. 2I). This could be the remnant of former amorphous nanoparticles which have been deposited on the crystal surface in an ordered way layer by layer as in a colloidal crystal.

3.4. Infrared spectroscopy

The progress of eggshell mineralization was also followed by ATR-FTIR spectroscopy. Fig. 3 shows a series of representative FTIR spectra of the outer surface of the membranes measured at different stages of eggshell formation. The IR spectra of the membrane surface at the earliest stages of mineralization shows strong amide/protein bands at 3280, 1640 and 1520 cm⁻¹. There are also sulfates and polysaccharides bands centered at around 1435 cm⁻¹ and 1065 cm⁻¹, respectively Additionally, there is a band at around 2850 cm⁻¹ from C–H group from lipids. These bands are produced by the membrane fibers, which are mainly composed of proteins such as collagens and a cysteine-rich eggshell matrix protein, as well as by the mammillary cores which are rich in proteins and

sulfated proteoglycans (Kodali et al., 2011). At the earliest stages (5 h p.o.), an incipient carbonate deposition on the membrane surface contributes with a broad band centered at 1390 cm⁻¹ (v_3 mode) and a weaker sharp peak at 873 cm⁻¹ (v_2 mode). Initially, the carbonate peak at 713 cm⁻¹ (v_4 mode) is absent or very weak compared to that at 873 cm⁻¹ (v_2 mode) (Fig. 3A and B). The 713 cm⁻¹ peak is characteristic of crystalline carbonate and appears later on with the onset of calcite crystallization at more advanced stages. On the other hand, the v_2 peak (at 873 cm⁻¹) is present in both crystalline and amorphous carbonate. Also, in a few samples collected at a very early stages (at 5 h p.o.; Fig. 3B), the v_2 peak is shifted to lower wavenumbers (about 869 cm⁻¹; which corresponds nearly to the normally reported values for amorphous calcium carbonate; Beniash et al., 1997; Addadi et al., 2003; Ihli et al., 2014). We observed, the v_2 peak is shifted (at 869 cm⁻¹), only in few samples at the earliest stages of eggshell formation where is the rest of the samples it appears at 873 cm⁻¹ (Fig. 3B sample S1). This could represent an amorphous calcium carbonate phase that is quite unstable and short-lived (Gong et al., 2012). At the earlier stages of eggshell formation, the intensity ratio of v_2 to v_4 peaks (which is proportional to the relative amount of amorphous vs crystalline calcium carbonate; Beniash et al., 1997; Addadi et al., 2003; Gueta et al., 2007; Radha et al., 2010) is large (>10; at 5 h p.o.) and, rapidly decreases with time until acquiring values typical of highly crystalline calcite at later stages (Fig. 4A). Meanwhile, the position of the v_2 peak remains constant at 873 cm⁻¹.

It could be argued that spectra with different v_2/v_4 ratios can be produced by a mixture of ACC and calcite, as only calcite would contribute to the intensity of the v_4 peak, decreasing the v_2/v_4 ratio. However, a mixture of ACC and calcite in different proportions would produce a shift in the position of the v_2 peak from that typically reported for ACC (i.e., 866 cm⁻¹) to that of calcite (873 cm⁻¹) or it would produce a double peak. In contrast, it is notable that there is single v_2 peak at constant position of 873 cm⁻¹ from the beginning while the relative intensity of v_2 and v_4 peaks changes. Another possibility is that this is a form of highly disordered calcite (Gueta et al., 2007; Poduska et al., 2010) which is becoming more ordered. However, in our case, samples showing these characteristic do not diffract X-rays so they are amorphous (see below). On the other hand, the position of the v_2 peak at 873 cm⁻¹ could be produced by amorphous calcium carbonate that has a proto-calcite structure that is gradually converting into crystalline calcite.

These observations indicates that: (1) At the initial stages of eggshell formation, most of the calcium carbonate mineral is amorphous, and later on there is a mixture of ACC and an increasing amount of calcite; (2) the amorphous calcium carbonate mineral is metastable and is progressively converting/crystallizing into calcite, or dissolving and calcite is crystallizing, which is in agreement with the SEM observations described above. (3) There might be more than one ACC phase forming during the earlier stages of egg-shell mineralization. One that is short-lived that produce a v_2 peak at 869 cm⁻¹ and another with a proto-calcite structure that produce the v_2 peak at 873 cm⁻¹.

The spectrum of the calcite standard differs from spectra of eggshell collected at different stages, so ACC must be present in the mineralization front at all stages of eggshell mineralization, even at 14 h p.o., corresponding to the linear growth stage of shell formation. For instance, the v_2 and v_4 peaks are significantly sharper in the calcite standard, which indicates that the crystalline order is always lower in the eggshell mineral. On the other hand, the low intensity of the OH band (at 3400 cm⁻¹) and the shape of the v_3 peak (at 1390 cm⁻¹) that does not show any splitting (characteristic of hydrated carbonate polymorphs such as monohydrocalcite; Addadi et al., 2003), indicates that the ACC mineral is anhydrous.

During the first hours of eggshell deposition, as mineralization progresses, the intensity of the amide bands decreases while the main carbonate band at 1390 cm⁻¹ (present in amorphous and crystalline calcium carbonate, calcite) increases rapidly and reaches a maximum as soon as the membrane surface is fully covered by the carbonate mineral (Figs. 3A, 4A and B). The amide bands decrease in intensity as the proteinaceus membrane fibers become covered by the carbonate mineral. The polysaccharides and sulfate peaks are correlated and increase in intensity (Fig. 4C and D), indicating that sulfated polysaccharide-rich molecules



Fig.3. ATR-FTIR spectra of the outer surface of eggshell membranes collected at different stages of mineralization after ovulation (p.o.). (A) The carbonate deposition is inicitated at around 5 h p.o. and progressively increases with time until the eggshell is fully formed at around 20 h p.o; *a* and *b* superindices differentiate between samples collected at the same time (5 h) but with different degrees of calcification. The appearance of the peak at 713 cm⁻¹ indicate the onset of calcite crystallization; (B) Detail of the carbonate v_4 and v_2 peaks of eggshell samples collected at 5 h (S1–S3) and 6 h (S4) that show increasing amounts of calcium carbonate deposition and degrees of transformation into crystalline calcite (the intensity ratio between v_2 and v_4 peaks decrease).



Fig.4. Evolution of eggshell membrane composition with time, from parameters determined by ATR-FTIR. (A) Intensity ratio between carbonate v_2 peaks (at 873 cm⁻¹; present in both calcite and ACC) and the v_4 peak (at 713 cm⁻¹; present only in crystalline calcite), which is a measure of the relative amount of amorphous relative to crystalline calcium carbonate. (B) Area of amide I band which is proportional to the amount of protein. (C) Area of the main carbonate band which quantifies the total amount of carbonate deposited on the outer membrane surface. (D) Area of sulfate peak at 1240 cm⁻¹ which correlates with the amount of polysaccharides and carbonate mineral deposited. Note that at earlier times (5–6 h), the composition of eggshell samples is highly variable. The number of samples at each time was 8. Errors are calculated as the standard deviation.

(i.e., proteoglycans) are directly associated with the deposited mineral. The sulfated polysaccharides signal may correspond to the dermatan sulfate proteoglycans which have been attributed to ovocleidin-116, the most abundant eggshell matrix protein (Hincke et al., 1999). Note that in eggshell samples collected at earlier times (5–6 h; Fig. 4), the composition, degree of mineralization and crystallinity of carbonate are highly variable, which agrees with SEM observations (see above).

3.5. X-ray diffraction

The mineralization of the membranes was also studied by XRD using conventional X-ray powder diffractometry, with Cu radiation, to analyze the mineral deposited at the eggshell surface (1D-XRD; Fig. 5A), and also by 2D X-ray diffractometry, with Mo radiation, to analyze the bulk eggshell composition and microstructure (2D-XRD; Fig. 5B). 1D-XRD patterns of non-mineralized eggshell membranes collected at 5 h p.o., (5^a h-NM) show two broad bands (at the positions indicated by dashed lines). In these samples, no Ca was detected by EDX or carbonate by FTIR so the broad bands shown in the X-ray diffraction patterns are attributed to the organic components of the membrane. In samples collected at 5 h p.o., with an incipient calcium carbonate mineralization covering the surface (5^b h) (as seen by SEM, EDX and infrared spectroscopy; Figs. 2B, S1 and 3A), no further diffraction peaks appear which indicates that the calcium carbonate mineral is

amorphous. At 6 h, as the membrane becomes further mineralized with calcium carbonate deposits covering all the surface, weak calcite diffraction peaks appear, first superimposed on the membrane broad bands, and later on exclusively, as the mineral fully covers the membrane surface. As mineralization progresses (at 7 h), calcite peaks increase in intensity and became sharper. At 14 h the calcite peaks have further increased in intensity and are very sharp, as in the geological calcite used as a highly crystalline calcite reference standard.

In the 2D-XRD patterns (Fig. 5B), the eggshell membrane samples collected at the earliest stages (at 5 h), in most cases, do not diffract X-rays even though they are covered by calcium carbonate mineral deposits as seen by SEM and FTIR. In samples collected at 6 h, the 2D-XRD patterns show very weak and continuous rings at angles corresponding to the main reflections of calcite. These weak continuous rings are produced by randomly oriented nanosized calcite crystals resulting from the transformation of amorphous calcium carbonate particles. As time progresses (at 7 h), samples display a number of small isolated reflection spots which appear at angles corresponding to calcite. These spots are produced by growing calcite microcrystals, whereas the continuous rings have disappeared due to the dissolution of smaller calcite crystals. At later stages (at 14 h), samples reveal fewer spots but of higher intensity, produced by large calcite crystal units which have continued to grow in size. This is in agreement with results obtained by SEM observation (see above) in which the massive deposits



Fig.5. 1D and 2D-XRD patterns of eggshell membranes collected at different times. (A) 1D-XRD patterns of non-mineralized (NM) eggshell collected at 5 h p.o. (5^a) show two broad bands (at the position indicated by dashed lines) which are produced by the organic components of the membrane. No additional peaks are observed in eggshell samples with an incipient mineralization collected also at 5 h p.o. (5^b). Samples collected at 6 h p.o., as the membrane becomes further mineralized, calcite diffraction peaks appear, first superimposed on the membrane broad bands, and later on, exclusively, as the mineral covers the membrane surface. At 7 h, as the mineralizon progresses, calcite peaks increase in intensity and became sharper. At 14 h the calcite peaks have further increased in intensity and are very sharp. (B) 2D-XRD patterns show no diffraction rings in samples collected at 5 h p.o. (a h, there are weak and continuous rings produced by the incipient crystallization of nanosized calcite. At 7 h, some calcite crystalls have grown in size and produce spotty rings whereas most of the nanocrystalline calcite has dissolved. At 14 h, only a few calcite crystals remain and attain a large size, producing fewer but more intense diffraction spots.

formed by ACC/nanocrystalline calcite give way to a small number of calcite crystals which have grown to a large size (tens of microns) while ACC disk-shaped particles and/or nanocrystalline calcite dissolve and disappear. This process is comparable with an Oswald ripening process that occurs during the maturation of mineral precipitates (Ogino et al., 1987). In all cases, crystal spots are homogenously distributed along the diffraction rings, which is indicative that there is no defined preferential orientation of crystals. Finally, it is important to note that throughout the entire process of eggshell mineralization, calcite was the only crystalline form of calcium carbonate detected which indicates that ACC mineral is directly converted into calcite without the occurrence of any intermediate phase.

Samples collected at 5 h p.o., which has an incipient calcium carbonate mineralization (as seen by SEM and infrared spectroscopy) but that do not diffract X-rays, were heated up to 350 C for 20 min (Fig. 6A). After heating, the samples produced diffraction peaks characteristic of calcite, confirming that the eggshell mineral in the original sample was a metastable amorphous calcium carbonate and that has crystallized into calcite. Also, samples collected at 6 h p.o. and that produced weak calcite diffraction peaks, after heating, produced strong calcite peaks (Fig. 6B). This is indicative that most part of the calcium carbonate was amorphous in the original sample and did not contribute to the intensity of diffraction peaks. These findings are in agreement with previously described results from SEM and IR spectroscopic analyses (see above; Figs. 3 and 4) which were indicative that most of the calcium carbonate mineral deposited at the earlier stages of eggshell mineralization is amorphous.

3.6. Transmission electron microscopy

TEM analyses were performed on ultra thin sections (60 nm thick) of forming eggshell collected at the earliest stages of mineralization (5-6 h p.o.), when membranes were partially mineralized by calcium carbonate, as revealed by SEM and FTIR analyses, but did not diffract X-rays. TEM observation reveals some organic structures near the membrane surface which show a brighter contrast due to their higher electron density compared to the rest of the organic eggshell membrane (Fig. 7A and B). These organic structures are part of the forming mammillary cores which have a different composition than the rest of the eggshell membrane. These structures possess smaller calcium carbonate mineral deposits as revealed by the distribution of Ca in EDX maps (Fig. 7C) and EELS spectra characteristic of calcium carbonate (Fig. 7 E). Specifically, the C K-edge peaks at 291 and 301 eV correspond to carbonate groups (Benzerara et al., 2005). Peaks at 350 and 354 eV correspond to the Ca L₂₃ absorption edge. On the other hand, SAED of these mineral deposits showed diffuse rings indicative of their amorphous nature (Fig. 7D). The electron diffraction patterns, calculated by radial integration of the SAED pattern, show two broad peaks, at 0.38 and 0.69 $Å^{-1}$ (Fig. 7E) The data was compared with simulated electron diffraction patterns of calcium carbonate clusters with different atomic arrangements corresponding to calcite, aragonite, vaterite or monohydrocalcite and the best fit was found for calcite spherical clusters about 1 nm in diameter (Fig. 7F). This data supports that ACC mineral particles have short-range calcite order. Also, when high resolution TEM images were acquired, after a few tens of seconds, it was revealed



Fig.6. XRD patterns of eggshell samples before and after being heated at 350 C for 20 min. (A) Eggshell collected at 5 h p.o; (B) Eggshell collected at 6 h p.o. After heating the amorphous calcium carbonate present in the original sample crystallize into calcite and contribute to the intensity of diffraction peaks.



Fig.7. TEM images of ultra-thin sections of an eggshell membrane collected at 5 h. (A) Low magnification image showing several carbonate mineral deposits (circled) near the outer surface around organic structures. (B) Higher magnification image of a selected mineral deposit. (C) EDX map showing the distribution of Ca in the mineral shown in B. (D) EELS spectra showing the C K-edge and Ca L-edge of a calcium carbonate mineral deposit. (E) SAED pattern of the mineral before prolonged beam exposure showing diffuse rings characteristics of ACC. (F) Calculated (red) EPD of the SAED pattern shown in E showing a good fit to the simulated (blue) EDP pattern of 1 nm calcite clusters. (G) High resolution TEM image showing a detail of one of the carbonate mineral deposits with calcitic domains (circled), and amorphous calcium carbonate filling the rest of the space. Scale bars: (A) 200 nm, (B and C) 50 nm, (D) 5 nm.

that these particles, though mainly amorphous, have been partially transformed into well-ordered crystalline domains in which crystal planes are visible (Fig. 7G). The d-spacing between these planes (3.03 and 3.85 Å) corresponds to those of (104) and (102) planes of calcite, respectively. This observation indicates that prolonged exposure to the electron beam (about 20–30 s), before the collection of high resolution images, induces the crystallization of ACC particles into crystalline calcite. However, no appreciable shrinking or deformation was observed in the particles after the induced

electron beam conversion, suggesting that the ACC mineral was anhydrous (Rodriguez-Navarro et al., 2015).

4. Discussion

The novel observations reported here demonstrate that the formation of a transient amorphous calcium carbonate phase is a fundamental characteristic of controlled-mineralization of the calcium carbonate eggshell. Calcification is initiated with the formation of



Fig.8. Cartoon depicting the different stages of eggshell mineralization. Before 5 h p.o., the non-mineralized eggshell membranes show only mammillary cores. At 5 h p.o., there is an initial mineralization of flat disk-shaped ACC particles on the membrane fibers, which preferentially accumulate over the mammillary cores forming massive mineral deposits of ACC. These particles are formed by the aggregation of spherical nanoparticles. Gradually, the massive mineral deposits transform directly (by secondary nucleation) into large calcite crystals (which preserve the granular nanostructure) while the disk-shape particles on the membranes and smaller calcite crystals dissolve and supply ions for further crystal growth. At 6 h p.o., the mineral deposits have transformed into large calcite crystals, with distinctive crystal while most of the disk-shaped particles have been dissolved and cleared out from the membrane surface. At 7 h p.o., only a few large calcite crystals, with distinctive crystal morphologies bounded by flat surfaces, remain. Note that ACC (in light blue) is present at the surface of the mineral deposits at all stages of eggshell formation.

flat disk-shaped ACC particles that nucleate on the entire membrane surface and in particular on the mammillary cores, where they accumulate and form massive mineral deposits (Fig. 8A and B). Subsequently, these massive deposits formed by the accumulation of ACC particles transform directly into large calcite crystal units which nevertheless preserve the original granular nanostructure of the ACC mineral. During this process the transformation front and crystallographic orientation is probably propagated by secondary nucleation starting from some initially forming calcite seeds, which provide a template for the propagation of the transformation front and its crystallographic orientation (Weiner and Addadi, 2011). The initial precipitation of ACC and its direct conversion into calcite indicate that the evolution of calcium carbonate precipitation during eggshell formation do not entirely follow the Ostwald's rule of stages as in other inorganic systems in which there is a well defined sequence of precipitation, dissolution and recrystallization of calcium carbonate phases and which are mainly determined by the thermodynamic stability of mineral phases and kinetic factors (i.e., ACC \rightarrow vaterite \rightarrow calcite; Ogino et al., 1987; Jimenez-Lopez et al., 2001; Pouget et al., 2009; Bots et al., 2012). The direct transformation of ACC into calcite has also been described during maturation of sea urchin spicules (Politi et al., 2008; Gong et al., 2012). This is indicative of a more selective control of the crystallization pathways as described later. Also, FTIR data show indications that there might be more than one

ACC phase forming during the earlier stages of eggshell mineralization as seen also during sea urchin spicule maturation (i.e., hydrated ACC and anhydrous ACC; Gong et al., 2012).

The amorphous nature of the first carbonate mineral deposited on the eggshell membranes and the presence of ACC during the rapid phase of shell calcification was confirmed by infrared spectroscopy, which demonstrated that the carbonate v_4 peak (at 713 cm⁻¹), characteristic of crystalline calcite and absent in ACC, was not initially present or was much fainter compared to the v_2 peak at 873 cm⁻¹ (present in both calcite and ACC; Beniash et al., 1997; Ihli et al., 2014). It is worth mentioning that ACC was detected in eggshell samples independently of the method used for sample preservation (either air dried or kept in absolute alcohol). Additionally, the amorphous nature of these calcium carbonate deposits was also confirmed by their diffuse scattering of Xrays and electrons, as well as by their distinctive non-crystalline morphologies observed by HRSEM. In addition, infrared spectroscopy and TEM data revealed that the ACC mineral has a calcitic short-range order or proto-calcitic structure and is anhydrous. These characteristics are similar to other previously described forms of transient or metastable forms of ACC which later transform into more stable mineral phases such as calcite or aragonite (Addadi et al., 2003; Cartwright et al., 2012; Radha et al., 2010; Gong et al., 2012; Ihli et al., 2014; Rodriguez-Navarro et al., 2015). Local order in the structure of amorphous phases plays an important role in dictating their thermodynamic stability and the transformation pathways into more stable crystalline mineral phases. Also, the lack of water and incipient calcitic ordering make it easier to crystallize into calcite with minimum structural rearrangement (Addadi et al., 2003; Gebauer et al., 2008; Radha et al., 2010; Gong et al., 2012; Ihli et al., 2014; Rodriguez-Navarro et al., 2015). In fact, we have seen that the metastable amorphous calcium carbonate readily transforms into calcite upon heating or after its exposure to the electron beam during TEM observation. In contrast, highly disordered hydrated ACC transform directly into CaO crystals upon beam irradiation (Rodriguez-Navarro et al., 2015). These observations support that ACC in the eggshell mineral has a proto-calcitic structure that facilitates its conversion into crystalline calcite. The origin of the calcitic shortrange order might be based on the formation of prenucleation clusters with proto-calcitic structure (Gebauer et al., 2008; Pouget et al., 2009; Kellermeier et al., 2014). The nascent calcitic shortrange order must be determined by specific macromolecules present in the uterine fluid, which have been shown to select calcite over other calcium carbonate polymorphs in in vitro crystallization tests (Hernandez-Hernandez et al., 2008). In birds, a large variety of matrix proteins have been identified, either from eggshell extract or in the uterine fluid, and their active role in modulating the kinetics of nucleation, calcite polymorphic selection and calcite crystal morphology has been demonstrated in vitro and in vivo (Gautron et al., 1997; Hernandez-Hernandez et al., 2008; Lakshminarayanan et al., 2006; Marie et al., 2015). Whichever the selection process, it must be general for all birds, since there is a constant calcite mineral composition of eggshell across all avian species.

Another important function of uterine fluid biomolecules is that they can control the kinetics of calcium carbonate precipitation. Prior to becoming incorporated into the crystal lattice, cations must desolvate, which is the rate-limiting step in crystal growth. Specific biomolecules, i.e. carboxylate- and phosphate-rich proteins, which are commonly associated with mineralization sites in organisms, can accelerate calcite growth rates several times by facilitating the desolvation of Ca²⁺ (Elhadj et al., 2006). In the same way, this kinetic effect can facilitate the formation of anhydrous calcium carbonate and support the rapid growth of calcite crystals during the linear phase of eggshell formation. Additionally, the uterine fluid, particularly during the linear growth phase, has a strong buffering capacity that favors fast calcite crystal growth (Hernandez-Hernandez et al., 2008). This buffering capacity is due to specific uterine fluid proteins which have very different isoelectric points.

Also, the eggshell membrane mammillary cores play an active role in inducing calcium carbonate mineralization which has been demonstrated in vitro, where non-mineralized eggshell membranes induce the nucleation of calcite around the mammillary cores and not on other accessible regions of eggshell membrane (Fernandez et al., 2004). In other invertebrate calcium carbonate biomineralization systems (i.e., mollusk nacre), nucleation occurs also at specific sites (Nudelman et al., 2007). In both cases, these sites are rich in sulfate and carboxylate groups that concentrate calcium ions and promote the nucleation of calcium carbonate (Addadi et al., 1987). Moreover, even when the bulk uterine fluid is, at times, undersaturated with respect to ACC (see Table S1), it might achieve supersaturated locally on these sites. Thus, the heterogeneous nucleation of ACC would be specially effective on the mammillary cores, which are rich in such molecules (Fernandez et al., 2001, 2004). In this manner, sulfated proteoglycans and additional matrix components at the mammillary cores would play an important role in promoting the nucleation and stabilization of ACC and calcite (Pouget et al., 2009; Smeets et al., 2015) whereas in the rest of the membrane surface ACC particles (and nanocrystalline calcite) are dissolving. Competition for calcium and carbonate ions creates undersaturated depletion zones around mammillary cores which further promotes the dissolution of ACC mineral particles in the surrounding areas. These depletion zones are defined by the level of supersaturation and by geometrical factors such as the spacing between competing nucleation sites (Fratzl et al., 2010).

On the other hand, initial flat-disk ACC particles and mineral deposits as well as the surface of calcite crystals into which they convert have a granular nanostructure similar to that described in other biominerals (Rousseau et al., 2005; Sethmann et al., 2006). In contrast, inorganic calcite crystals have atomically flat surfaces produced by the addition of ions layer-by-layer (Teng et al., 1999). This suggests that eggshell mineralization may occur by non-classical crystal growth mechanisms in which the mineral deposits grow by the formation and aggregation of ACC nanoparticles at the surface which later on crystallize into calcite (i.e., by secondary nucleation) while preserving a granular nanostructure (Gal et al., 2014; Rodriguez-Navarro et al., 2015). Also growth of amorphous calcium carbonate clusters into particles is energetically favorable and do not required to overcome any nucleation barrier (Radha et al., 2010). Additionally, amorphous calcium carbonate clusters are atomically rough providing more kink sites to incorporate ions, allowing faster growth rates for the amorphous phases than for crystalline calcite (Raiteri and Gale, 2010; Smeets et al., 2015). Also, due to the large difference in solubility between the dissolving ACC and the forming calcite, the uterine fluid maintains a very high supersaturation with respect to calcite which can sustain a fast and continuous growth of calcite crystals (Bots et al., 2012). Thus, the use of an intermediate amorphous mineral phase can explain the extremely rapid mineralization rates that occur during avian eggshell calcification. For instance, chickens deposit a 350 µm thick calcitic shell in approximately 10 h (equivalent to a growth rate of 35 μ m h⁻¹). This is the most rapid biological calcification process known, being at least 100 times faster than the mollusk shell and 7 times faster than the rapidly growing calcitic sea urchin spicules (5 μ m h⁻¹), which also form through an ACC particulate intermediate (Beniash et al., 1997; Vidavsky et al., 2014). By comparison, inorganic calcite bulk growth rates are typically about $1 \,\mu m h^{-1}$ or less, depending on the degree of supersaturation.

In conclusion, avian eggshell mineralization occurs through a transient amorphous mineral phase which is metastable and progressively gives way to crystalline calcite, the only calcium carbonate polymorph that is detected in the mature eggshell. The direct conversion into calcite is predetermined and facilitated by the proto-calcitic structure of the amorphous calcium carbonate. During the process of eggshell mineralization, the uterine fluid solution chemistry is controlled by the formation and dissolution of ACC, which is in equilibrium with the uterine fluid throughout the process (see supplementary information). The ACC and calcite preferentially form and stabilize on the mammillary sites due to their affinity for organic macromolecules (e.g. sulfated proteoglycans and specific acidic proteins) with a strong calcium binding capacity present at these locations. In contrast, ACC particles formed in other part of the eggshell membrane are dissolving. In order to determine specific protein candidates involved in the formation and stabilization of ACC and calcite, we are currently undertaking proteomic studies to identify and quantify abundant uterine fluid proteins during this initial calcification phase. Finally, our study also showed that eggshell mineral may grow by the formation and aggregation of ACC nanoparticles at the eggshell surface, which progressively crystallize into calcite while preserving a granular nanostructure. The transformation front and crystallographic orientation probably propagates by secondary nucleation from previously formed calcite crystal seeds, yielding large calcite crystal units with have a coherent orientation. These growth mechanisms are very efficient and would explain the rapid calcification of the eggshell. Better understanding of the mechanisms of formation of this biomaterial could lead to more efficient methods for the fabrication of synthetic crystalline materials.

Acknowledgments

We are grateful for financial support through grants CGL2011-25906 (Ministerio de Economía y Competititvidad, Spain) (A.R.N.), RNM-179 group (Junta de Andalucía, Spain) (A.R.N.) and NSERC-Discovery 155449-2011 (M.T.H.). This project was funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-BSV6-0007-01) Impact Project (J.G.). J.G., P.M. and Y.N. also acknowledge the INRA experimental unit (UEPEAT Centre Val de Loire, 37380 Nouzilly, France) for care of the birds. We thank Arantxa Muñoz, Nazaret Dominguez-Gasca, Alicia Gonzalez, Bendicion Funes, Maria Jose Martinez, Jose Romero and Juan de Dios Buenos (U. Granada), for their help during sample preparation and analyses. We also thank Krzysztof Kudlacz (IMMS, Krakow, Poland) for EDP simulations. We are also grateful for helpful discussions with Prof. Carlos Rodriguez-Navarro (U. Granada), comments from Prof. S. Weiner (Weizmann Institute) and corrections from anonymous referees.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2015.04.014.

References

- Addadi, L., Weiner, S., 1992. Control and design principles in biological mineralization. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 31, 153–169.
- Addadi, L., Moradian, J., Shay, E., Maroudas, N.G., Weiner, S., 1987. A chemicalmodel for the cooperation of sulfates and carboxylates in calcite crystal nucleation – Relevance to biomineralization. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 2732–2736.
- Addadi, L., Raz, S., Weiner, S., 2003. Taking advantage of disorder: amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralization. Adv. Mater. 15, 959–970.
- Aizenberg, J., Muller, D.A., Grazul, J.L., Hamann, D.R., 2003. Direct fabrication of large micropatterned single crystals. Science 299, 1205–1208.
- Banfield, J.F., Welch, S.A., Zhang, H.Z., Ebert, T.T., Penn, R.L., 2000. Aggregation-based crystal growth and microstructure development in natural iron oxyhydroxide biomineralization products. Science 289, 751–754.
- Beniash, E., Aizenberg, J., Addadi, L., Weiner, S., 1997. Amorphous calcium carbonate transforms into calcite during sea urchin larval spicule growth. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 264, 461–465.
- Benzerara, K., Menguy, N., Guyot, F., Vanni, C., Gillet, P., 2005. TEM study of a silicate-carbonate-microbe interface prepared by focused ion beam milling. Geochim. Cosmochim. Acta 69, 1413–1422.
- Bots, P., Benning, L.G., Rodriguez-Blanco, J.D., Roncal-Herrero, T., Shaw, S., 2012. Mechanistic insights into the crystallization of amorphous calcium carbonate (ACC). Cryst. Growth Des. 12, 3806–3814.
- Brionne, A., Nys, Y., Hennequet-Antier, C., Gautron, J., 2014. Hen uterine gene expression profiling during eggshell formation reveals putative proteins involved in the supply of minerals or in the shell mineralization process. BMC Genomics 15.
- Cartwright, J.H.E., Checa, A.G., Gale, J.D., Gebauer, D., Sainz-Diaz, C.I., 2012. Calcium carbonate polyamorphism and its role in biomineralization: how many amorphous calcium carbonates are there? Angew. Chem. Int. Ed. 51, 11960– 11970.
- De Graef, M., McHenry, M.E., 2012. Structure of Materials: An Introduction to Crystallography, Diffraction, and Symmetry. Cambridge University Press, Cambridge.
- Elhadj, S., De Yoreo, J.J., Hoyer, J.R., Dove, P.M., 2006. Role of molecular charge and hydrophilicity in regulating the kinetics of crystal growth. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 19237–19242.
- Fernandez, M.S., Moya, A., Lopez, L., Arias, J.L., 2001. Secretion pattern, ultrastructural localization and function of extracellular matrix molecules involved in eggshell formation. Matrix Biol. 19, 793–803.
- Fernandez, M.S., Passalacqua, K., Arias, J.I., Arias, J.L., 2004. Partial biomimetic reconstitution of avian eggshell formation. J. Struct. Biol. 148, 1–10.
- Fratzl, P., Fischer, F.D., Svoboda, J., Aizenberg, J., 2010. A kinetic model of the transformation of a micropatterned amorphous precursor into a porous single crystal. Acta Biomater. 6, 1001–1005.
- Freeman, C.L., Harding, J.H., Quigley, D., Rodger, P.M., 2011. Simulations of ovocleidin-17 binding to calcite surfaces and its implications for eggshell formation. J. Phys. Chem. C 115, 8175–8183.

- Gago-Duport, L., Briones, M.J.I., Rodriguez, J.B., Covelo, B., 2008. Amorphous calcium carbonate biomineralization in the earthworm's calciferous gland: pathways to the formation of crystalline phases. J. Struct. Biol. 162, 422–435.
- Gal, A., Kahil, K., Vidavsky, N., DeVol, R.T., Gilbert, P.U.P.A., Fratzl, P., Weiner, S., Addadi, L., 2014. Particle accretion mechanism underlies biological crystal growth from an amorphous precursor phase. Adv. Funct. Mater. 24, 5420–5426.
- Gautron, J., Hincke, M.T., Nys, Y., 1997. Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens. Connect. Tissue Res. 36, 195– 210.
- Gebauer, D., Volkel, A., Colfen, H., 2008. Stable prenucleation calcium carbonate clusters. Science 322, 1819–1822.
- Gong, Y.U.T., Killian, C.E., Olson, I.C., Appathurai, N.P., Amasino, A.L., Martin, M.C., Holt, L.J., Wilt, F.H., Gilbert, P., 2012. Phase transitions in biogenic amorphous calcium carbonate. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 6088–6093.
- Gueta, R., Natan, A., Addadi, L., Weiner, S., Refson, K., Kronik, L., 2007. Local atomic order and infrared spectra of biogenic calcite. Angew. Chem. Int. Ed. 46, 291– 294.
- Hernandez-Hernandez, A., Gomez-Morales, J., Rodriguez-Navarro, A.B., Gautron, J., Nys, Y., Garcia-Ruiz, J.M., 2008. Identification of some active proteins in the process of hen eggshell formation. Cryst. Growth Des. 8, 4330–4339.
- Hincke, M.T., Gautron, J., Tsang, C.P.W., McKee, M.D., Nys, Y., 1999. Molecular cloning and ultrastructural localization of the core protein of an eggshell matrix proteoglycan, ovocleidin-116. J. Biol. Chem. 274, 32915–32923.
- Ihli, J., Wong, W.C., Noel, E.H., Kim, Y.Y., Kulak, A.N., Christenson, H.K., Duer, M.J., Meldrum, F.C., 2014. Dehydration and crystallization of amorphous calcium carbonate in solution and in air. Nat. Commun. 5, 3169.
- Jimenez-Lopez, C., Caballero, E., Huertas, F.J., Romanek, C.S., 2001. Chemical, mineralogical and isotope behavior, and phase transformation during the precipitation of calcium carbonate minerals from intermediate ionic solution at 25 °C. Geochim. Cosmochim. Acta 65, 3219–3231.
- Jonchere, V., Brionne, A., Gautron, J., Nys, Y., 2012. Identification of uterine ion transporters for mineralisation precursors of the avian eggshell. BMC Physiol. 12, 10.
- Kellermeier, M., Picker, A., Kempter, A., Cölfen, H., Gebauer, D., 2014. A straightforward treatment of activity in aqueous CaCO₃ solutions and the consequences for nucleation theory. Adv. Mater. 26, 752–758.
- Kodali, V.K., Gannon, S.A., Sivakumar, P., Sonali, R., Polenova, T., Thorpe, C., 2011. A novel disulfide-rich protein motif from avian eggshell membranes. PLoS ONE 6.
- Lakshminarayanan, R., Loh, X.J., Gayathri, S., Sindhu, S., Banerjee, Y., Kini, R.M., Valiyaveettil, S., 2006. Formation of transient amorphous calcium carbonate precursor in quail eggshell mineralization: an in vitro study. Biomacromolecules 7, 3202–3209.
- Levi-Kalisman, Y., Raz, S., Weiner, S., Addadi, L., Sagi, I., 2002. Structural differences between biogenic amorphous calcium carbonate phases using X-ray absorption spectroscopy. Adv. Funct. Mater. 12, 43–48.
- Luquet, G., 2012. Biomineralizations: insights and prospects from crustaceans. Zookeys 176, 103-121.
- Mahamid, J., Sharir, A., Addadi, L., Weiner, S., 2008. Amorphous phosphate is a major component of the forming fin bones of zebrafish: indications for an amorphous precursor phase. PNAS 105, 12748–12753.
- Marie, P., Labas, V., Brionne, A., Harichaux, G., Hennequet-Antier, C., Nys, Y., Gautron, J., 2015. Quantitative proteomics and bioinformatic analysis provide new insight into protein function during avian eggshell biomineralization. J. Proteomics 113, 178–193.
- Nudelman, F., Chen, H.H., Goldberg, H.A., Weiner, S., Addadi, L., 2007. Spiers memorial lecture: lessons from biomineralization: comparing the growth strategies of mollusc shell prismatic and nacreous layers in Atrina rigida. Faraday Discuss. 136, 9–25.
- Nys, Y., Zawadzki, J., Gautron, J., Mills, A.D., 1991. Whitening of brown-shelled eggs – Mineral-composition of uterine fluid and rate of protoporphyrin deposition. Poult. Sci. 70, 1236–1245.
- Nys, Y., Hincke, M.T., Arias, J.L., Garcia-Ruiz, J.M., Solomon, S.E., 1999. Avian eggshell mineralization. Poult. Avian Biol. Rev. 10, 143–166.
- Nys, Y., Gautron, J., Garcia-Ruiz, J.M., Hincke, M.T., 2004. Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. C. R. Palevol 3, 549–562.
- Ogino, T., Suzuki, T., Sawada, K., 1987. The formation and transformation mechanism of calcium-carbonate in water. Geochim. Cosmochim. Acta 51, 2757–2767.
- Pipich, V., Balz, M., Wolf, S.E., Tremel, W., Schwahn, D., 2008. Nucleation and growth of CaCO₃ mediated by the egg-white protein ovalbumin: a time-resolved in situ study using small-angle neutron scattering. J. Am. Chem. Soc. 130, 6879– 6892.
- Poduska, K.M., Regev, L., Boaretto, E., Addadi, L., Weiner, S., Kronik, L., Curtarolo, S., 2010. Decoupling local disorder and optical effects in infrared spectra: differentiating between calcites with different origins. Adv. Mater. 23, 550–554.
- Politi, Y. et al., 2006. Structural characterization of the transient amorphous calcium carbonate precursor phase in sea urchin embryos. Adv. Funct. Mater. 16, 1289– 1298
- Politi, Y., Metzler, R.A., Abrecht, M., Gilbert, B., Wilt, F.H., Sagi, I., Addadi, L., Weiner, S., Gilbert, P.U.P.A., 2008. Transformation mechanism of amorphous calcium carbonate into calcite in the sea urchin larval spicule. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 17362–17366.
- Pouget, E.M., Bomans, P.H.H., Goos, J., Frederik, P.M., de With, G., Sommerdijk, N., 2009. The initial stages of template-controlled CaCO₃ formation revealed by cryo-TEM. Science 2009 (323), 1455.
- Radha, A.V., Forbes, T.Z., Killian, C.E., Gilbert, P.U.P.A., Navrotsky, A., 2010. Transformation and crystallization energetics of synthetic and biogenic amorphous calcium carbonate. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107, 16438–16443.
- Raiteri, P., Gale, J.D., 2010. Water is the key to nonclassical nucleation of amorphous calcium carbonate. J. Am. Chem. Soc. 132, 17623–17634.
- Rodriguez-Navarro, C., Kudłacz, K., Cizer, O., Ruiz-Agudo, E., 2015. Formation of amorphous calcium carbonate and its transformation into mesostructured calcite. CrystEngComm 17, 58–72.
- Rousseau, M., Lopez, E., Stempfle, P., Brendle, M., Franke, L., Guette, A., Naslain, R., Bourrat, X., 2005. Multiscale structure of sheet nacre. Biomaterials 26, 6254–6262.
- Sethmann, I., Hinrichs, R., Worheide, G., Putnis, A., 2006. Nano-cluster composite structure of calcitic sponge spicules – A case study of basic characteristics of biominerals. J. Inorg. Biochem. 100, 88–96.
- Smeets, P.J.M., Cho, K.R., Kempen, R.G.E., Sommerdijk, N.A.J., De Yoreo, J.J., 2015. Calcium carbonate nucleation driven by ion binding in a biomimetic matrix revealed by in situ electron microscopy. Nat. Mater. http://dx.doi.org/10.1038/ nmat4193.
- Teng, H.H., Dove, P.M., DeYoreo, J.J., 1999. Reversed calcite morphologies induced by microscopic growth kinetics: insight into biomineralization. Geochim. Cosmochim. Acta 63, 2507–2512.

- Vidavsky, N., Addadi, S., Mahamid, J., Shimoni, E., Ben-Ezra, D., Shpigel, M., Weiner, S., Addadi, L., 2014. Initial stages of calcium uptake and mineral deposition in sea urchin embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, 39–44.
- Wang, X.Q., Wu, C.M., Tao, K., Zhao, K., Wang, J.Q., Xu, H., et al., 2010. Influence of ovalbumin on CaCO₃ precipitation during in vitro biomineralization. J. Phys. Chem. B 114, 5301–5308.
- Weiner, S., Addadi, L., 2011. Crystallization pathways in biomineralization. Ann. Rev. Mater. Res. 41, 21–40.
- Weiss, I.M., Tuross, N., Addadi, L., Weiner, S., 2002. Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. J. Exp. Zool. 293, 478–491.
- Wolf, S.E., Leiterer, J., Pipich, V., Barrea, R., Emmerling, F., Tremel, W., 2011. Strong stabilization of amorphous calcium carbonate emulsion by ovalbumin: gaining insight into the mechanism of 'polymer-induced liquid precursor' processes. J. Am. Chem. Soc. 133, 12642–12649.
- Ziegler, A., 1994. Ultrastructure and electron spectroscopic diffraction analysis of the sternal calcium deposits of *Porcellio scaber* Latr (Isopoda, Crustacea). J. Struct. Biol. 112, 110–116.

Section 2.2 : Caractérisation des protéines intervenant dans le processus de minéralisation au cours de la cinétique de l'initiation de la calcification de la coquille d'œuf de poule et de la phase active de calcification

Présentation des articles n°4 et 5

Introduction et objectif

Le travail réalisé dans la section précédente (Section 2.1) décrit le scénario des différentes étapes de l'initiation de la minéralisation. La formation de la coquille débute 5 heures après l'ovulation par le dépôt des noyaux mamillaires et du carbonate de calcium sous forme amorphe (ACC). Elle se poursuit par la transformation de l'ACC en calcite 6 heures après l'ovulation et l'établissement d'unités cristallines plus larges de calcite 7 heures après l'ovulation. A 16 heures après l'ovulation, des colonnes de cristaux de calcite présentant une orientation privilégiée forment la couche palissadique de la coquille.

Durant ces différentes étapes, la matrice organique joue probablement un rôle pour stabiliser la forme amorphe de carbonate de calcium et/ou influencer la croissance et le type polymorphique des cristaux de carbonate de calcium présents dans la coquille et ainsi favoriser l'orientation progressive des cristaux perpendiculairement à la surface de l'œuf.

L'objectif de cette étude était d'identifier et quantifier les composants de la matrice organique sur les mêmes échantillons de coquilles en cours de formation que ceux analysés dans notre étude précédente (Section 2.1) en utilisant une approche protéomique GeLC-MS/MS combinée à une analyse quantitative. Elle a été complétée par une analyse bioinformatique de la fonction des protéines identifiées et quantifiées afin de regrouper les protéines selon leurs fonctions biologiques proposées et ainsi explorer leurs rôles potentiels lors de la nucléation primaire, la formation de calcite par agrégation de l'ACC, la formation des cristaux de calcite en accroissement et le développement de la couche palissadique avec une orientation privilégiée de la calcite.

Résultats et discussion

1. Inventaire global des protéines de la matrice organique

Les protéines de la matrice organique ont été extraites sur les échantillons de coquilles en cours de formation prélevés 5 heures, 6 heures, 7 heures et 16 heures après l'ovulation. Les échantillons d'extraits protéiques à chacun des stades ont été séparés dans un gel SDS-PAGE 4-20%. Quinze bandes, couvrant la totalité du gel, ont été découpées pour chacun des échantillons séparés. Les protéines présentes dans les soixante bandes ont été digérées par la

trypsine. Les peptides ainsi obtenus ont été séparés par chromatographie liquide puis analysés sur un spectromètre de masse LTQ Velos OrbiTrap. Les protéines ont ensuite été identifiées à l'aide des logiciels Mascot et Scaffold 3 en utilisant la base de données NCBI nr et quantifiées à l'aide du logiciel Scaffold 3 Q+. Une analyse bioinformatique des données a permis d'éliminer la redondance potentielle et d'obtenir les protéines correspondantes dans le taxon *Gallus gallus*. Une liste non redondante de 216 protéines présentes dans la matrice organique de la coquille d'œuf de poule a été établie (Tableau Supplémentaire 1 dans l'article n°5).

Ces protéines ont été comparées aux 675 et 644 protéines identifiées au préalable respectivement dans la matrice organique de la coquille et dans le fluide utérin afin de mettre en évidence les protéines communes entre les différentes études et les protéines nouvellement identifiées ((Miksik et al, 2003, Mann et al, 2006, Mann et al, 2007a, Miksik et al, 2007, Miksik et al, 2010, Rose-Martel et al, 2012, Sun et al, 2013) et article n°1). Au total, 192 des 216 protéines mises en évidence avaient été identifiées au préalable dans la matrice organique de la coquille (dont 149 étaient également présentes dans le fluide utérin). Un total de 24 protéines a été nouvellement identifié dans la matrice organique de la coquille et est venu s'ajouter au protéome global de la coquille qui est constitué de 699 protéines à ce jour. Ces 24 nouvelles protéines présentent en majorité des emPAI faibles, ce qui indiquerait une implication limitée dans la calcification. Il faut toutefois noter la présence de 2 protéines nouvelles et abondantes dans la matrice organique. L'alpha-D-globine est surabondante aux stades 5-7 heures et sa fonction dans la minéralisation n'est pas connue. HIST1H2B7 est un composant des histones abondant à tous les stades de la minéralisation sans différence significative entre les stades. Cette protéine serait impliquée dans la défense antimicrobienne de l'œuf.

2. Protéomique quantitative aux différents stades de prélèvement

Des valeurs quantitatives à chacun des stades étudiés ont été obtenues pour les 216 protéines identifiées. Une ANOVA à un facteur a été réalisée sur les valeurs quantitatives afin de déterminer les protéines différentiellement abondantes à au moins un des stades du processus de minéralisation étudiés (p-value < 0,01). Elle montre que 175 des 216 protéines quantifiées présentent une variation d'abondance en fonction de ces stades. Pour ces 175 protéines, une valeur quantitative moyenne centrée réduite pour chacun des stades a été calculée. Une classification hiérarchique ascendante a déterminé 10 profils protéiques différents en fonction de l'abondance des protéines aux différents stades. Ils peuvent être

rassemblés en 5 groupes correspondant aux différentes étapes de la minéralisation décrites précédemment. Au total, 27 protéines sont surabondantes lors des premiers évènements de la minéralisation avec dépôt d'une phase désordonnée de carbonate de calcium (5 et 6 heures après l'ovulation), 13 lors de la transformation du carbonate de calcium amorphe en calcite (6 heures après l'ovulation), 47 lors de la formation d'unités cristallines de calcite en accroissement (6 et 7 heures après l'ovulation) et 70 lors de la mise en place de la couche palissadique qui développe progressivement une orientation privilégiée des cristaux (16 heures après l'ovulation). De plus, 18 protéines sont surabondantes tout au long du processus de calcification (6, 7 et 16 heures après l'ovulation).

3. Protéines associées aux stades pivots de la calcification

La fonction potentielle des protéines présentant des différences d'abondance selon les stades de minéralisation a été déterminée par l'analyse des données bibliographiques, des domaines fonctionnels et des bases de données protéiques. Notre attention s'est portée plus particulièrement sur 77 de ces protéines dont la fonction peut être associée à la minéralisation. Leur implication lors du processus de calcification peut être directe (modification des cristaux de calcite, liaison au calcium, anhydrase carbonique, protéines de protéoglycanes), ou indirecte par leur capacité à réguler la fonction des protéines intervenant dans la minéralisation (chaperons moléculaires, protéines modifiant la phosphorylation d'autres protéines ou protéases et inhibiteurs de protéases). Ces 77 protéines ont été classées en différents groupes selon leur surabondance lors des premiers évènements de minéralisation caractérisés par le dépôt d'ACC, de sa transformation en agrégats de calcite, de la formation d'unités cristallines de calcite en accroissement, du développement des unités cristallines avec des orientations privilégiées dans la couche palissadique ou tout au long des étapes de calcification. Ces données ont été combinées avec les valeurs d'emPAI afin de déterminer les protéines les plus abondantes à chaque stade. La discussion ci-après rapporte les protéines les plus notables au vu de leur fonction et leur abondance dans chacun de ces groupes. L'ensemble des protéines identifiées sont décrites dans l'article n°4.

Protéines surabondantes au cours des évènements primaires de la minéralisation

Un total de 8 protéines présentes dans ce profil peut jouer un rôle dans le processus de minéralisation (Tableau 1 de l'article n°4). Parmi celles-ci, **le lysozyme** et **l'ovotransferrine** se distinguent avec des valeurs d'emPAI élevées. Le lysozyme est ainsi la première protéine en terme d'abondance quel que soit le stade étudié et l'ovalbumine occupe de la 2^{ème} à la 7^{ème}

place en fonction des stades. Ces protéines sont connues pour modifier la morphologie des cristaux de calcite in vitro (Hincke et al, 2000, Gautron et al, 2001b). De plus, le lysozyme pourrait jouer un rôle dans la stabilisation de l'ACC (Voinescu et al, 2007, Wang et al, 2009b). Il est aussi à noter la présence de l'hémopexine qui est la 12^{ème} protéine en terme d'abondance à 5 heures après l'ovulation et qui lie les ions divalents comme le calcium (Mauk et al, 2005). La lysyl oxidase 2, qui intervient dans la formation des fibres présentes dans les membranes coquillières (notamment celles de collagène) (Harris et al, 1980, Akagawa et al, 1999), est identifiée dans ce groupe. Les protéoglycanes sont connus pour intervenir dans le processus de minéralisation par leur capacité à lier les ions calcium par leurs charges négatives (Carrino et al, 1997, Fernandez et al, 1997, Fernandez et al, 2001). Dans ce contexte, l'identification d'une protéine liant les protéoglycanes, HAPLN3 (Spicer et al, 2003), est importante. Cette protéine est de plus abondante dans la matrice organique (9^{ème} protéine en terme d'abondance à 5 heures après l'ovulation). Il est aussi à noter la présence dans ce groupe de l'ovomucoïde, un inhibiteur de protéases contenant un domaine Kazal-like et présent en forte abondance dans la coquille (4^{ème} protéine en terme d'abondance à 5 heures après l'ovulation). Cette protéine jouerait un rôle indirect en contrôlant l'activité des protéines de la matrice organique.

 Protéines surabondantes lors de la transformation du carbonate de calcium amorphe en calcite

Dans ce profil, 3 protéines peuvent participer à la minéralisation de la coquille (Tableau 2 de l'article n°4). Parmi celles-ci, **l'ovocléidine-17** est particulièrement notable. Elle est surabondante à ce stade, est une protéine majeure de la coquille (3^{eme} en terme d'abondance quel que soit le stade). Son rôle semble prépondérant car **l'ovocléidine-17** modifie la morphologie des cristaux de calcite *in vitro* (Reyes-Grajeda *et al*, 2004) et des études de modélisations dynamiques ont également montré que cette protéine catalyserait la transformation du carbonate de calcium amorphe en calcite (Freeman *et al*, 2010, Freeman *et al*, 2011), en cohérence avec son profil d'abondance à ce stade où l'ACC est progressivement transformé en calcite.

 Protéines surabondantes durant la formation d'unités cristallines de calcite en accroissement

Dans ce profil, il est observé 16 protéines pouvant jouer un rôle direct ou indirect dans la minéralisation (Tableau 3 de l'article n°4). Parmi celles-ci, il est à noter la présence de l'ovalbumine, une des protéines les plus abondantes dans la matrice organique (4^{ème} et 2^{ème} protéine en terme d'abondance à 6 et 7 heures après l'ovulation). Elle lie le calcium et stabilise le carbonate de calcium amorphe (Pipich et al, 2008, Wang et al, 2009a, Wang et al, 2010). MFGE8 est une deuxième protéine de liaison au calcium, relativement abondante dans la matrice organique (32^{ème} et 20^{ème} protéine en terme d'abondance à 6 et 7 heures après l'ovulation). Elle contient des domaines de liaison au calcium de type EGF-like et a été décrite comme fortement exprimée par l'utérus quand une coquille est en formation (Jonchere et al, 2010, Brionne et al, 2014). L'ovocalyxine-32 est également présente dans ce groupe. Cette protéine est relativement abondante (39^{ème} et 26^{ème} protéine en terme d'abondance à 6 et 7 heures après l'ovulation). Des études ont établi une corrélation entre des polymorphismes du gène de cette protéine et deux mesures phénotypiques de la coquille (épaisseur de la couche mamillaire et orientation des cristaux) (Dunn et al, 2009a, Dunn et al, 2012). Dans ce groupe, est retrouvée la clusterine, une protéine chaperonne, qui du fait de son abondance (14^{ème} et 7^{ème} protéine en terme d'abondance à 6 et 7 heures après l'ovulation) semble avoir un rôle majeur. Cette protéine est connue pour limiter la précipitation prématurée des composants de la matrice organique (Mann et al, 2003). Une phosphatase, LOC428421, est également présente dans ce groupe et modifie le taux de phosphorylation des protéines. Ce dernier influence la cinétique de minéralisation (Hincke and St. Maurice, 1998).

 Protéines surabondantes durant la mise en place d'une orientation privilégiée des cristaux dans la couche palissadique

Un total de 38 protéines pouvant participer à la minéralisation a été mis en évidence dans ce groupe (Tableau 4 de l'article n°4). Parmi celles-ci, **l'albumine**, une des protéines les plus abondantes dans la matrice organique (6^{eme} protéine en terme d'abondance à 16 heures après l'ovulation), présente des capacités de liaison au calcium (Kraghhansen and Vorum, 1993). Deux protéines constitutives des protéoglycanes, **l'ovocléidine-116** et **le glypican-4** sont retrouvées dans ce groupe. **L'ovocléidine-116** est connue pour être un cœur protéique de l'ovoglycan, un dermatane sulfate présent dans la couche palissadique de la coquille (Hincke *et al*, 1999). Elle est abondante à ce stade de la minéralisation (2^{eme} protéine en terme d'abondance à 16 heures après l'ovulation). **Le glypican-4** appartient à la famille des

glypicans qui sont des héparanes sulfates (Filmus *et al*, 2008). Il est relativement abondant à ce stade (20^{eme} protéine en terme d'abondance à 16 heures après l'ovulation). **La cystatine C** est également présente dans ce groupe. Cette protéine, une des plus abondantes de la matrice organique ($8^{\text{ème}}$ protéine en terme d'abondance à 16 heures après l'ovulation), est connue pour être un inhibiteur de protéases à sérine (Hall *et al*, 1995). Ce groupe contient 2 protéines, **l'ovocalyxine-21** et **la peptidylprolylisomérase B**, connues pour être des protéines chaperonnes. **L'ovocalyxine-21** est une protéine spécifique de la coquille contenant un domaine BRICHOS (Gautron and Nys, 2007b). Cette protéine a été trouvée comme étant la plus abondante dans la matrice organique par Mann et collaborateurs (Mann *et al*, 2006) et son transcrit est surexprimé par l'utérus lors de la formation de la coquille (Brionne *et al*, 2014). Elle est abondante à ce stade de minéralisation ($15^{\text{ème}}$ protéine en terme d'abondance à 16 heures après l'ovulation) **La peptidylprolylisomérase B** appartient à la famille des peptidylprolylisomérases. Elles peuvent être considérées comme des protéines chaperonnes (Fischer and Bang, 1985, Fischer *et al*, 1989). Comme l'ovocalyxine-21, cette protéine est abondante à ce stade ($17^{\text{ème}}$ protéine en terme d'abondance à 16 heures après l'ovulation).

• Protéines surabondantes tout au long du processus de calcification de la coquille

Dans ce profil, 12 protéines peuvent avoir un rôle direct ou indirect dans la minéralisation. Parmi celles-ci, il est à noter la présence de deux protéines liant les ions calcium, **EDIL3** (5^{eme} et 4^{eme} protéine en terme d'abondance à 7 et 16 heures après l'ovulation) et **la nucléobindine-2** (16^{eme} et 12^{eme} protéine en terme d'abondance à 7 et à 16 heures après l'ovulation), qui sont présentes principalement à 7 et à 16 heures après l'ovulation. **EDIL3** contient un domaine de liaison au calcium de type EGF-like et son transcrit est fortement exprimé par l'utérus lors de la minéralisation de la coquille (Brionne *et al*, 2014). **La nucléobindine-2** possède 2 domaines de liaison au calcium de type EF-hand et son transcrit est surexprimé par l'utérus lorsqu'une coquille est en cours de formation (Jonchere *et al*, 2010). Ce groupe contient également **l'ovocalyxine-25**, une protéine spécifique de la coquille, relativement abondance à 6, 7 et 16 heures après l'ovulation). Cette protéine semble importante puisqu'elle contient deux domaines inhibiteurs de protéases, un domaine WAP et un domaine Kunitz-like.

A côté de ces protéines impliquées dans le processus de minéralisation, différentes protéines peuvent avoir une fonction antimicrobienne. Elles sont réparties dans chacun des groupes définis précédemment et maintiennent la stérilité de l'œuf.

Conclusion

Cette étude a conduit à l'identification de 216 protéines dans la matrice organique de la coquille d'œuf de poule, dont 175 présentent une abondance différentielle en fonction des différentes étapes de la minéralisation. La fonction de 77 candidats protéiques surabondants lors du dépôt de l'ACC, de sa transformation en calcite, de la mise en place d'unités cristallines de calcite en croissance, du dépôt de cristaux orientés dans la couche palissadique et tout au long de la calcification de la coquille a pu être reliée à la minéralisation. Nous avons représenté dans la Figure 5 de l'article 4 les 21 protéines qui joueraient un rôle prédominant dans le contrôle de ces différentes étapes de minéralisation. Le lysozyme et l'ovotransferrine, présents lors des premiers évènements de minéralisation avec le dépôt d'une phase désordonnée de carbonate de calcium, modifient la morphologie des cristaux de carbonate de calcium in vitro. L'hypothèse que l'ovalbumine et l'ovocléidine-17 stabiliseraient le carbonate de calcium amorphe est confortée par leur abondance et leur présence préférentielle aux stades faisant intervenir l'ACC. EDIL3, MFGE8, l'albumine et la nucléobindine-2 sont des protéines de liaison au calcium et des candidats prometteurs pour la stabilisation de l'ACC ou le contrôle de la morphologie des cristaux tandis que l'hémopexine lie les ions divalents. L'ovocléidine-116, HAPLN3 et le glypican-4 sont associés aux protéoglycanes connus pour leur implication dans la biominéralisation. Des corrélations ont été établies entre des polymorphismes du gène de l'ovocalyxine-32 et des mesures phénotypiques de la coquille. La lysyl oxydase 2 participe à la formation des fibres des membranes coquillières. D'autres protéines pourraient réguler la fonction des protéines intervenant dans la minéralisation. La clusterine, l'ovocalyxine-21 et PPIB sont trois protéines chaperonnes, la cystatine C, l'ovomucoïde, l'ovocalyxine-25 et l'ovocalyxine-32 sont des inhibiteurs de protéases et LOC428451 est une phosphatase

Cette étude a abouti à la rédaction de l'article présenté ci-après

- Article n°4, intitulé « Quantitative proteomics provides new insights into chicken eggshell matrix proteins functions during the primary events of mineralisation and the active calcification phase » a été publié dans *Journal of Proteomics* (Impact factor 3,929)
- Article n°5, intitulé « Data set for the proteomic inventory and quantitative analysis of chicken eggshell matrix proteins during the primary events of eggshell mineralization and the active growth phase of calcification » a été publié dans *Data in Brief*

Ces travaux ont fait l'objet de présentations lors des mêmes congrès internationaux et nationaux auxquels j'ai participé que les travaux de la section 2.1 :

- XIVth European Poultry Conference (23-26/06/2014), présentation affichée (P. Marie)
- 16^{èmes} Journées Françaises de la Biologie des Tissus Minéralisés (14-16/05/2014), présentation orale (P. Marie)

Article n°4 :

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

Contents lists available at ScienceDirect

ELSEVIER



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

Journal of Proteomics

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 B. Rodriguez-Navarro ^c, Yves Nys ^a, Joël Gautron ^{a,*}

^a INRA, UR83 Recherches avicoles, Fonction et Régulation des protéines de l'œuf, F-37380 Nouzilly, France

^b INRA, UMR INRA85, UMR CNRS 7247, Université de Tours, IFCE, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomolécules,

Laboratoire de Spectrométrie de Masse, F-37380 Nouzilly, France

^c Departmento de Mineralogia y Petrologia, Universidad de Granada, 18002 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history: Received 23 March 2015 Received in revised form 11 May 2015 Accepted 29 May 2015 Available online 3 June 2015

Keywords: Chicken Eggshell Biomineralisation Quantitative proteomics Eggshell matrix

ABSTRACT

Eggshell is a bioceramic composed of 95% calcium carbonate mineral and 3.5% organic matrix. Its structural organisation is controlled by its organic matrix. We have used quantitative proteomics to study four key stages of shell mineralisation: 1) widespread deposition of amorphous calcium carbonate (ACC), 2) ACC transformation into crystalline calcite aggregates, 3) formation of larger calcite crystal units and 4) development of a columnar structure with preferential calcite crystal orientation. This approach explored the distribution of 216 shell matrix proteins found at the four stages. Variations in abundance according to these calcification events were observed for 175 proteins. A putative function related to the mineralisation process was predicted by bioinformatics for 77 of them and was further characterised.

We confirmed the important role of lysozyme, ovotransferrin, ovocleidin-17 and ovocleidin-116 for shell calcification process, characterised major calcium binding proteins (EDIL3, ALB, MFGE8, NUCB2), and described novel proteoglycans core proteins (GPC4, HAPLN3). We suggest that OVAL and OC-17 play a role in the stabilisation of ACC. Finally, we report proteins involved in the regulation of proteins driving the mineralisation. They correspond to numerous molecular chaperones including CLU, PPIB and OCX21, protease and protease inhibitors including OVM and CST3, and regulators of phosphorylation.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Eggshell (including the eggshell membrane) is a biomineral composed of 95% calcium carbonate (in the form of calcite) and 3.5% organic matrix (proteins, polysaccharides and proteoglycans). It is a highly organised mineral layer constituted by columnar calcite crystals arising from nucleation sites, or mammillary cores, anchored on organic membranes [1–5]. This natural envelope of the egg constitutes a protective physical barrier against microbial penetration as long as it remains intact and ensures a harmonious development of the chicken embryo in this closed chamber. Avian eggshell is a porous mineral layer resulting from the sequential deposition of its different zones during precisely defined phases in the distal oviduct. The forming egg, with the egg white surrounding the yolk, enters the white isthmus region of the oviduct where the eggshell membranes are deposited. Five hours after the ovulation of the yolk, eggshell calcification is initiated in the red isthmus/uterus part, and lasts about 19 h[5,6]. The initiation of shell formation is followed by the linear deposition of mineral until the process is inhibited. These distinct phases of calcification result in the formation of different layers: the inner mammillary cones, the palisade layer and the cuticle.

The mineralisation process starts by heterogeneous nucleation on specific sites (organic cores also called mammillary knobs or cones), located in a quasi-periodic array on the surface of the outer eggshell membrane, and deposited on the eggshell membranes during the passage of the forming egg through the red isthmus. These organic cores are the seeding sites where calcium carbonate crystal deposition is initiated, beginning with a spherulitic deposition of microcrystals of calcite (the calcium carbonate polymorph of the shell) and leading to a hemispherical nucleation centre for each mammillary knob. These events represent the "birth" of the calcified shell. During the shell formation, as calcite crystals grow in size, they impinge on each other and continue to grow outward, developing into columnar crystal units. As crystal units grow outward, they compete for the available space and only those favourably oriented, that is with the c-axis (their faster growth direction) nearly perpendicular to the shell, are selected and contribute to the outer shell surface developing a preferential orientation of crystals. This 'competitive growth' mechanism explains the development of a

^{*} Corresponding author at: INRA, UR83 Recherches avicoles, 37380 Nouzilly, France. *E-mail address*: joel.gautron@tours.inra.fr (J. Gautron).

columnar ultrastructure of preferentially oriented crystals starting from randomly oriented nuclei [7]. However, amorphous calcium carbonate (ACC) is now recognised as an early and transient non-crystalline precursor phase of calcite or aragonite in the CaCO₃ calcified structures produced by many invertebrates. It represents a common biological mechanism for the fabrication of certain biominerals and allows the growth of single crystals with very complex shapes, for example, sea urchin spicules [8]. In the case of the eggshell, the presence of metastable mineral phases (i.e., ACC) was reported recently and has constituted a major advance to explain how these biomineralisation events are temporally/spatially nucleated and regulated [9]. The ACC mineral first accumulates on eggshell membranes and on specific nucleation sites (mammillary knobs). ACC deposited around these sites dissolves rapidly, providing a continuous supply of ions to form calcite crystals on specific nucleation sites. These units coalesce to form larger crystals in the mammillary layer, and then during the following rapid growth phase they form the compact shell palisade layer made of columnar crystals with preferred orientation. Calcite crystals are consequently formed by the aggregation of ACC particles that support the rapid mineralisation of the eggshell and there is evidence that this non-crystalline form of calcium carbonate is present throughout the phases of shell formation [9].

During these distinct phases, matrix proteins probably play a key role to thermodynamically stabilise this transient form of CaCO₃[9], but also influence the selection of the calcite polymorph into which it is ultimately converted. They should also control the relative growth of crystals along different directions which determines the preferential orientation of calcite crystals in the eggshell surface [4,10]. This interaction leads to the eggshell ultrastructure and consequently contributes to its resulting mechanical properties [1,2,4]. This study used GeLC-MS/ MS analyses combined with label free quantitative analysis to identify and quantify matrix proteins on the same forming eggshell samples as used in our previous study [9]. We assumed that a more abundant protein at a particular stage has a higher probability to be involved in its control. We performed additional bioinformatic analysis to provide a comprehensive report on the potential role of eggshell matrix proteins involved in the primary nucleation (ACC deposition), initiation of mineralisation (calcite crystal formation by aggregation of ACC), formation of larger calcite crystals and then development of the columnar palisade layer with preferred calcite orientation.

2. Materials and methods

2.1. Ethical statement, animal handling and housing

All experiments, including all animal-handling protocols, were carried out in accordance with the European Communities Council Directives concerning the practice for the care and use of animals for Scientific Purposes and the French Ministry on Animal experimentation under the supervision of authorised scientists (authorisation # 7323, delivered by the DDPP, "Direction Départementale de la Protection des Populations d'Indre et Loire-France"). The experimental unit UE-PEAT 1295, where the birds were kept, has permission to rear birds and for the euthanasia of experimental animals (decree No B37-175-1 of August 28th 2012 delivered by the "Préfecture d'Indre et Loire" following the inspection of the Direction of Veterinary Services). The protocol was approved by an ethical committee (comité d'éthique de Val de Loire, officially registered under number 19 of the French national ethics committee for animal experimentation) under agreement number 00159.02.

2.2. Collection of eggshell samples

Sixty brown-egg laying hens (ISA-Hendrix, 48 weeks old at time of sampling) were caged individually and subjected to a cycle of 14 h of light/10 h of darkness. Each cage was equipped with a device for automatic recording of oviposition (time of egg laying). Hens were fed a

layer mash *ad libitum* as recommended by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Eggs were collected after animal's euthanasia either at the initial phase of eggshell mineralisation (5, 6 and 7 h after ovulation, p.o.) when the nucleation sites appear and early mineralisation starts, or during the linear growth phase of rapid calcification (16 h p.o.). Eggs were broken and forming eggshells were washed with water, air dried and stored at -20 °C until protein extraction.

2.3. Extraction of proteins from eggshell samples

Eggshell matrix proteins were extracted as described in [11] with slight modifications. Briefly, the whole eggshell pieces including eggshell membranes were rinsed with 154 mM NaCl solution containing protease inhibitors (2.5 mM benzamidine-HCl, 50 mM amino-ncaproic acid, 0.5 mM N-ethylmaleimide, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) then ground to a fine powder. Eggshell powders were completely demineralised by shaking them with 20% acetic acid overnight at 4 °C. The resulting suspensions were placed in dialysis tubing (cut off 3500 Da), dialysed against demineralised water for 24 h at 4 °C and then lyophilised. Eggshell samples were then shaken overnight at 4 °C using the following solution: 4 M guanidine hydrochloride, 5 mM benzamidine hydrochloride, 0.1 M ɛ-amino-n-caproic acid, 10 mM EDTA, 50 mM sodium acetate and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Samples were then dialysed (cut off 3500 Da) against 0.5 M sodium acetate pH 7.4 for 24 h at 4 °C. Then, samples were centrifuged for 10 min at 2000 g at 4 °C and supernatants were stored at -20 °C until use.

2.4. Sample preparation for MS analyses

Protein concentration in individual samples was determined using the protein DC kit (BioRad, Marnes-la Coquette, France) according to the manufacturer's instructions and using bovine serum albumin as a standard. A total of 24 individual eggshell protein extracts were used. Six samples collected at the same time point were pooled in equal amounts for each time (5 h p.o., 6 h p.o., 7 h p.o. and 16 h p.o.). The four pooled samples 5 h p.o., 6 h p.o., 7 h p.o. and 16 h p.o. (51 µg of proteins/sample) were fractionated on a 4–20% SDS-PAGE gel (8.3 cm \times 7.3 cm \times 1.5 mm). Proteins were stained with Coomassie blue and the entire SDS-PAGE lanes were sectioned into 15 bands for each individual pooled sample (Fig. 1). Excised proteins were in-gel digested with bovine trypsin (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) as previously described [12] and analysed by nanoscale liquid chromatography–tandem mass spectrometry (nanoLC–MS/MS).

2.5. NanoLC-MS/MS analyses

All experiments were performed using a (FT-MS) LTQ Orbitrap Velos Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) coupled to an Ultimate® 3000 RSLC Ultra High Pressure Liquid Chromatographer (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) as previously described [12]. Five microlitres of each sample was loaded into a trap column and desalted. The peptide separation was conducted using a nano-column (Acclaim PepMap $C_{18},\,75~\mu m$ inner diameter \times 50 cm long, 3 µm particles, 100 Å pores). Mobile phases consisted of (A) 0.1% formic acid, 97.9% water, 2% acetonitrile $(\nu/\nu/\nu)$ and (B) 0.1% formic acid, 15.9% water, 84% acetonitrile (v/v/v). The gradient consisted of 4–55% B for 90 min at 300 nl/min flow rate. Data were acquired using Chromelon Software (version 6.8 SR11, Dionex, Amsterdam, The Netherlands) and Xcalibur software (version 2.1; Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). The LTQ Orbitrap Velos instrument was operated in a positive mode in data-dependent mode. Resolution in the Orbitrap was set to R = 60,000. In the scan range of m/z 300–1800, the 20 most intense peptide ions with charge states ≥ 2 were fragmented using Collision Ion Dissociation (CID). Dynamic exclusion was activated for 30 s

with a repeat count of 1. Polydimethylcyclosiloxane ions $(m/z, 445.1200025, (Si(CH_3)_2O)_6)$ were used as lock mass for internal calibration.

2.6. Protein identification and data validation

Raw data files were converted to MGF as previously described [12]. The identification of proteins was established using a MASCOT search engine (v 2.3, Matrix Science, London, UK). The peptide and fragment masses obtained were matched automatically against the chordata section of the nr NCBI database (2132453 sequences, downloaded on 2013/ 05/13). Enzyme specificity was set to trypsin with 2 missed cleavages, using carbamidomethylcysteine, oxidation of methionine and Nterminal protein acetylation as variable modifications. The tolerance of the ions was set to 5 ppm for parent and 0.8 Da for fragment ion matches. Mascot results were incorporated into Scaffold software (version 3.6, Proteome Software, Portland, USA). Peptide identifications were accepted if they could be established as being greater than 95.0% probability, as specified by the Peptide Prophet algorithm [13]. Peptides were considered distinct if they differed in sequence. Protein identifications were accepted if they could be established as being greater than 95.0% probability, as specified by the Protein Prophet algorithm [14] and contained at least two sequence-unique peptides. A false discovery rate was calculated as < 1% at the peptide or protein level. The abundance of identified proteins was estimated by calculating the emPAI using Scaffold Q + software (version 4.3, Proteome Software, Portland, USA).

Additionally, to perform label-free quantitative proteomic analyses based on the spectral counting method, Scaffold Q+ software (version 3.4, Proteome Software, Portland, USA) was used to quantify the proteins at the four different time points of the mineralisation process. All proteins with more than two sequence-unique peptides identified in the database with high confidence levels were considered for protein quantification. To eliminate quantitative ambiguity from protein groups, we ignored all the spectra matching any peptide which was shared between proteins. Thereby, quantification performed with normalised spectral counts was carried out on distinct proteins.

2.7. Statistical, data mining and bioinformatic analyses

The mass spectrometry proteomic data have been deposited into the ProteomeXchange Consortium [15]*via* the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD001450.

Keratins and bovine trypsin were eliminated from the list as they appeared to be contaminants or to result from the digestion process. Protein sequences were aligned to eliminate all redundancies. Protein groups were determined using the Clustal Omega multi-alignment algorithm [16]. Sequences were blasted against the nr NCBI database limited to the *Gallus gallus* taxon using the blastp programme (BLAST + suite) [17]. This was performed using R language (http://cran.r-project.org) and GI, Gene ID identifiers and descriptions were extracted. The resulting file constitutes the non-redundant eggshell proteome (see Supplementary Table 1 in [18]). These protein sequences were compared to proteins already identified in the eggshell or in the uterine fluid and merged in a database. Using BLAST + suite, identified proteins were aligned with those already identified in order to determine common and specific proteins.

Moreover, one way ANOVA was performed for protein abundance to reveal proteins that were significantly different between the four time points of the mineralisation process (p-value < 0.01). The mean abundance per time point of shell calcification (5 h p.o., 6 h p.o., 7 h p.o. and 16 h p.o.), standardised by row, was calculated and used to perform hierarchical clustering. We used an average linkage algorithm from a distance matrix calculated with the Pearson correlation coefficient for the cluster analysis in MeV tool [19]. We produced a heat map and dendrogram showing the different groups of proteins with different abundances according to time points of mineralisation.

Conserved and functional domains were extracted from protein sequences using BioMart (www.ensembl.org/biomart/martview). The predicted function of a protein was checked by literature analysis and



Eggshell matrix proteins

Fig. 1. SDS-PAGE of equal amounts of matrix proteins extracted from forming eggshell collected at four stages of calcification. Lanes were loaded as follows: Lane 1, molecular size markers (MW, size on left); lanes 2–5, forming eggshell sampled at 5 h post ovulation (p.o.), 6 h p.o., 7 h p.o. and 16 h p.o.



Fig. 2. Venn diagram representing the common, shared and specific proteins previously reported in shell and uterine fluid proteomics studies. The entire eggshell [21,23–26,54] and uterine fluid [26,27] protein sequences already described were reduced to two non-redundant lists of 675 and 644 proteins respectively (red and blue circles respectively), which were compared with the 216 proteins revealed in our study (green circle).

the proteins were finally classified in three main putative functions and reported in each individual cluster.

3. Results

Forming eggshell samples were collected at four stages during the eggshell formation which are pivotal to establish the eggshell ultrastructure and crystallographic texture, and consequently its resulting mechanical properties [9]. They corresponded to the initial stages dominated by amorphous calcium carbonate (ACC) deposition on eggshell membranes at 5 h post-ovulation (5 h p.o.), its progressive transformation to form calcite aggregates on mammillary knobs surrounded by ACC particle (6 h p.o.) and the growth of large calcite units surrounded by ACC (7 h p.o.). The last stage corresponded to the formation of the columnar calcite crystals with the progressive development of preferred crystal orientation (16 h p.o.). There is evidence that ACC might be present at the mineralising eggshell surface during the different phases [9]. In order to establish the matrix proteins playing a critical role at each one of the key stage of this mineralisation process, we have extracted proteins from samples which were first fractionated on a SDS-PAGE gel (Fig. 1). The gel was sectioned into 15 individual bands covering the entire gel for the four calcification stages. The resulting 60 bands were analysed by GeLC-MS/MS (with 3 technical replicates) and a total of 261 proteins were identified using the nr NCBI database. Additional bioinformatic analyses allowed the elimination of potential redundancies and determined the corresponding proteins in the G. gallus taxon. A total of 216 non-redundant eggshell proteins were identified (see Supplementary Table 1 in [18]). We compared our list with the previously published proteomes, either eggshell [20-26] or uterine fluid proteomes [26,27]. Out of the 216 proteins, 192 proteins (which represent 88.9% of the identified proteins) had already been identified in eggshell whereas 158 (which represent 73.1% of the identified proteins) had already been identified in uterine fluid (Fig. 2). Moreover, 201 proteins were identified in both milieus and 24 proteins were newly identified eggshell matrix proteins.

Two different methods were applied to discern the relative abundance of the proteins: 1) emPAI from the proteins was calculated at each stage of sample collection (5, 6, 7 and 16 h p.o.) to classify the relative abundance of the different proteins within individual stages and to determine the most abundant proteins (See Supplementary Table 2 in [18]). EmPAI values were also used to determine the number of identified proteins at each individual stage. The number of proteins increased with the stage of shell calcification (91, 132, 178 and 184 with emPAI at 5, 6, 7 and 16 h p.o., respectively). 2) In a second approach, GeLC–MS/ MS analyses, combined with label free quantitative analysis based on a spectral counting method, were used to determine quantitative values depending on the stage of mineralisation for the 216 unique proteins (see Supplementary Table 1 in [18]). ANOVA statistical analysis was performed on the latter and revealed a total of 175 proteins with differential abundance according to the four time points of the mineralisation process. Additional hierarchical clustering analysis (HCA) was then applied to this restricted list of proteins in order to group proteins according to their abundance at a particular stage.

A dendrogram revealed 10 different clusters (Fig. 3), corresponding to different profiles of protein abundances throughout the process of shell mineralisation (Fig. 4). These profiles were associated with the different early mineralisation events which occur during eggshell calcification and were described in our recent in situ study [9]. Potential function(s) of the 175 proteins with differential abundance according to time points of shell mineralisation were assigned according to the literature, data annotations and functional domain databases, with particular emphasis on 77 proteins with potential functions related to the mineralisation process. Eight of them are present in clusters F, I and J (Fig. 3), totalling 27 proteins which are overabundant at both 5 and 6 h p.o. (Table 1). These proteins could be associated with the initiation of eggshell mineralisation, when amorphous calcium carbonate particles cover the entire surface of eggshell membranes. Clusters G and H (Fig. 3), totalling 13 proteins, correspond to proteins that are overabundant only at 6 h p.o., when massive ACC deposit dissolves rapidly to be transformed into calcite aggregates on the mammillary knobs. They contain three proteins related to the mineralisation process (Table 2). Clusters A and C (Fig. 3), totalling 47 proteins, correspond to proteins present at both 6 and 7 h p.o. when larger calcite crystal units are forming on the mammillary knobs and exhibit 16 proteins related to shell mineralisation (Table 3). Cluster E (Fig. 3) contains 70 proteins specifically overabundant at 16 h p.o., when calcite deposition is rapid (0.33 g/h) to form the columnar palisade layer crystals during the active growth phase. The majority of proteins associated with mineralisation (38 proteins) were observed at this later stage of mineralisation (16 h p.o.) (Table 4). Clusters B and D (Fig. 3), totalling 18 proteins, show 12 proteins related to mineralisation (Table 5). They correspond to proteins overabundant at the stages associated with calcite deposition (6–7 to 16 h p.o., *i.e.* throughout the linear phase of shell deposition).

The presence of 35 potentially antimicrobial proteins distributed equally in all clusters was also notable (see Table 2 in [18]). Finally, 81 proteins could not be ascribed to any of these functional groups and were classified as "other or unknown role" (see Table 3 in [18]).

4. Discussion

4.1. Proteomic inventory of eggshell matrix proteins

Proteins and proteoglycans that constitute the shell organic matrix are believed to play a key role in shell formation as shown by in vitro and in vivo observations [1-4] and by analogies with other biominerals [28,29]. This controlled biomineralisation process occurs in a confined space (lumen of the uterus) where ionic concentrations (calcium and bicarbonates) are highly supersaturated relative to calcite (the calcium carbonate polymorph of the chicken mature eggshell) [6]. In a recent study on eggshell formation, we explored early shell mineralisation mechanisms and highlighted the importance of the formation of a transient amorphous calcium carbonate mineral at the initial stage of eggshell mineralisation and we identified the four key time events at the onset and linear phases of shell calcification established by the observation of the structure of the shell (crystallographic texture and ultrastructure) [9]. The current study is complementary, as it aims to characterise the change in eggshell matrix proteins during these phases of shell calcification. We performed a proteomic inventory of the eggshell matrix on the same samples of eggshell in formation. Our study explored the matrix composition of eggshell samples collected mainly during the initiation of mineralisation and we revealed the presence of 24 newly identified proteins (Fig. 2), relative to previous studies which were mainly based on fully mineralised eggshell samples [20,21,23,24,26].



Fig. 3. Hierarchical classification analysis performed on 175 eggshell matrix proteins with differential abundance at four time points of the mineralisation process. Dendrogram (left) and graphs of the ten different clusters (right) representing the variation in protein abundance (vertical axis) collected at 5, 6, 7 and 16 h p.o. (horizontal axis).

Indeed, 20 of the 24 newly identified proteins were more abundant during the initial time points of shell mineralisation (5, 6 and 7 h p.o.) (see Supplementary Table 1 in [18]). The majority of these novel proteins exhibited emPAI indicating low abundance proteins and their activities related to mineralisation are probably limited. Nevertheless, the presence of 2 newly identified proteins with high emPAI has to be noted. *Alpha D-Globin (HBAD)* is detected as highly abundant during the early events of mineralisation and appears as the 18th, 27th and 29th most abundant protein at 5, 6 and 7 h p.o. respectively (see Supplementary Table 2 in [18]). This protein is not present at the later stage (16 h p.o.) when the shell calcification is rapid (0.33 g/h). Label free quantitative and statistical analysis showed that this protein is overabundant at 6 and 7 h when ACC is transformed into calcite aggregates to form calcite crystals units on mammillary knobs. In birds, the alpha-D chain is a minor

haemoglobin component [30] and no functional role related to mineralisation was established. *HIST1H2B7* is a core component of nucleosomes (class H2BN) abundant at all stages of shell mineralisation (33rd most abundant protein at 6 h p.o.), but there is no statistical difference between calcification stages (p = 0.08). Histone members are important in the antimicrobial defences of the chick reproductive system during follicle development in the ovary and egg formation in the oviduct [31].

4.2. Protein profiling associated with key shell calcification events

Our aim was to reveal proteins with higher abundance at the key stages of shell calcification. We obtained quantitative data for 216 proteins and determined 175 proteins with differential abundance



Fig. 4. Classification of eggshell matrix proteins according to the four time points of the mineralisation process and to their putative functions. Clusters were grouped to emphasise the proteins overabundant at 1) the primary events of shell mineralisation (deposition of amorphous form of CaCO₃ on whole eggshell membrane), 2) the ACC transformation into calcite aggregates on nucleation site, 3) the formation of larger calcite crystal, 4) the development of columnar calcite crystal with preferred orientation and 5), throughout the calcification process. *In silico* analysis (BioMart and literature analysis) was performed to determine the function of the proteins revealed at a particular stage of the process of mineralisation (blue), the proteins with an indirect role *via* regulation of activity or maturation of proteins driving mineralisation (red), the antimOicrobial proteins (green), and proteins with other or unknown roles (white). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Proteins related to mineralisation and overabundant during the earliest events of shell calcification (deposition of disordered form of CaCO₃ on eggshell membrane).

Potential functions	Symbols	Accession IDs ^a	Description	Clusters	emPAI values (hierarchical ranking)	
					5 h p.o.	6 h p.o.
Direct role in mineralisation	LOXL2	419533	Lysyl oxidase-like 2, eggshell membrane protein, collagen fibre formation	Ι	7.57 (7)	4.46 (13)
	CA2	396257	Carbonic anhydrase II, enzyme able to transform CO ₂ into HCO ₃	J	0.23 (36)	0.22 (65)
	LYZ	396218	Lysozyme, egg white protein, modifies calcite crystal morphology in shell	Ι	12894 (1)	9999.9(1)
	OVOT	gi 83754919	Ovotransferrin, egg white protein, able to modify calcite crystal morphology in shell	Ι	928.57 (2)	1482.5 (2)
	HPX	419076	Hemopexin, binds heme and divalent ions	I	2.87 (12)	2.76 (20)
	HAPLN3	415495	Hyaluronan and proteoglycan link protein 3, proteoglycan binding properties	J	4.98 (9)	7.30 (11)
Indirect role in mineralisation	OVM	416236	Ovomucoid, serine protease inhibitor, Kazal-like domains	Ι	21.84 (4)	15.46 (7)
	OIH	416235	Ovoinhibitor, serine protease inhibitor, Kazal-like domain	F	0.99 (20)	1.76 (23)

^a Accession IDs are Entrez Gene IDs when available or protein sequence GI.

according to the four time points of the shell calcification process (see Supplementary Table 1 in [18]). We evaluated this relative abundance between stages using the frequency of appearance of peptides revealed by GeLC-MS/MS combined with label free quantitative analysis. We paid particular attention to 77 of them, which exhibited potential functions associated with shell mineralisation. We classified these proteins into various groups corresponding to the primary events of shell mineralisation characterised by predominant ACC deposition, its transformation into calcite aggregates, the formation of larger calcite crystal units, the development of columnar calcite crystals with preferred orientation and finally the presence throughout the stages of calcification (Fig. 4). We then combined these data with the emPAI values in order to discern the most abundant proteins at each stage which should correspond to the most active proteins (see Supplementary Table 2 in [18]). The following discussion focuses on these groups of eggshell matrix proteins and their potential role in relation to shell mineralisation (Tables 1–5, Fig. 4). We distinguished proteins having a direct involvement in shell mineralisation (mineralising proteins, able to bind calcium or divalent ions) from proteins indirectly related to the calcification process (involved in the regulation of proteins driving mineralisation). In order to discern proteins with a key role during the mineralisation process, 21 quantified major eggshell matrix proteins with potential key roles associated with shell mineralisation and showing variations in their abundance according to the different stages are represented in Fig. 5.

4.2.1. Overabundant proteins during primary events of shell mineralisation

Proteins described in this group (Table 1, Fig. 4) corresponded to 27 proteins which were overabundant at 5 h p.o. or to both 5 and 6 h p.o. (clusters F, I and J, Fig. 3). They correspond to the earliest stages of shell formation when the egg enters the red isthmus/uterus part of the oviduct and a massive accumulation of ACC particles occurs at the entire surface of the forming shell. The eggshell weight is very low at this stage (0.18 g) compared to the final weight of the complete shell (about 5 g) and consists of eggshell membrane fibres and organic-rich rounded structures (mammillary knobs) [4,9]. Lysyl oxidase like 2 (LOXL2), overabundant at this stage, is a copper-sensitive enzyme that is associated with the formation of collagen cross-links. Collagen like fibres are eggshell membrane components and lysyl oxidase like 2 is an extracellular protein which can be detected in the eggshell membranes [32,33]. Eggshell membranes were present in all collected eggshell samples. The samples collected at this earliest stage of shell formation were mainly constituted of eggshell membranes compared to later samples which included both eggshell membranes and calcified material. Consequently, the presence in this group of LOXL2 is related to the formation of shell membranes which are the template necessary for shell mineralisation. We also identified carbonic anhydrase II (CA2) in this group, an enzyme which catalyses the conversion of carbon dioxide in bicarbonate ions using water molecules [34]. Therefore, this enzyme might supply bicarbonate ions from uterus cells to the lumen then transform bicarbonate to carbonate during the mineralisation process to form the calcium carbonate [35,36].

The presence of metastable ACC mineral at this stage suggests the need for additional molecules to thermodynamically stabilise the transient ACC [9]. In this context, we paid particular attention to *lysozyme* (LYZ) and ovotransferrin (OVOT), previously identified in eggshells and shown to modify crystal morphology in vitro[11,37]. They showed high emPAI at 5 h p.o. (12894 for lysozyme and 929 for ovotransferrin, the 1st and 2nd most abundant proteins respectively). Their presence in this group is in accordance with their previous identification in the inner parts of shell (eggshell membranes and mammillary knobs) [11, 37] and in the uterine fluid during the initiation phase of shell calcification for ovotransferrin [27]. LYZ is the most abundant protein, which was observed in our study at the four time points of shell calcification (Fig. 5). Calcite crystals grown in vitro in the presence of lysozyme exhibited altered crystal morphology only at high concentrations [37]. Its role in the stabilisation of ACC has been investigated but remains controversial. Lysozyme from eggshells of quail did not induce the precipitation of ACC under in vitro conditions [38]. However, metastable ACC particles were obtained in vitro in the presence of lysozyme from chicken egg white [39,40]. Lysozyme considerably decreased the average diameter of the metastable ACC particles and promoted a network of associated particles and the protein was incorporated into the precipitate [39]. In addition, lysozyme-ACC particles reorganised exclusively into crystalline calcite [39,40]. Conversely, lysozyme was shown to be ineffective in the stabilisation of ACC [41].

A similar role might be ascribed to *OVOT* which was shown to affect calcite crystal morphology at low concentrations [11] and to *hemopexin* (*HPX*) which exhibited divalent ions binding properties [42] (Fig. 5). *HPX* is the 12th most abundant protein at this stage and these two proteins are overabundant during the primary events of shell mineralisation. The presence of *HPX* in this group is in accordance with its previous identification in uterine fluid during the initiation stage of shell mineralisation [27].

Proteoglycans are major actors in calcification in biomineralisation processes and various representatives have been detected in eggshells [43–46]. These macromolecules combine a protein core with negatively charged complex polysaccharides, which highly interact with calcium [47]. They are thought to participate in eggshell mineralisation. We identified *Hyaluronan* and *Proteoglycan LiNk protein 3 (HAPLN3)* in this group as a protein with proteoglycan binding properties [48]. *HAPLN3* is abundant (emPAI 4.98 and 7.30, 9th and 11th most abundant protein at 5 and 6 h p.o.) indicating a potential role in the mineralisation process (Table 1, Fig. 5). This protein has also been revealed amongst the list of 18 proteins suspected to be present in the mammillary cones [49].

Ovomucoid (OVM) and *ovoinhibitor (OIH)* are two protease inhibitor proteins containing Kazal-like domains which were overabundant at 5 h p.o. Nevertheless, *OVM* remains an abundant eggshell matrix protein at all stages of shell mineralisation (4th, 7th, 11th and 26th most abundant at 5, 6, 7 and 16 h p.o., Fig. 5). These proteins would have an

Proteins related to mineralisation and overabundant during ACC transformation into calcite aggregates on nucleation sites.

Potential functions	Symbols	Entrez gene IDs	Description	Cluster	emPAI value (hierarchical ranking) at 6 h p.o.
Direct role in mineralisation	OC-17	100313508	Ovocleidin-17, major eggshell matrix protein, interacts with calcite	Н	409.39 (3)
	CDH1	415860	Cadherin 1, cell adhesion protein, calcium binding protein	Н	0.12 (80)
Indirect role in mineralisation	TMPRSS9	428320	Transmembrane protease, serine 9, serine protease	Н	0.03 (114)

indirect role in the calcification process by controlling the activity of eggshell matrix proteins, either by inhibiting protein degradation or by modifying the maturation of precursor proteins [27,36,50].

4.2.2. Overabundant proteins during ACC transformation into calcite aggregates

This stage corresponds to 6 h p.o., when the forming eggshell weight has increased by 0.1 g to reach 0.28 g. This increase is the result of ACC accumulation and its progressive transformation to form calcite aggregates on the specific organic mammillary knobs which are the "nucleation sites" of the calcitic eggshell. Thirteen proteins were found to be overabundant at this stage (clusters G and H, Fig. 3), but the functions of only three of them were related to shell mineralisation (Table 2, Fig. 4).

Ovocleidin-17 (*OC-17*) appears as overabundant at this stage, confirming previous observations in the uterine fluid [27]. *OC-17* is an abundant eggshell matrix protein (40 μg/g of shell) distributed throughout the entire shell, but concentrated in the mammillary bodies [3]. This protein is the 3rd most abundant eggshell matrix protein whatever the stage in this study, and its role appears to be pivotal (Fig. 5). Indeed, *OC-17* presents a C-type lectin domain [51], like other homologous eggshell matrices identified in ostrich (struthiocalcin-1 and -2) [52], goose (ansocalsin) [53], rhea (rheacalcin-1 and -2) and emu (Dromaiocalcin-1 and -2) [54] shells. Molecular dynamic simulations suggest that *OC-17* can catalyse the transformation of ACC into calcite [55,56]. In addition, other C-type lectin proteins were identified in organic matrices from other biomineralisation systems: perlucin in abalone shells and

Table 3

Proteins related to mineralisation and overabundant when larger calcite crystal units are formed. Proteins potentially involved in both direct and indirect roles in mineralisation are underlined.

Potential functions		Symbols	Accession IDs ^b	Description	Clusters	emPAI value (hierarchical	s ranking)
						6 h p.o. ^a	7 h p.o.
Direct role in mineralisation	Calcium binding proteins	OVAL	gi 28566340	Ovalbumin, major egg white protein, interacts with calcite	С	80.05 (4)	4705.4 (2)
		MFGE8	415494	Milk fat globule-EGF factor 8 protein, calcium binding protein	С	1.03 (32)	13.74 (20)
		CALM	395855	Calmodulin, calcium binding protein	С	0.25 (60)	1.48 (66)
		SPARC	386571	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin), calcium binding properties	A	0.25 (59)	1.18 (77)
		CALRET	<u>gi </u> 44969651	Calreticulin, calcium binding properties	A	0.08 (93)	0.45 (114)
		ANXA5	428767	Annexin A5, calcuim binding protein	С	0 (n.d.)	0.38 (124)
	Genetic correlation	OCX32	<u>gi </u> 257357680	Ovocalyxin-32, eggshell matrix protein related to eggshell quality traits	<u>C</u>	0.6 (39)	9.43 (26)
	Proteoglycan binding	SERPIND1	395877	Serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1, glycoaminoglycans binding properties	<u>C</u>	<u>0 (n.d.)</u>	0.24 (148)
	Collagen fibres	COL10A1	100858979	Collagen, type X, alpha 1, potential fibrous protein	С	0.31 (51)	2.12 (52)
		COL2A1	395069	Collagen, type II, alpha 1, potential fibrous protein present in eggshell membranes	С	0.03 (120)	0.41 (120)
Indirect role in mineralisation	Molecular chaperones	CLU	395722	Clusterin, molecular chaperone	С	4.41 (14)	91.32 (7)
		CALR	<u>gi </u> 44969651	Calreticulin, chaperone molecule	A	0.08 (93)	0.45 (114)
		PPIC	768427	Peptidylprolyl isomerase C (cyclophilin C), accelerates protein folding	А	0.26 (57)	0.92 (87)
		DNAJB6	420448	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6, chaperone molecule	С	0.11 (84)	0.38 (125)
	Phosphatase	LOC 428451	428451	Prostatic acid phosphatase-like, removes a phosphate group on amino acids	С	0.88 (34)	33.77 (12)
	Protease inhibitors	SERPINF2	100857105	Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 2, serine protease inhibitor	С	1.73 (24)	12.15 (22)
		OCX32	<u>gi </u> 257357680	Ovocalyxin-32, eggshell matrix protein, protease	<u>C</u>	0.6 (39)	9.43 (26)
		<u>SPARC</u>	386571	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin), protease inhibitor, Kazal-like domain	<u>A</u>	0.25 (59)	<u>1.18 (77)</u>
		OVST	396151	Ovostatin, multi-classs protease inhibitor	С	0.18 (70)	1.9 (53)
		SERPIND1	395877	Serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1, serine protease inhibitor	<u>c</u>	<u>0 (n.d.)</u>	0.24 (148)

^a n.d.: not determined.

^b Accession ids are Entrez Gene IDs when available or protein sequence GI.

Proteins related to mineralisation and overabundant during the development of columnar calcite crystals with preferred orientation. Proteins potentially involved in both direct and indirect role in mineralisation are underlined.

Potential functions		Symbols	Entrez gene IDs	Description	Cluster	emPAI values (hierarchichal ranking)
						at 10 ll p.0.
Direct role in	Calcium binding proteins	ALB	396197	Albumin, plasma protein, calcium binding properties	E	1489.3 (6)
mineralisation		SDF4	419423	Stromal cell derived factor 4, calcium binding protein	E	26.69 (40)
		NPNT	422535	Nephronectin, calcium binding protein	E	20.45 (50)
		FSTL1	395349	Follistatin-like 1, calcium binding properties	E	17.93 (57)
		PROS1	418430	Protein S (alpha), calcium binding protein	E	3.52 (123)
		NID1	395531	Nidogen 1, calcium binding properties	E	0.90 (179)
		GSN	395774	Gelsolin, calcium binding protein	E	7.45 (93)
		CDH2	414745	Cadherin 2, calcium binding protein	E	6.21 (104)
		ANXA2	396297	Annexin A2, calcium binding protein	E	5.20 (111)
		FAM20C	416445	Family with sequence similarity 20, member C, calcium binding properties	E	2.12 (153)
	Proteoglycan or proteoglycan binding	OC-116	395256	Ovocleidin-116, eggshell matrix protein, core protein of dermatan sulfate proteoglycan	E	7167.8 (2)
	proteins	GPC4	422234	Glypican 4, heparan sulfate proteoglycan	E	64.65 (20)
		TSKU	419088	Tsukushi small leucine rich proteoglycan homolog	E	8.86 (83)
		HSPG2	429806	Heparan sulfate proteoglycan 2, proteoglycan	E	0.28 (184)
		SERPINF1	417561	Pigment epithelium-derived factor precursor, glycoaminoglycans binding properties	E	18.27 (53)
		CHRD	395828	Chordin, proteoglycan binding protein	Е	4.50 (114)
		LOC 100859439	100859439	Syntenin-2-like, binds to proteoglycans	E	3.97 (120)
	Others roles	SPP1	395210	Osteopontin, eggshell matrix protein, mineralisation inhibitor	Е	7.14 (96)
		CA4	417647	Carbonic anhydrase IV, enzyme able to transform CO_2 into HCO_3^-	Е	7.80 (89)
	Collagen fibres	COL6A2	396292	Collagen, type VI, alpha 2, potential fibrous protein present in eggshell membranes	E	2.96 (131)
		COL17A1	396503	Collagen, type XVII, alpha 1, potential fibrous protein present in eggshell membranes	E	1.07 (174)
Indirect role in	Proteases and protease	CST3	396497	Cystatin C, cysteine protease inhibitor	Е	358.46 (8)
mineralisation	inhibitors	SERPINI1	425002	Serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1, serine protease inhibitor	Е	29.86 (36)
		SERPINE2	424805	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2, serine protease inhibitor	E	21.80 (46)
		SERPING1	423132	Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, serine protease inhibitor	E	7.83 (87)
		IGFBP7	422620	Insulin-like growth factor binding protein 7, binds insulin-like growth factors, protease inhibitor, Kazal-like domains	Е	21.12 (47)
		FSTL1	395349	Follistatin-like 1, protease inhibitor, Kazal like domains	Е	17.93 (57)
		FST	396119	Follistatin, protease inhibitor, Kazal-like domain	E	7.33 (95)
		CTSD	396090	Cathepsin D, aspartic protease	E	12.50 (71)
		CPE	422424	Carboxypeptidase E, peptidase	E	8.20 (86)
		HGFAC	422876	HGF activator, serine protease	E	3.05 (127)
		DPP7	417297	Dipeptidyl-peptidase 7, serine peptidase	E	2.31 (146)
		PDIA3	373899	Protein Disulfide Isomerase Family A, member 3, cysteine protease	E	2.24 (149)
	Molecular chaperones	OCX21	419515	Ovocalyxin-21, eggshell matrix protein, BRICHOS domain, chaperone protein	Е	92.39 (15)
		PPIB	396447	Peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B), accelerates protein folding	Е	67.18 (18)
		DNAJC3	418787	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3, chaperone molecule	E	24.32 (42)
		HSPA5	396487	Heat shock 70 kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78 kDa), molecular chaperone	E	14.59 (61)
		TOR1B	417191	Torsin family 1, member B (torsin B), potential molecular chaperone	E	8.98 (82)
	Phosphatases and kinases	PTPRF	424568	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, F, removes a phosphate group	E	5.08 (112)
		FAM20C	416445	Family with sequence similarity 20, member C, kinase protein with calcium binding properties	E	2.12 (153)

spicule matrix proteins in urchins [57–59]. Of these, the role of spicule matrix protein 50 (SM-50) on calcium carbonate mineralisation has been investigated [58] and the glycine rich domain of the protein was reported to be involved in ACC stabilisation. This evidence and the fact that this protein is overabundant at this stage reinforced its involvement in the transformation of ACC mineral deposits into calcite aggregates.

driving mineralisation. Both proteins exhibited very low abundance emPAI, suggesting a limited role in the eggshell biomineralisation process.

4.2.3. Overabundant proteins when larger calcite crystal units are formed

At this step, eggshell weight is of 0.39 g. Larger calcite crystal units are growing on mammillary knobs to form the mammillary layer of the eggshell. ACC is suspected to remain present at the mineralisation front during this stage. A total of 47 proteins (clusters A and C, Fig. 3) were found to be overabundant at this particular stage, 6 to 7 h after

In this cluster, we observed another protein with calcium binding properties (*cadherin 1 (CDH1*)) [60,61] and a serine protease, *Transmembrane protease*, *serin 9 (TMPRSS9)*, which might affect proteins

Proteins related to mineralisation and overabundant throughout the process of shell formation (6-7 to 16 h).

Potential function		Symbols	Accession	Description	Clusters	emPAI valu	es(hierarchical ranking)	
			IDs ^a			6 h p.o. ^b	7 h p.o.	16 h p.o.
Direct role in mineralisation	Calcium binding proteins	EDIL3	427326	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3, calcium binding protein	В	21.8 (5)	789.5 (5)	3023 (4)
		NUCB2	423071	Nucleobindin 2, calcium binding protein	В	0.59 (40)	23.51 (16)	138.8 (12)
	Proteoglycans or proteoglycan	GPC1	424770	Glypican 1, heparan sulfate proteoglycan	В	0 (n.d.)	0.47 (112)	2.06 (155)
	binding proteins	VTN	395935	Vitronectin, cell adhesion molecule, proteoglycan binding properties	D	0.12 (83)	0.72 (96)	3.79 (121)
		FN1	396133	Fibronectin 1, proteoglycan binding properties	В	0 (n.d.)	0.44 (117)	4.15 (117)
	Collagen fiber formation	PLOD1	419485	Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1, collagen fibres formation	В	0.12 (81)	3.17 (43)	13.11 (69)
		PLOD2	424882	Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2, collagen fibres formation	В	0.04 (112)	1.23 (73)	8.76 (84)
Indirect role in mineralisation	Protease and protease inhibitors	LOC 771972	771972	Ovocalyxin-25, eggshell matrix protein, protease inhibitor domains	D	1.29 (29)	6.52 (31)	42.47 (27)
		CTSB	396329	Cathepsin B, cysteine protease	В	0.05 (108)	0.80 (90)	7.48 (92)
	Phosphatase	ACPP	776390	Acid phosphatase, prostate, removes a phosphate group on amino acids	В	0 (n.d.)	0.60 (102)	10.83 (76)
	Molecular chaperones	P4HB	374091	Prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide, chaperone protein	В	0 (n.d.)	0.35 (128)	2.15 (151)
		HYOU1	428251	Hypoxia up-regulated 1, chaperone protein	В	0 (n.d.)	0.31 (137)	1.10 (173)

^a Accession IDs are Entrez Gene IDs when available or protein sequence GI.

^b n.d: not determined.

ovulation and the functions of 16 of them showed properties suggesting possible involvement in shell mineralisation (Table 3, Fig. 4).

Ovalbumin (OVAL) had been identified previously in the eggshell matrix [62] and its role in calcium carbonate formation and ACC

stabilisation has been investigated [63–66]. Calcium is bound by ovalbumin and this accumulation creates a nucleation centre for the minerals [64]. A schematic representation of calcium carbonate mineralisation in the presence of ovalbumin has been proposed [63]. Calcium ions



Fig. 5. Schematic representation of the sequential events of mineralisation and major matrix proteins at four time points of shell mineralisation. Size of characters is relative to their level in the eggshell extract (hierarchical ranking of the emPAI value) at individual stages. Overabundant proteins at each stage are mentioned in red and were determined using a spectral counting label free quantitative method and statistical analysis (ANOVA and HCA).

are bound to the protein by complexation through acidic groups leading to protein rearrangements. The calcium cations are the starting points for the subsequent formation of ACC nuclei which then undergo a series of phase transitions to the stable crystalline polymorphs [64]. The ability of *OVAL* to stabilise unstable calcium carbonate phases was further confirmed using *in vitro* experiments [65,66]. In our study, we observed that ovalbumin, which is overabundant at 7 h p.o., is a major protein with high emPAI values at all stages (5th, 6th, 2nd and 7th most abundant protein at 5, 6 and 7 and 16 h p.o. respectively, Fig. 5). Consequently, we suspected that *OVAL* is one of the major proteins involved in shell formation and contributes to the formation of metastable ACC and to control calcite crystal morphology and size.

A similar role could be ascribed to five additional calcium binding proteins. Milk Fat Globule-EGF factor 8 protein (MFGE8) contains two EGF-like domains. MFGE8 is overabundant at 7 h p.o., in accordance with its previous identification in uterine fluid during the initiation of mineralisation [27] (Fig. 5C). Its presence as a fairly abundant protein at the different stages of shell calcification (45th, 32nd, 20th and 31st most abundant emPAI at 5, 6 and 7 and 16 h p.o. respectively) and the recent report that it is highly expressed in the uterus when a shell is undergoing calcification [36,50] provide strong evidence in support of the functional role of this protein in the chicken eggshell calcification process. Calmodulin (CALM) and Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin) (SPARC) are two proteins which are overabundant in this group and contain calcium binding EF-hand domains. Calmodulin can be defined as a calcium sensor. Calcium binding induces conformational changes and calmodulin is able to bind and regulate the function of many target proteins [67]. In bone, SPARC is involved in bone remodelling. It is secreted by various cellular types, including osteoblasts and binds collagen isoforms (I, III, IV and V) [68,69]. This protein is described as a linking protein between collagen and crystal in bone [69]. Their emPAI values are moderate (66th and 77th respectively out of 178 proteins with emPAI values at 7 h p.o.), and there is no evidence of a role for these proteins in shell formation. Calreticuline (CALR) and annexin A5 (ANXA5) are shown to bind calcium without specific calcium binding domains [70,71]. According to its calcium binding property, calreticulin can play a role in calcium homeostasis by sequestering calcium in the endoplasmic reticulum where this protein acts as a molecular chaperone [72]. These two proteins are overabundant at this stage but their emPAI values are very low, indicating that they might originate from cell desquamation of the oviduct, as suggested previously [20].

Ovocalyxin-32 was initially revealed in eggshell and is abundant at the 7 h p.o. stage (26th most abundant protein, Fig. 5C). Different studies *in vivo* demonstrated correlations between *ovocalyxin-32 (OCX32)* gene polymorphism and different eggshell quality phenotypes, such as eggshell strength or mammillary layer thickness [73–77], which support its involvement in the control of the crystal texture of the eggshell. Its overabundance at 7 h p.o. is in accordance with its previous identification in uterine fluid during the initiation of mineralisation [27] and its presence in the basal part of the eggshell [78]. *SERPIND1* has been shown to bind proteoglycans [79,80]. However, its low emPAI at 7 h seems to indicate a limited role for this protein in eggshell calcification.

Finally, we report the presence of two isoforms of collagen (*collagen*, *type X*, *alpha 1* (*COL10A1*) and *collagen*, *type II*, *alpha 1* (*COL2A*)), which are eggshell membrane components.

In this group, we also identified proteins potentially involved in the regulation of the activity of proteins driving mineralisation. The activities of these proteins might rely on an interaction with proteins directly involved in controlling the calcification process.

Of particular interest are proteins involved in protein-protein interactions to ensure the proper folding of eggshell matrix proteins and regulation of their activity. Amongst them, *clusterin (CLU)*, a chaperone protein was identified in eggshell and was suspected to prevent the premature aggregation and precipitation of eggshell components during calcification [81]. This protein is abundant at all stages (29th, 14th, 7th and 9th most abundant protein at 5, 6, 7 and 16 h p.o. respectively, Fig. 5). Three additional chaperone molecules are present in this group. *Calreticulin (CALR)*, previously mentioned for its calcium binding properties, is also an endoplasmic reticulum chaperone protein. The protein proceeds in cooperation with calnexin and ER57p in the calreticulin/calnexin cycle [72]. *Peptidylprolyl isomerase C (PPIC)* is a member of the peptidyl isomerase family, which has been reported as a folding protein [82]. *DNAJB6* belongs to the subfamily B of DNAJ which has been shown to prevent protein aggregation [83].

We also identified *LOC428451* as being overabundant in this group in accordance with its presence in the uterine fluid at the onset of calcification [27] and in mammillary cones [49]. This protein exhibits high emPAI (12th most abundant protein at 7 h p.o., Fig. 5C). This protein is able to remove phosphate groups, suggesting that it has an important role in the degree of phosphorylation of matrix proteins to modulate the kinetics of mineralisation [84].

Five protease inhibitors (*SERPINF2*, *ovocalyxin-32* (*OCX32*), *SPARC*, *ovostatin* (*OVST*) and *SERPIND1*) were also highlighted in this group. *SERPINF2* and *OCX32* are fairly abundant at this stage (emPAI of 12.15 and 9.43, 22nd and 26th most abundant proteins at 7 h p.o. respectively). *SERPINF2* was also reported to be over-expressed in the uterus during eggshell calcification [50]. *OCX32* contains a latexin domain and has been shown to be able to inhibit bovine carboxypeptidase [78,85]. *SPARC* exhibits Kazal-like domains and therefore can be considered as a protease inhibitor. *OVST* has been reported to inhibit all four classes of peptidase by a unique trapping mechanism [86]. The presence of ovostatin in cluster C (proteins overabundant at 7 h p.o.) is in accordance with its previous identification in uterine fluid during the initiation of mineralisation [27].

4.2.4. Overabundant proteins during development of the columnar palisade layer with preferred orientation of calcite

The rapid growth phase of shell calcification starts 10 h p.o. and lasts about 12 h. During this phase, 0.33 g of calcite is deposited per hour and large columnar calcite crystal develop with preferred orientation. We collected forming eggshell samples in the middle of this active phase (16 h p.o.) and we revealed 70 overabundant proteins at this stage (cluster E, Fig. 3). The functions of 38 of them show properties suggesting a possible involvement in mineralisation (Table 4, Fig. 4). Some proteins present at very low concentrations might also result from passive adsorption in the mineral (oviduct desquamation) as suggested in previous proteomic studies [20].

Albumin (ALB) is overabundant at this stage, it binds calcium [87] and its emPAI determination showed that this protein is one of the major eggshell matrix proteins whatever the stage of shell formation (13th most abundant protein at 5 h and 6th at 6, 7 and 16 h, Fig. 5). Its overabundance at 16 h is in accordance with its previous observation at the growth and terminal phases of mineralisation in the uterine fluid [26,27]. Nine additional calcium binding proteins are present in this group. Amongst them, stromal cell derived factor 4 (SDF4), nephronectin (NPNT) and follistatin-like 1 (FSTL1) are fairly abundant proteins (40th, 50th and 57th most abundant proteins at 16 h with emPAI values of 26.7, 20,5 and 17,9 respectively). SDF4 and FSTL1 exhibit EF-hand calcium-binding domains and NPNT presents EGF-like calcium-binding domains. The latter is also present in proteins with low abundance (protein S (alpha) (PROS1) and nidogen 1 (NID1)). Gelsolin (GSN), cadherin 2 (CDH2), annexin A2 (ANXA2) and FAMily with sequence similarity 20, member C (FAM20C) which have been shown to exhibit calcium binding properties [88–91]. These four proteins can be considered as minor actors as they present low emPAI values at 16 h p.o.. Both FSTL1 and FAM20C were reported to be over-expressed in the uterus when a shell is calcifying [50].

Numerous pieces of evidence suggest that one of the most important proteins related to chicken eggshell biomineralisation is *ovocleidin-116* (*OC-116*). This eggshell matrix protein corresponds to the protein core of a dermatan sulfate proteoglycan mainly present in the palisade region of the shell [92]. Ovocleidin-116 was reported as over-expressed

in the uterus during eggshell calcification [36,50]. *OC-116* is overabundant at 16 h p.o. and remains an important eggshell protein at other stages of mineralisation (19th, 27th, 9th and 2nd highest emPAI at 5, 6, 7 and 16 h respectively, Fig. 5). The overabundance of this protein at 16 h p.o. is in accordance with previous observations demonstrating its high concentration in the uterine fluid at the active calcification growth phase [27,92].

Another core protein of shell proteoglycan suspected to play a role in shell biomineralisation at this stage is *Glypican 4 (GPC4)*. GPC4 belongs to the glypican family [93], which are heparan sulfate proteoglycans. This protein is only present at 16 h p.o. (Fig. 5D) and presents a high emPAI at this stage (emPAI value of 64.7, the 20th most abundant protein) in accordance with the expression of glypican 4 gene during eggshell calcification [94]. The number of uterine cells expressing this gene increases as the egg progresses in the uterus to reach a plateau at 8 h post entrance until the end of the active growth phase. Its expression is stimulated by mechanical stress induced by the presence of the egg in the uterus. Two other proteins present at low levels (tsukushi (TSKU) and heparan sulfate proteoglycan 2 (HSPG2)), have been described as cores of proteoglycans [95,96]. Tsukushi (TSKU) belongs to the small leucine-rich repeat proteoglycan (SLRP) family [95] and has been reported as overexpressed in the uterus during eggshell mineralisation [36]. Finally, the presence of three proteoglycan binding proteins is noteworthy (SERPINF1, chordin (CHRD) and syntenin-2-like (LOC100859439)[97,98]). The function of these proteins in relation with calcification process is not clearly stated and only SERPINF1 is fairly abundant at this stage (53rd most abundant protein).

Osteopontin (SPP1) is also a favourite candidate in the control of shell mineralisation. This eggshell matrix phosphoprotein [99] is observed to have a relatively abundant emPAI (7.1) at this stage. Phosphoprotein required special proteomic experiments to be detected, and osteopontin was previously reported in eggshell using a phosphoproteome survey [21]. Our conditions might underestimate its concentration but localisation studies show that SPP1 is highly concentrated in the palisade layer [3]. Osteopontin is a major actor in shell mineralisation, as it influences the kinetics of calcium carbonate precipitation and modifies crystal morphology *in vitro*[100]. Defects in eggshell, abnormalities and cracks have been linked to an abnormal expression of the osteopontin gene [101]. Moreover, this protein was reported as over-expressed in the uterus when a shell is calcifying [36,50]. The expression of the osteopontin gene is also regulated by mechanical strain consecutive to the presence of an egg in the uterus [102].

Carbonic anhydrase IV (CA4) was observed at an intermediate abundance level (89th most abundant protein at 16 h p.o. with emPAI value of 7.8) and might be involved to supply bicarbonate ions or in mineralisation by providing carbonate ions.

Finally, we report the overabundance of two isoforms of collagen fibres which are also eggshell membrane components (*Collagen, type VI, alpha 2 (COL6A2)* and *Collagen, type XVII, alpha 1 (COL17A1)*).

Besides these proteins that we could relate directly to the mineralisation process, we identified additional proteins in this group involved in the regulation of the activity of proteins driving mineralisation as previously described.

This study reported the overabundance of 12 proteases and protease inhibitors that could potentially control the calcification process, either by degrading proteins or by modifying the processing of protein maturation. *Cystatin C (CST3)* appears to be an important candidate for protein regulation as it is abundant throughout all stages of mineralisation (10th most abundant protein at 5, 6 and 7 h p.o., and 8th most abundant at 16 h p.o., Fig. 5). *CST3* is a cystein protease inhibitor [86] previously identified in proteomic uterine fluid surveys [26,27]. *SERPINI1, SERPINE2* and *SERPING1* belong to the SERPIN family and are serine protease inhibitors. Only *SERPINI1* and *SERPINE2* are fairly abundant at this stage (36th and 46th emPAI values respectively). *IGFBP7, follistatin-like 1 (FSTL1)* and *follistatin (FST)* present Kazal-like domains. Both *IGFBP7* and *FSTL1* are fairly abundant (47th and 57th proteins at this stage). *Cathepsin D (CTSD)* was identified as an aspartic protease [103] whereas *carboxypeptidase E (CPE)* removes C-terminal basic amino acids (particularly lysine and arginine) [104]. *HGF Activator* (*HGFAC*) and *dipeptidyl-peptidase 7 (DPP7)* were shown to be serine proteases [105–107]. Protein Disulfide Isomerase family A, member 3 (*PDIA3*) was identified as a cysteine protease, overexpressed in the uterus when a shell is calcifying [36,108]. The latter molecules are intermediate and low abundance proteins.

The current study revealed several molecular chaperones involved in protein-protein interactions to ensure the proper folding of eggshell matrix proteins and the regulation of their activity. Ovocalyxin-21 (OCX21), an eggshell matrix protein that contains a BRICHOS domain associated to chaperone molecules [1], appears to be the most promising protein candidate of the group of molecular chaperones. This protein is particularly abundant at this stage (15th highest emPAI value, Fig. 5D) in accordance with its identification as having the highest emPAI in a proteomic analysis of the soluble organic matrix of the entire chicken eggshell [20]. Its presence in this group is in accordance with its previous identification in uterine fluid during both growth and terminal phases [26,27] and its over-expression during eggshell calcification [36,50]. We identified four additional chaperone proteins. *Peptidylprolyl* isomerase B (PPIB) belongs to the same protein family as PPIA and PPIC which are chaperone proteins [82]. This protein is highly abundant at this stage (18th most abundant protein at 16 h p.o., Fig. 5D). DNAJC3, also named P58IPK, has been identified as a co-chaperone molecule [109]. Despite its intermediate abundance (42nd and 59th most abundant protein at 16 and 7 h p.o. respectively), this protein appears to be relevant as it is observed throughout the linear phase of shell deposition (7 and 16 h p.o.). HSPA5, also known as BiP, is a member of the HSP70 family and is a molecular chaperone [110]. Another member of the torsin family has been shown to reduce protein aggregation [111] and the same role is supposed for torsin family 1, member B (TOR1B). These proteins are of intermediate abundance (61st and 82nd out of 184 proteins at 16 h p.o.).

We also observed one phosphatase and one kinase with low emPAI as overabundant proteins at this stage. *Protein tyrosine phosphatase* (*PTPRF*) removes phosphate groups from proteins whereas *FAMily* with sequence similarity 20, member C (*FAM20C*) adds a phosphate group [112]. The latter was previously described as being secreted by the uterus in a previous transcriptomic study [50].

4.2.5. Overabundant proteins throughout the stages of shell calcification

This group differed from the previous ones by the fact that the protein level increased at an early stage and then plateaued throughout the process of shell deposition from 6-7 h p.o. until 16 h p.o. and consequently this group might partly overlap previous ones. These 18 proteins become overabundant as soon as calcite is formed (6-7 h p.o.) and remain overabundant at the later stages when large calcite units are deposited (7-16 h p.o.) (clusters B and D, Fig. 3). The function of 12 of them could be associated with the mineralisation process (Table 5, Fig. 4).

Two proteins showed calcium binding properties. *EGF-like repeats* and *Discoidin I-Like domains 3 (EDIL3)* contains one EFG-like calcium binding domain and is of major importance at all stages of mineralisation (15th most abundant protein at 5 h p.o., 5th at both 6 and 7 h p.o. and 4th at 16 h p.o., Fig. 5). Its presence as a major eggshell matrix protein was thoroughly reported by proteomics [20,24,26] and its transcript was strongly expressed in the chicken uterus [36]. Consequently, EDIL3 is believed to play a major role in the eggshell calcification. A second calcium-binding protein, *nucleobindin 2 (NUCB2)*, might be another candidate which is pertinent to eggshell calcite mineralisation. This protein, containing two EF-hand domains, was reported to be over-expressed when a shell is calcifying [50], is abundant at both 7 and 16 h p.o. (the 16th and 12th most abundant protein, respectively) (Fig. 5 C, D) and is present in mammillary cones [49].

In this group, we also observed three proteins related to proteoglycans. *Glypican 1 (GPC1)* belongs to the glypican family and is a heparan sulfate proteoglycan [93]. This protein was reported as over-expressed during eggshell mineralisation [36]. As opposed to glypican 4 that was reported as a major eggshell protein which is overabundant during the active calcification phase, *GPC1* is a protein with a low emPAI (112th and 155th at 7 and 16 h p.o.). *Vitronectin (VTN)* and *fibronectin 1 (FN1)* exhibit proteoglycan binding properties [113,114] and also showed low emPAI values. Finally, we report the presence of two proteins participating in the formation of collagen fibres: *Procollagen-lysine*, *2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1* and 2 (*PLOD1* and *PLOD2*)[115,116].

As observed at other stages, we identified proteins involved in the regulation of the activity of proteins driving mineralisation. *Ovocalyxin-25* (*LOC771972*), previously identified as an eggshell matrix protein, contains two protease inhibitor domains (Kunitz-like and WAP) [1] and is moderately abundant (29th, 31st and 27th at 6, 7 and 16 h p.o. respectively, Fig. 5). *Cathepsin B* (*CTSB*) is a cysteine protease [117]. *ACPP* is a phosphatase which was also observed as an overabundant protein at this stage. Both proteins showed a low emPAI value questioning their involvement in the eggshell calcification.

Prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide (P4HB) and Hypoxia up regulated (HYOU1) are two additional proteins with low emPAI identified in this group and described as chaperone proteins [118–120]. Transcripts coding these two chaperone proteins were reported as over-expressed during eggshell mineralisation [36].

5. Conclusion

In this study, we identified 175 proteins with various abundances during the events of mineralisation which are potentially pivotal for the control of eggshell mineralogy ultrastructure and crystallographic texture. We explored the potential functions relative to mineralisation of 77 proteins extracted from the forming eggshell at three initial stages of shell calcification (1) deposition of a metastable amorphous calcium carbonate over the entire surface of the eggshell membranes, (2) redistribution of ACC on organic nucleation sites to form aggregates of calcite microcrystals, (3) enlargement of calcite crystal units to form the mammillary layer and the final stage (4) development of the columnar calcite units with preferred orientation in the compact eggshell layer. We present 21 matrix proteins that we suspected to have predominant roles in the control of the different stages of shell calcification in a schematic drawing (Fig. 5). Amongst them, three were observed in the recent gualitative proteomic study of the mammillary cones revealing 18 proteins and 4 additional ones when comparing to the 18 proteins more abundant $(\times 2)$ in a compartment identified as mammillary cores [49]. Lysozyme and ovotransferrin can interact with calcium as shown in vitro and are present with a high emPAI values at all stages of shell formation. The hypothesis that OC-17 and ovalbumin stabilise ACC was reinforced by the observation that both proteins showed high emPAI values and were overabundant in the shell at the early stages of shell formation. EDIL3, ALB, MFGE8, HPX and NUCB2 are calcium binding proteins and promising candidates to stabilise ACC or to control growth and morphology of calcite crystals. LOXL2 is involved in eggshell membranes formation. OC-116, HAPLN3 and GPC4 are proteins associated with the proteoglycan family which is thought to influence the CaCO₃ biomineralisation process in many species including hen. Polymorphism of OCX32 is associated with shell quality traits and this protein is overabundant in the shell when large columnar calcite crystals develop. CLU, PPIB and OCX21 are three major molecular chaperones possibly involved in the appropriate conformation of the shell matrix template. OVM, CST3 and OCX25 are protease inhibitors which might control the calcification process by degrading or maturing proteins driving shell mineralisation. Finally, LOC428451 corresponds to a phosphatase influencing the degree of phosphorylation which has been demonstrated to modulate the kinetics of mineralisation in eggshell. Out of more than 600 proteins revealed by previous proteomic studies of eggshell matrix, we selected these 21 proteins due to their high emPAI values and changes during the different shell formation stages. Characterisation of their function in the process of shell mineralisation will require further studies *in vitro* using purified proteins or *in vivo* to define their interactions with the mineral phase.

Conflict of interest

The authors attest that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

This research was funded by the French National Research Agency ANR (ANR-13-BSV6-0007-01, ANR-13-BSV6-0007-02 and ANR-13-BSV6-0007-05). The high resolution mass spectrometer was financed (SMHART project, 35069) by the European Regional Development Fund (ERDF), the Conseil Régional du Centre, the French National Institute for Agricultural Research (INRA) and the French National Institute of Health and Medical Research (Inserm). ARN acknowledges funding through grants CGL2011-25906 (Ministerio de Economia, Spain).

The authors are grateful to the experimental units (UE-PEAT) for the care of birds, and to the GenoToul Bioinformatics Platform Toulouse, Midi-Pyrenees for providing help and/or computing and/or storage resources.

References

- J. Gautron, Y. Nys, Function of eggshell matrix proteins, in: R. Huopalahti, R. Lopez-Fandino, M. Anton, R. Schade (Eds.), Bioactive Egg Compounds, Springer-Verlag, Germany 2007, pp. 109–115.
- [2] M.T. Hincke, Y. Nys, J. Gautron, The role of matrix proteins in eggshell formation, J. Poult. Sci. 47 (2010) 208–219.
- [3] M.T. Hincke, Y. Nys, J. Gautron, K. Mann, A.B. Rodriguez-Navarro, M.D. McKee, The eggshell: structure, composition and mineralization, Front. Biosci. 17 (2012) 1266–1280.
- [4] Y. Nys, J. Gautron, J.M. Garcia-Ruiz, M.T. Hincke, Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins, C.R. Palevol 3 (2004) 549–562.
- [5] Y. Nys, M.T. Hincke, J.L. Arias, J.M. Garcia-Ruiz, S.E. Solomon, Avian eggshell mineralization, Poult. Avian Biol. Rev. 10 (1999) 143–166.
- [6] Y. Nys, J. Zawadzki, J. Gautron, A.D. Mills, Whitening of brown-shelled eggs mineral-composition of uterine fluid and rate of protoporphyrin deposition, Poult. Sci. 70 (1991) 1236–1245.
- [7] A. Rodriguez-Navarro, J.M. Garcia-Ruiz, Model of textural development of layered crystal aggregates, Eur. J. Mineral. 12 (2000) 609–614.
- [8] Y. Politi, R.A. Metzler, M. Abrecht, B. Gilbert, F.H. Wilt, I. Sagi, et al., Transformation mechanism of amorphous calcium carbonate into calcite in the sea urchin larval spicule (vol 105, pg 17362, 2008), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105 (2008) 20045.
- [9] A.B. Rodriguez-Navarro, P. Marie, Y. Nys, M.T. Hincke, J. Gautron, Amorphous calcium carbonate controls avian eggshell mineralization: a new paradigm for understanding rapid eggshell calcification, J. Struct. Biol. 190 (2015) 291–303.
- [10] A. Hernandez-Hernandez, M.L. Vidal, J. Gomez-Morales, A.B. Kodriguez-Navarro, V. Labas, J. Gautron, et al., Influence of eggshell matrix proteins on the precipitation of calcium carbonate (CaCO3), J. Cryst. Growth 8 (2008) 4330–4339.
- [11] J. Gautron, M.T. Hincke, M. Panheleux, J.M. Garcia-Ruiz, T. Boldicke, Y. Nys, Ovotransferrin is a matrix protein of the hen eggshell membranes and basal calcified layer, Connect. Tissue Res. 42 (2001) 255–267.
- [12] V. Labas, I. Grasseau, K. Cahier, A. Gargaros, G. Harichaux, A.P. Teixeira-Gomes, et al., Qualitative and quantitative peptidomic and proteomic approaches to phenotyping chicken semen, J. Proteomics. 112 (2015) 313–335.
- [13] A. Keller, A.I. Nesvizhskii, E. Kolker, R. Aebersold, Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search, Anal. Chem. 74 (2002) 5383–5392.
- [14] A.I. Nesvizhskii, A. Keller, E. Kolker, R. Aebersold, A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry, Anal. Chem. 75 (2003) 4646–4658.
- [15] J.A. Vizcaino, E.W. Deutsch, R. Wang, A. Csordas, F. Reisinger, D. Rios, et al., ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination, Nat. Biotechnol. 32 (2014) 223–226.
- [16] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T.J. Gibson, K. Karplus, W.Z. Li, et al., Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, Mol. Syst. Biol. 7 (2011).
- [17] C. Camacho, G. Coulouris, V. Avagyan, N. Ma, J. Papadopoulos, K. Bealer, et al., BLAST plus : architecture and applications, BMC Bioinf. 10 (2009).
- [18] P. Marie, V. Labas, A. Brionne, G. Harichaux, C. Hennequet-Antier, A.B. Rodriguez-Navarro, et al., Data Set for the Proteomic Inventory and Quantitative Analysis of Chicken Eggshell Matrix Proteins during the Primary Events of Eggshell Mineralization and the Active Growth Phase of Calcification, 2015. (Data in Brief, submitted for publication).

- [19] A.I. Saeed, V. Sharov, J. White, J. Li, W. Liang, N. Bhagabati, et al., TM4: a free, opensource system for microarray data management and analysis, Biotechniques 34 (2003) 374.
- [20] K. Mann, B. Macek, J.V. Olsen, Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer, Proteomics 6 (2006) 3801–3810.
- [21] K. Mann, J.V. Olsen, B. Macek, F. Gnad, M. Mann, Phosphoproteins of the chicken eggshell calcified layer, Proteomics 7 (2007) 106–115.
- [22] I. Miksik, J. Charvatova, A. Eckhardt, Z. Deyl, Insoluble eggshell matrix proteins their peptide mapping and partial characterization by capillary electrophoresis and highperformance liquid chromatography, Electrophoresis 24 (2003) 843–852.
- [23] I. Miksik, A. Eckhardt, P. Sedlakova, K. Mikulikova, Proteins of insoluble matrix of Avian (*Gallus gallus*) eggshell, Connect. Tissue Res. 48 (2007) 1–8.
- [24] I. Miksik, P. Sedlakova, K. Lacinova, S. Pataridis, A. Eckhardt, Determination of insoluble avian eggshell matrix proteins, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 205–214.
- [25] M. Rose-Martel, J.W. Du, M.T. Hincke, Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle, J. Proteomics. 75 (2012) 2697–2706.
- [26] C.J. Sun, G.Y. Xu, N. Yang, Differential label-free quantitative proteomic analysis of avian eggshell matrix and uterine fluid proteins associated with eggshell mechanical property, Proteomics 13 (2013) 3523–3536.
- [27] P. Marie, V. Labas, A. Brionne, G. Harichaux, C. Hennequet-Antier, Y. Nys, et al., Quantitative proteomics and bioinformatic analysis provide new insight into protein function during avian eggshell biomineralization, J. Proteomics. 113 (2015) 178–193.
- [28] L. Addadi, S. Weiner, Control and design principles in biological mineralization, Angew. Chem. Int. Ed. 31 (1992) 153–169.
- [29] F. Marin, G. Luquet, Molluscan shell proteins, C.R. Palevol 3 (2004) 469-492.
- [30] M.T. Grispo, C. Natarajan, J. Projecto-Garcia, H. Moriyama, R.E. Weber, J.F. Storz, Gene duplication and the evolution of hemoglobin isoform differentiation in birds, J. Biol. Chem. 287 (2012).
- [31] U. Silphaduang, M.T. Hincke, Y. Nys, Y. Mine, Antimicrobial proteins in chicken reproductive system, Biochem. Biophys. Res. Commun. 340 (2006) 648–655.
- [32] E.D. Harris, J.E. Blount, R.M. Leach, Localization of lysyl oxidase in hen oviduct implications in eggshell membrane formation and composition, Science 208 (1980) 55–56.
- [33] M. Akagawa, Y. Wako, K. Suyama, Lysyl oxidase coupled with catalase in egg shell membrane, Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol. 1434 (1999) 151–160.
- [34] M.I. Hassan, B. Shajee, A. Waheed, F. Ahmad, W.S. Sly, Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes, Bioorg. Med. Chem. 21 (2013) 1570–1582.
- [35] A. Bertucci, A. Moya, S. Tambutte, D. Allemand, C.T. Supuran, D. Zoccola, Carbonic anhydrases in anthozoan corals—a review, Bioorg. Med. Chem. 21 (2013) 1437–1450.
- [36] A. Brionne, Y. Nys, C. Hennequet-Antier, J. Gautron, Hen uterine gene expression profiling during eggshell formation reveals putative proteins involved in the supply of minerals or in the shell mineralization process, BMC Genomics 15 (2014) 220.
- [37] M.T. Hincke, J. Gautron, M. Panheleux, J. Garcia-Ruiz, M.D. McKee, Y. Nys, Identification and localization of lysozyme as a component of eggshell membranes and eggshell matrix, Matrix Biol. 19 (2000) 443–453.
- [38] R. Lakshminarayanan, X.J. Loh, S. Gayathri, S. Sindhu, Y. Banerjee, R.M. Kini, et al., Formation of transient amorphous calcium carbonate precursor in quail eggshell mineralization: an in vitro study, Biomacromolecules 7 (2006) 3202–3209.
- [39] A.E. Voinescu, D. Touraud, A. Lecker, A. Pfitzner, W. Kunz, B.W. Ninham, Mineralization of CaCO₃ in the presence of egg white lysozyme, Langmuir 23 (2007) 12269–12274.
- [40] X. Wang, H. Sun, Y. Xia, C. Chen, H. Xu, H. Shan, et al., Lysozyme mediated calcium carbonate mineralization, J. Colloid Interface Sci. 332 (2009) 96–103.
- [41] S.E. Wolf, J. Leiterer, V. Pipich, R. Barrea, F. Emmerling, W. Tremel, Strong stabilization of amorphous calcium carbonate emulsion by ovalbumin: gaining insight into the mechanism of 'polymer-induced liquid precursor' processes, J. Am. Chem. Soc. 133 (2011) 12642–12649.
- [42] M.R. Mauk, F.I. Rosell, B. Lelj-Garolla, G.R. Moore, A.G. Mauk, Metal ion binding to human hemopexin, Biochemistry 44 (2005) 1864–1871.
- [43] D.A. Carrino, J.E. Dennis, T.M. Wu, J.L. Arias, M.S. Fernandez, J.P. Rodriguez, et al., The avian eggshell extracellular matrix as a model for biomineralization, Connect. Tissue Res. 35 (1996) 325–328.
- [44] M.S. Fernandez, M. Araya, J.L. Arias, Eggshells are shaped by a precise spatiotemporal arrangement of sequentially deposited macromolecules, Matrix Biol. 16 (1997) 13–20.
- [45] T. Nakano, N. Ikawa, L. Ozimek, Extraction of glycosaminoglycans from chicken eggshell, Poult. Sci. 80 (2001) 681–684.
- [46] T. Nakano, N. Ikawa, L. Ozimek, Galactosaminoglycan composition in chicken eggshell, Poult. Sci. 81 (2002) 709–714.
- [47] G.K. Hunter, K.S. Wong, J.J. Kim, Binding of calcium to glycosaminoglycans an equilibrium dialysis study, Arch. Biochem. Biophys. 260 (1988) 161–167.
- [48] A.P. Spicer, A. Joo, R.A. Bowling, A hyaluronan binding link protein gene family whose members are physically linked adjacent to chrondroitin sulfate proteoglycan core protein genes — the missing links, J. Biol. Chem. 278 (2003) 21083–21091.
- [49] M. Rose-Martel, S. Smiley, M.T. Hincke, Novel identification of matrix proteins involved in calcitic biomineralization, | Proteomics. 116 (2015) 81–96.
- [50] V. Jonchere, S. Rehault-Godbert, C. Hennequet-Antier, C. Cabau, V. Sibut, L.A. Cogburn, et al., Gene expression profiling to identify eggshell proteins involved in physical defense of the chicken egg, BMC Genomics 11 (2010).
- [51] K. Mann, F. Siedler, The amino acid sequence of ovocleidin 17, a major protein of the avian eggshell calcified layer, Biochem. Mol. Biol. Int. 47 (1999) 997–1007.
- [52] K. Mann, F. Siedler, Ostrich (*Struthio camelus*) eggshell matrix contains two different C-type lectin-like proteins. Isolation, amino acid sequence, and posttranslational modifications, BBA-Proteins Proteom. 1696 (2004) 41–50.

- [53] R. Lakshminarayanan, S. Valiyaveettil, V.S. Rao, R.M. Kini, Purification, characterization, and in vitro mineralization studies of a novel goose eggshell matrix protein, ansocalcin, J. Biol. Chem. 278 (2003) 2928–2936.
- [54] K. Mann, F. Siedler, Amino acid sequences and phosphorylation sites of emu and rhea eggshell C-type lectin-like proteins, Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 143 (2006) 160–170.
- [55] C.L. Freeman, J.H. Harding, D. Quigley, P.M. Rodger, Structural control of crystal nuclei by an eggshell protein, Angew. Chem. Int. Ed. 49 (2010) 5135–5137.
- [56] C.L. Freeman, J.H. Harding, D. Quigley, P.M. Rodger, Simulations of ovocleidin-17 binding to calcite surfaces and its implications for eggshell formation, J. Phys. Chem. C 115 (2011) 8175–8183.
- [57] C.E. Killian, F.H. Wilt, Characterization of the proteins comprising the integral matrix of *Strongylocentrotus purpuratus* embryonic spicules, J. Biol. Chem. 271 (1996) 9150–9159.
- [58] A. Rao, J. Seto, J.K. Berg, S.G. Kreft, M. Scheffner, H. Coelfen, Roles of larval sea urchin spicule SM50 domains in organic matrix self-assembly and calcium carbonate mineralization, J. Struct. Biol. 183 (2013) 205–215.
- [59] K. Mann, I.M. Weiss, S. Andre, H.J. Gabius, M. Fritz, The amino-acid sequence of the abalone (*Haliotis laevigata*) nacre protein perlucin – Detection of a functional Ctype lectin domain with galactose/mannose specificity, Eur. J. Biochem. 267 (2000) 5257–5264.
- [60] E. Parisini, J.M.G. Higgins, J.H. Liu, M.B. Brenner, J.H. Wang, The crystal structure of human E-cadherin domains 1 and 2, and comparison with other cadherins in the context of adhesion mechanism, J. Mol. Biol. 373 (2007) 401–411.
- [61] B. Nagar, M. Overduin, M. Ikura, J.M. Rini, Structural basis of calcium-induced Ecadherin rigidification and dimerization, Nature 380 (1996) 360–364.
- [62] M.T. Hincke, Ovalbumin is a component of the chicken eggshell matrix, Connect. Tissue Res. 31 (1995) 227–233.
- [63] V. Pipich, M. Balz, S.E. Wolf, W. Tremel, D. Schwahn, Nucleation and growth of CaCO(3) mediated by the egg-white protein ovalbumin: a time-resolved in situ study using small-angle neutron scattering, J. Am. Chem. Soc. 130 (2008) 6879–6892.
- [64] D. Schwahn, M. Balz, W. Tremel, Crystallization of the CaCO(3) mineral in the presence of the protein ovalbumin, Physica B 350 (2004) E947–E949.
- [65] X. Wang, R. Kong, X. Pan, H. Xu, D. Xia, H. Shan, et al., Role of ovalbumin in the stabilization of metastable vaterite in calcium carbonate biomineralization, J. Phys. Chem. B 113 (2009) 8975–8982.
- [66] X.Q. Wang, C.M. Wu, K. Tao, K. Zhao, J.Q. Wang, H. Xu, et al., Influence of ovalbumin on CaCO(3) precipitation during in vitro biomineralization, J. Phys. Chem. B 114 (2010) 5301–5308.
- [67] D. Chin, A.R. Means, Calmodulin: a prototypical calcium sensor, Trends Cell Biol. 10 (2000) 322–328.
- [68] N. Ribeiro, S.R. Sousa, R.A. Brekken, F.J. Monteiro, Role of SPARC in bone remodeling and cancer-related bone metastasis, J. Cell. Biochem. 115 (2014) 17–26.
- [69] J.D. Termine, H.K. Kleinman, S.W. Whitson, K.M. Conn, M.L. McGarvey, G.R. Martin, Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen, Cell 26 (1981) 99–105.
- [70] N.C. Khanna, M. Tokuda, D.M. Waisman, Conformational-changes induced by binding of divalent-cations to calregulin, J. Biol. Chem. 261 (1986) 8883–8887.
- [71] J. Turnay, N. Olmo, M.A. Lizarbe, K. von der Mark, Changes in the expression of annexin A5 gene during in vitro chondrocyte differentiation: influence of cell attachment, J. Cell. Biochem. 84 (2002) 132–142.
- [72] P. Gelebart, M. Opas, M. Michalak, Calreticulin, a Ca²⁺-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, Int. J. Biochem. Cell Biol. 37 (2005) 260–266.
- [73] I.C. Dunn, N.T. Joseph, M. Bain, A. Edmond, P.W. Wilson, P. Milona, et al., Polymorphisms in eggshell organic matrix genes are associated with eggshell quality measurements in pedigree Rhode Island Red hens, Anim. Genet. 40 (2009) 110–114.
- [74] I.C. Dunn, A.B. Rodriguez-Navarro, K. McDade, M. Schmutz, R. Preisinger, D. Waddington, et al., Genetic variation in eggshell crystal size and orientation is large and these traits are correlated with shell thickness and are associated with eggshell matrix protein markers, Anim. Genet. 43 (2012) 410–418.
- [75] J.E. Fulton, M. Soller, A.R. Lund, J. Arango, E. Lipkin, Variation in the ovocalyxin-32 gene in commercial egg-laying chickens and its relationship with egg production and egg quality traits, Anim. Genet. 43 (2012) 102–113.
- [76] H. Takahashi, O. Sasaki, K. Nirasawa, T. Furukawa, Association between ovocalyxin-32 gene haplotypes and eggshell quality traits in an F-2 intercross between two chicken lines divergently selected for eggshell strength, Anim. Genet. 41 (2010) 541–544.
- [77] H. Takahashi, D. Yang, O. Sasaki, T. Furukawa, K. Nirasawa, Mapping of quantitative trait loci affecting eggshell quality on chromosome 9 in an F-2 intercross between two chicken lines divergently selected for eggshell strength, Anim. Genet. 40 (2009) 779–782.
- [78] J. Gautron, M.T. Hincke, K. Mann, M. Panheleux, M. Bain, M.D. McKee, et al., Ovocalyxin-32, a novel chicken eggshell matrix protein – isolation, amino acid sequencing, cloning, and immunocytochemical localization, J. Biol. Chem. 276 (2001) 39243–39252.
- [79] M.A. Blinder, T.R. Andersson, U. Abildgaard, D.M. Tollefsen, Heparin cofactor-Iloslo – mutation of Arg-189 to his decreases the affinity for dermatan sulfate, J. Biol. Chem. 264 (1989) 5128–5133.
- [80] V.M.D. Vandeerlin, D.M. Tollefsen, The N-terminal acidic domain of heparin cofactor-II mediates the inhibition of alpha-thrombin in the presence of glycosaminoglycans, J. Biol. Chem. 266 (1991) 20223–20231.
- [81] K. Mann, J. Gautron, Y. Nys, M.D. McKee, T. Bajari, W.J. Schneider, et al., Disulfidelinked heterodimeric clusterin is a component of the chicken eggshell matrix and egg white, Matrix Biol. 22 (2003) 397–407.
- [82] G. Fischer, H. Bang, The refolding of urea-denatured ribonuclease-a is catalyzed by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, Biochim. Biophys. Acta 828 (1985) 39–42.

- [83] J. Gillis, S. Schipper-Krom, K. Juenemann, A. Gruber, S. Coolen, R. van den Nieuwendijk, et al., The DNAJB6 and DNAJB8 protein chaperones prevent intracellular aggregation of polyglutamine peptides, J. Biol. Chem. 288 (2013) 17225–17237.
- [84] M.T. Hincke, M. St. Maurice, Phosphorylation-dependent modulation of calcium carbonate precipitation by chicken eggshell matrix proteins, Sixth International Conference on Chemistry and Biology of Mineralized Tissues. Vittel, France 1998, pp. 13–17.
- [85] J. Xing, O. Wellman-Labadie, J. Gautron, M.T. Hincke, Recombinant eggshell ovocalyxin-32: expression, purification and biological activity of the glutathione S-transferase fusion protein, Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 147 (2007) 172–177.
- [86] S. Rehault-Godbert, V. Herve-Grepinet, J. Gautron, C. Cabau, Y. Nys, M. Hincke, Molecules Involved in Chemical Defence of the Chicken Egg, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK, 2011.
- [87] U. Kraghhansen, H. Vorum, Quantitative-analyses of the interaction between calcium-ions and human serum-albumin, Clin. Chem. 39 (1993) 202–208.
- [88] S. Chumnarnsilpa, A. Loonchanta, B. Xue, H. Choe, D. Urosev, H. Wang, et al., Calcium ion exchange in crystalline gelsolin, J. Mol. Biol. 357 (2006) 773–782.
- [89] J.J. Hao, K. Narayanan, T. Muni, A. Ramachandran, A. George, Dentin matrix protein 4, a novel secretory calcium-binding protein that modulates odontoblast differentiation, J. Biol. Chem. 282 (2007) 15357–15365.
- [90] M. Jost, C. Thiel, K. Weber, V. Gerke, Mapping of 3 unique Ca-2+-binding sites in human annexin-II, Eur. J. Biochem. 207 (1992) 923–930.
- [91] N. Vunnam, S. Pedigo, Sequential binding of calcium leads to dimerization in neural cadherin, Biochemistry 50 (2011) 2973–2982.
- [92] M.T. Hincke, J. Gautron, C.P.W. Tsang, M.D. McKee, Y. Nys, Molecular cloning and ultrastructural localization of the core protein of an eggshell matrix proteoglycan, ovocleidin-116, J. Biol. Chem. 274 (1999) 32915–32923.
- [93] J. Filmus, M. Capurro, J. Rast, Glypicans, Genome Biol. 9 (2008)
- [94] I. Lavelin, N. Meiri, M. Einat, O. Genina, M. Pines, Mechanical strain regulation of the chicken glypican-4 gene expression in the avian eggshell gland, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 283 (2002) R853–R861.
- [95] M. Dellett, W. Hu, V. Papadaki, S.-i. Ohnuma, Small leucine rich proteoglycan family regulates multiple signalling pathways in neural development and maintenance, Develop. Growth Differ. 54 (2012) 327–340.
- [96] P. Kallunki, K. Tryggvason, Human basement-membrane heparan-sulfate proteoglycan core protein – a 467-kD protein containing multiple domains resembling elements of the low-density-lipoprotein receptor, laminin, neural cell-adhesion molecules, and epidermal growth-factor, J. Cell Biol. 116 (1992) 559–571.
- [97] E. Alberdi, C.C. Hyde, S.P. Becerra, Pigment epithelium-derived factor (PEDF) binds to glycosaminoglycans: analysis of the binding site, Biochemistry 37 (1998) 10643–10652.
- [98] R. Jasuja, B.L. Allen, W.N. Pappano, A.C. Rapraeger, D.S. Greenspan, Cell-surface heparan sulfate proteoglycans potentiate chordin antagonism of bone morphogenetic protein signaling and are necessary for cellular uptake of chordin, J. Biol. Chem. 279 (2004) 51289–51297.
- [99] M. Pines, V. Knopov, A. Bar, Involvement of osteopontin in egg shell formation in the laying chicken, Matrix Biol. 14 (1995) 765–771.
- [100] Y.C. Chien, M.T. Hincke, H. Vali, M.D. McKee, Ultrastructural matrix-mineral relationships in avian eggshell, and effects of osteopontin on calcite growth in vitro, J. Struct. Biol. 163 (2008) 84–99.
- [101] H. Arazi, I. Yoselewitz, Y. Malka, Y. Kelner, O. Genin, M. Pines, Osteopontin and calbindin gene expression in the eggshell gland as related to eggshell abnormalities, Poult. Sci. 88 (2009) 647–653.

- [102] I. Lavelin, N. Yarden, S. Ben-Bassat, A. Bar, M. Pines, Regulation of osteopontin gene expression during egg shell formation in the laying hen by mechanical strain, Matrix Biol. 17 (1998) 615–623.
- [103] P. Benes, V. Vetvicka, M. Fusek, Cathepsin D—many functions of one aspartic protease, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 68 (2008) 12–28.
- [104] L.D. Fricker, Carboxypeptidase-E, Annu. Rev. Physiol. 50 (1988) 309-321.
- [105] K. Miyazawa, T. Shimomura, A. Kitamura, J. Kondo, Y. Morimoto, N. Kitamura, Molecular-cloning and sequence-analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth-factor — structural similarity of the protease precursor to blood-coagulation factor-XII, J. Biol. Chem. 268 (1993) 10024–10028.
- [106] G.A. Bezerra, E. Dobrovetsky, A. Dong, A. Seitova, L. Crombett, L.M. Shewchuk, et al., Structures of human DPP7 reveal the molecular basis of specific inhibition and the architectural diversity of proline-specific peptidases, PLoS One 7 (2012).
- [107] M.B. Maes, A.M. Lambeir, K. Gilany, K. Senten, P. Van Der Veken, B. Leiting, et al., Kinetic investigation of human dipeptidyl peptidase II (DPPII)-mediated hydrolysis of dipeptide derivatives and its identification as quiescent cell proline dipeptidase (QPP)/dipeptidyl peptidase 7 (DPP7), Biochem. J. 386 (2005) 315–324.
- [108] R. Urade, T. Oda, H. Ito, T. Moriyama, S. Utsumi, M. Kito, Functions of characteristic Cys-Gly-His-Cys (CGHC) and Gln-Glu-Asp-Leu (QEDL) motifs of microsomal ER-60 protease, J. Biochem. (Tokyo) 122 (1997) 834-842.
- [109] M. Svard, E.I. Biterova, J.-M. Bourhis, J.E. Guy, The crystal structure of the human cochaperone P58(IPK), PLoS One 6 (2011).
- [110] G.C. Flynn, J. Pohl, M.T. Flocco, J.E. Rothman, Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP, Nature 353 (1991) 726–730.
- [111] P.J. McLean, H. Kawamata, S. Shariff, J. Hewett, N. Sharma, K. Ueda, et al., TorsinA and heat shock proteins act as molecular chaperones: suppression of alphasynuclein aggregation, J. Neurochem. 83 (2002) 846–854.
- [112] V.S. Tagliabracci, J.L. Engel, J. Wen, S.E. Wiley, C.A. Worby, L.N. Kinch, et al., Secreted kinase phosphorylates extracellular proteins that regulate biomineralization, Science 336 (2012) 1150–1153.
- [113] P.P. Francois, K.T. Preissner, M. Herrmann, R.P. Haugland, P. Vaudaux, D.P. Lew, et al., Vitronectin interaction with glycosaminoglycans – kinetics, structural determinants, and role in binding to endothelial cells, J. Biol. Chem. 274 (1999) 37611–37619.
- [114] M. Lyon, G. Rushton, J.A. Askari, M.J. Humphries, J.T. Gallagher, Elucidation of the structural features of heparan sulfate important for interaction with the Hep-2 domain of fibronectin, J. Biol. Chem. 275 (2000) 4599–4606.
- [115] T. Hautala, M.G. Byers, R.L. Eddy, T.B. Shows, K.I. Kivirikko, R. Myllyla, Cloning of human lysyl hydroxylase – complete cDNA-derived amino-acid-sequence and assignment of the gene (PLOD) to chromosome 1P36.3–P36.2, Genomics 13 (1992) 62–69.
- [116] M. Valtavaara, H. Papponen, A.M. Pirttila, K. Hiltunen, H. Helander, R. Myllyla, Cloning and characterization of a novel human lysyl hydroxylase isoform highly expressed in pancreas and muscle, J. Biol. Chem. 272 (1997) 6831–6834.
- [117] J.S. Mort, D.J. Buttle, Cathepsin B, Int. J. Biochem. Cell Biol. 29 (1997) 715-720.
- [118] H. Cai, C.C. Wang, C.L. Tsou, Chaperone-like activity of protein disulfide-isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds, J. Biol. Chem. 269 (1994) 24550–24552.
- [119] J.L. Song, C.C. Wang, Chaperone-like activity of protein disulfide-isomerase in the refolding of rhodanese, Eur. J. Biochem. 231 (1995) 312–316.
- [120] K. Ozawa, K. Kuwabara, M. Tamatani, K. Takatsuji, Y. Tsukamoto, S. Kaneda, et al., 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death, J. Biol. Chem. 274 (1999) 6397–6404.

Article n°5 :

« Data set for the proteomic inventory and quantitative analysis of chicken eggshell matrix proteins during the primary events of eggshell mineralization and the active growth phase of calcification »



Contents lists available at ScienceDirect

Data in Brief

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

Data Article

Data set for the proteomic inventory and quantitative analysis of chicken eggshell matrix proteins during the primary events of eggshell mineralization and the active growth phase of calcification



Pauline Marie^a, Valérie Labas^b, Aurélien Brionne^a, Grégoire Harichaux^b, Christelle Hennequet-Antier^a, Alejandro B. Rodriguez-Navarro^c, Yves Nys^a, Joël Gautron^{a,*}

^a INRA, UR83 Recherches avicoles, Fonction et Régulation des protéines de l'œuf, F-37380 Nouzilly, France
^b INRA, UMR INRA85, UMR CNRS 7247; Université de Tours; IFCE, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomolécules, Laboratoire de Spectrométrie de Masse, F-37380 Nouzilly, France

^c Departmento de Mineralogia y Petrologia, Universidad de Granada, Campus Fuente Nueva s/n, 18002 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history: Received 15 June 2015 Received in revised form 26 June 2015 Accepted 29 June 2015 Available online 7 July 2015

Keywords: Chicken Eggshell Biomineralisation Quantitative proteomics Eggshell matrix

ABSTRACT

Chicken eggshell is a biomineral composed of 95% calcite calcium carbonate mineral and of 3.5% organic matrix proteins. The assembly of mineral and its structural organization is controlled by its organic matrix. In a recent study [1], we have used quantitative proteomic, bioinformatic and functional analyses to explore the distribution of 216 eggshell matrix proteins at four key stages of shell mineralization defined as: (1) widespread deposition of amorphous calcite aggregates, (3) formation of larger calcite crystal units and (4) rapid growth of calcite as columnar structure with preferential crystal orientation. The current article detailed the quantitative analysis performed at the four stages of

DOI of original article: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.05.034

* Corresponding author.

http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2015.06.019

2352-3409/© 2015 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

E-mail address: joel.gautron@tours.inra.fr (J. Gautron).

shell mineralization to determine the proteins which are the most abundant. Additionally, we reported the enriched GO terms and described the presence of 35 antimicrobial proteins equally distributed at all stages to keep the egg free of bacteria and of 81 proteins, the function of which could not be ascribed.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Specifications table

Subject area More specific subject area	<i>Biology</i> List and putative functions of eggshell matrix proteins present at initial and mid phases of eggshell formation.
Type of data	Raw and processed/analyzed mass spectrometry data obtained by nanoliquid chromatography combined to high resolution tandem mass spectrometry. xls tables with identified/validated and quantified proteins tables with integrative and functional analysis of protein sequences.
How data was acquired	LC-MS/MS using a LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer.
Data format	Raw data: raw.mzml and Processed and analyzed data using Mascot Search engine:.dat. Analyzed: Further assembled sequences using Clustal Omega multi-alignment algorithm and BLAST+suite. GO terms extracted from sequences and enrichment determination.
Experimental factors	Stage of eggshell formation.
Experimental features	Eggshell matrix samples were collected at four stages of eggshell mineralization and digested in gel using trypsin. Resulting peptides were analyzed by LC–MS/MS and further treated using data mining and bioinformatic analysis.
Data source location	Nouzilly, France, INRA Centre Val de Loire.
Data accessibility	Data have been deposited into the ProteomeXchange Consortium [2] via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD001450.

Value of the data [describe in 3–5 bulleted points why this data is of value to the scientific community]

- Proteomic analysis of 216 chicken eggshell matrix proteins.
- Gene Ontology terms enrichments investigating potential functions of eggshell matrix proteins.
- Quantitative data on protein abundances according to stages of eggshell formation.
- Annotation on quantified eggshell matrix proteins.

1. Collection of eggshell matrix samples and preparation for MS analyses

Eggs were collected on brown-laying hens at 5, 6, 7 and 16 h after previous oviposition as described in [1]. These time intervals correspond respectively to the primary events of mineralization with widespread deposition of amorphous calcium carbonate (ACC), ACC transformation into crystalline calcite aggregates, formation of larger calcite crystal units and rapid growth of calcite and development of a columnar structure with preferential crystal orientation [3]. Eggs were broken and forming eggshells were washed with water, air dried and stored at -20 °C until protein extraction. Eggshell matrix proteins were extracted as described in [1].

A total of 24 individual eggshell protein extracts were used. Six samples collected at the same time point were pooled in equal amounts for each time (5 h p.o., 6 h p.o., 7 h p.o. and 16 h p.o.). The four pooled samples (51 µg of proteins/sample) were fractionated on a 4–20% SDS-PAGE gel (8.3 cm \times 7.3 cm \times 1.5 mm). Proteins were stained with Coomassie blue and the entire SDS-PAGE lanes were sectioned into 15 bands for each individual pooled sample. Excised proteins were in-gel

digested with bovine trypsin (Roche Diagnostics GmbH, Mannhiem, Germany) as previously described [4] and analyzed by nanoscale liquid chromatography-tandem mass spectrometry (nanoLC–MS/MS).

2. Nano LC MS/MS analyses

All experiments were performed on a linear ion trap Fourier Transform Mass Spectrometer (FT-MS) LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) coupled to an Ultimate[®] 3000 RSLC Ultra-High Pressure Liquid Chromatographer (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) as previously described in [1,4]. Raw data files were converted to MGF as previously described [4]. The identification of proteins was established using MASCOT search engine (v 2.3, Matrix Science, London, UK). The peptide and fragment masses obtained were matched automatically against the chordata section of nr NCBI database (2132453 sequences, downloaded on 2013/05/13). Enzyme specificity was set to trypsin with two missed cleavages using carbamidomethylcysteine, oxidation of methionine and Nterminal protein acetylation as variable modifications. The tolerance of the ions was set to 5 ppm for parent and 0.8 Da for fragment ion matches. Mascot results obtained from the target and decoy database were incorporated in Scaffold 3 software (version 3.4, Proteome Software, Portland, USA). Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 95.0% probability as specified by the Peptide Prophet algorithm [5]. Peptides were considered distinct if they differed in sequence. Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 95.0% probability as specified by the Protein Prophet algorithm [6] and contained at least one sequenceunique peptide for global inventory and at least two sequence-unique peptides for quantitative analysis. A false discovery rate was calculated as < 1% at the peptide or protein level. The abundance of identified proteins was estimated by calculating the emPAI using Scaffold 4 Q+ software (version 4.2, Proteome Software, Portland, USA). Additionally, label-free quantitative proteomic analyses based on spectral counting method, Scaffold 3 Q+ software (version 3.4, Proteome Software, Portland, USA) was used to quantify the proteins at the four different stages of calcification. All proteins with greater than two sequence-unique peptides, identified in database with high confidence were considered for protein quantification. To eliminate quantitative ambiguity within protein groups, we ignored all the spectra matching any peptide which is shared between proteins. Thereby, quantification performed with normalized spectral counts was carried out on distinct proteins.

The mass spectrometry proteomic data have been deposited into the ProteomeXchange Consortium [2] via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD001450.

3. Data set analysis of avian eggshell matrix proteins

A total of 261 proteins were identified using nr NCBI database. Keratins and bovine trypsin were eliminated from the list as they appeared to be contaminants or resulting from the digestion process. Protein sequences were aligned to eliminate all redundancies. Protein groups were determined using Clustal Omega multi-alignment algorithm [7]. Sequences were blasted against nr NCBI database limited to Gallus gallus taxon using the blastp program (BLAST+suite) [8]. This was performed using R language (http://cran.r-project.org).

A total of 216 non-redundant eggshell matrix protein sequences were identified. The resulting file (Supplementary Table 1) is made of EntrezGene Ids, GI numbers, protein symbols, short descriptions, information on their previous identification in the shell and in the uterine fluid, mean quantitative values and emPAI values at each time point. We compared our list with the previously published proteomes of eggshell matrix proteins [9–15]. Out of the 216 proteins, 24 proteins are novel compared to previous studies and are highlighted (Supplementary Table 1).

In order to determine the potential functions of the 216 eggshell matrix proteins, 3231 GO terms were extracted from the protein sequences using GORetriever (http://agbase.msstate.edu/). CateGOrizer (http://www.animalgenome.org/tools/catego/) was then used to group the GO terms in 91 different parent term categories using a GO slim2 method. Finally, GO terms enrichments were determined using Gene set enrichment tools from Genomatix suite (www.genomatix.de). When

4	3	2
-	-	-

Descriptions	Number of proteins	Symbols
Response to external	13	AVBD11, HSPA5, RBP4, FN1, LCN8, ALB, OC-17, CTSD, HIST1H2B7, LYZ, APOA1,
stimulus		TTR, LY86
Extracellular organization	4	ANXA2, LOXL2, VMO1, COL2A1
Nutrition and digestion	7	HSPA5, ALB, CTSD, RBP4, APOA1, VTG1, VTG2
Oocyte formation	3	RBP4, VMO1, TTR
Protein post translational folding	9	PDIA3, PPIB, QSOX1, P4HB, HSPA5, DNAJC3, HSP90B1, HSP90AA1, DNAJB6
Homeostasis maintenance	9	PDIA3, RBP4, CALB1, QSOX1, LCN8, COL2A1, P4HB, APOA1, CALM
Development	27	HSPA5, SPP1, RBP4, SEMA3C, DKK3, ACTA1, ANXA2, LOXL2, CALB1, YWHAE, FN1,
		ATP5B, LCN8, CDH2, TSKU, OC-17, GSN, DNAJB6, COCH, COL2A1, FST, SDF4, OC-
		116, APOA1, CNTN1, CA2, TTR
Enzyme regulator activity	13	HSP90AA1, ANXA2, OVM, OVST, OVAY, SERPINI1, DNAJB6, APOA1, OIH, OVAX, TIMP2, CST3, CALM
Binding and transport	41	DNAJC3, DNAJB6, CALB1, APOA1, GPC1, CNTN1, ALB, LCN8, HSPA5, SPP1, RBP4,
activity		HSP90B1, PTN, HSP90AA1, ANXA2, LOXL2, OVM, YWHAE, RDX, ANXA5, CDH2,
		GSN, COL2A1, FST, YWHAZ, HIST1H2B7, OIH, LYZ, HBG2, CDH1, TTR, CALM,
		FBLN1, SDF4, SPARC, OC-17, PLOD1, HBAA, HBAD, VTG1, VTG2
Oxidoreductase activity	3	PDIA3, QSOX1, P4HB
Coagulation process	2	ANXA2, ANXA5
Cell-cell adhesion	5	CDH2, DNAJB6, COL2A1, APOA1, CDH1
Cartilage metabolism	2	LOXL2, LCN8, CDH2, COL2A1
Glycerol ether metabolic process	2	PDIA3, P4HB
Regulation of biological	15	PDIA3, RBP4, ANXA2, ALB, CALB1, FN1, QSOX1, RDX, LCN8, GSN, COCH, COL2A1,
quality		P4HB, APOA1, CALM
Multi-organism process	8	RBP4, ALB, AVBD11, LCN8, OC-17, HIST1H2B7, LYZ, TTR
Shell calcification	2	OC-17, OC-116
Regulation of protein	2	YWHAE, CALM
Dephosphorylation		

considering GO terms associated to Molecular Function (MF) and Biological Process (BP), a total of 71 GO terms were found to be significantly enriched (*p*-values ranges from $9.92 \cdot 10^{-3}$ to $2.96 \cdot 10^{-7}$). They were grouped in 18 main categories (Table 1). Groups of importance were composed of eggshell matrix proteins involved in binding and transport activity (41 proteins) and of 27 proteins related to the biology of development. Additionally, we also reported proteins involved in response to external stimulus (13 proteins), in the regulation of biological quality (15 proteins), exhibiting enzyme regulator activity (13 proteins). Also were present proteins related to protein post-translational folding (9 proteins), homeostasis maintenance (9 proteins), multi-organism process (8 proteins), nutrition and digestion (7 proteins), the extracellular organization (4 proteins), the cell–cell adhesion (5 proteins), the oxidoreductase activity (3 proteins), the coagulation process (2 proteins), the regulation of protein phosphorylation (2 proteins), the glycerol ether metabolic process (2 proteins) and the shell calcification (2 proteins).

4. Quantitative dataset of avian eggshell matrix proteins

Two different methods were applied to discern the relative abundance of the proteins at the different stages of eggshell formation, firstly the emPAI was calculated for all proteins at each individual stage and secondly, GeLC–MS/MS analyses combined with label free spectral counting method were carried out to determine quantitative values at the four stages of mineralization for the 216 unique proteins.
In the first approach, emPAI from the proteins was calculated amongst the proteins revealed at a particular stage of shell formation at 5, 6, 7 and 16 h p.o. The aim was to classify the relative abundance of the proteins within one individual stage and to determine those which were the most abundant ones. EmPAI values were reported for the 216 eggshell matrix proteins at each stage, a numerical value different from zero being introduced when the protein was present (Supplementary Table 1). EmPAI values were also used to determine the number of proteins present at a particular stage (Supplementary Table 2). The numbers of proteins showing an emPAI different from zero were 91, 132, 178 and 184 at 5, 6, 7 and 16 h p.o., respectively.

In the second approach, GeLC-MS/MS combined with label free quantitative analyses based on a spectral counting method were used to compare the abundances of the different proteins between the four stages of eggshell formation (Supplementary Tables 1 and 2). One way ANOVA was performed on quantitative values for protein abundance in order to reveal proteins which were at a different concentration between at least one stage relative to another one. Differences were considered to be statistically significant for p-value < 0.01. Amongst the 216 proteins, 175 showed differential abundance according to the four stages of shell calcification. The mean abundance per stage of shell calcification was standardized for each protein on mean values per stage and was calculated to perform hierarchical clustering analysis. A total of ten clusters were highlighted and detailed in [1]. They were grouped in five main protein profiles associated with the different events which occur during eggshell calcification [1,3]: overabundance during the primary events of widespread deposition of amorphous calcium carbonate, totaling 27 proteins (5–6 h p.o.), overabundance during transformation of ACC into crystalline calcite aggregates, totaling 13 proteins (6 h p.o.), overabundance during the formation of larger calcite crystal units, totaling 47 proteins (6-7 h p.o.), overabundance during rapid growth of calcite and development of a columnar structure with preferential orientation of calcite, totaling 70 proteins (16 h p.o.). The last group corresponded to overabundance throughout the three late stages of calcification (6-7 to 16 h p.o.), totalising 18 proteins.

5. Supplementary functional annotations of avian eggshell matrix proteins

Potential functions of proteins were determined according to the literature, data annotations and functional domain database and highlighted 77 proteins with potential functions related to a mineralization process [1].

Beside these proteins, we identified 35 proteins with potential antimicrobial functions present at various stages of mineralization (Supplementary Table 3). These antimicrobial proteins were present a quite equally number throughout the different stages of shell formation.

The most abundant protein in the shell matrix is *lysozyme*, which is known to hydrolyze 1–4 beta linkages between N-acetyl muramic acid and N-acetyl-D-glucosamine residues in peptidoglycans of Gram-positive bacteria [16]. Another notable proteins is *OVAX*, which exhibits antimicrobial properties against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* enteritidis [17]. *Avian* β *defensin* 11, belonging to avian β defensin family, is a cationic peptides with three standed β sheet structure connected with β hairpin loop that protect against Gram-positive and Gram-negative bacteria [18]. *Ovocledin-17*, a C-type lectin protein which exhibits antimicrobial properties against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is also a major eggshell protein [19].

Another group is constituted of antimicrobial proteins by depriving bacteria of essential nutrients. *Ovotransferrin, vitellogenin-1 and 2* and *MFI2* are antimicrobial by their capacity to chelate iron ions, essential for bacterial growth [20]. *GC*, a group-specific component and *riboflavin protein* bind vitamins which are depriving bacteria from vitamin D.

We report *ovocalyxin-36*, *BPIFCB* and *ovoglobulinG2 type AA*, which belong to the LBP/BPI/PLUNC family known to bind to the lipid A portion of lipopolysaccharide cell wall in Gram-negative bacteria leading to the death of bacteria [21].

The study also revealed protease inhibitors which can be potentially antimicrobial by their ability to inhibit proteases secreted by some bacteria. *Ovoinhibitor, ovomucoid, SPARC, follistatin, follistatin-like* 1 and *IGFBP7* exhibit Kazal like protease inhibitor domains. Moreover, ovoinhibitor was showed to

inhibit *Bacillus thuringiensis* growth [22]. *Ovocalyxin-32* presents homology with latexin, a carboxypeptidase inhibitor, and has been shown to inhibit *B. subtilis* growth [23]. *SERPIND1*, *SERPINF2*, *SERPINE2*, *SERPING1* and *SERPINI1* belong to SERPIN family, a known family of serine protease inhibitors [16]. *Ovocalyxin-25* contains two inhibitor protease domains, a WAP and a Kunitz-like domain [24]. *Cystatin C* is a cysteine protease inhibitor, and *ovostatin* is known to inhibit all four classes of proteases [16].

Finally our study revealed several fragment of immunoglobulin (*Ig-light-2, Ig-gamma-heavy, Ig-lambda-1, Ig-lambda-2, Ig-light-1, Ig-mu-heavy* and *Ig-alpha-heavy*).

Finally, out of the 175 eggshell matrix proteins showing significant variation of abundance according to the four stages of shell calcification, 81 could not be ascribed to any of these functional groups and were classified as "other or unknown role" (Supplementary Table 4).

Conflict of interest

Authors claim no conflict of interest.

Acknowledgments

This research was funded by the French National Research Agency ANR (ANR-13-BSV6-0007-01, ANR-13-BSV6-0007-02 and ANR-13-BSV6-0007-05). The high resolution mass spectrometer was financed (SMHART project, 35069) by the European Regional Development Fund (ERDF), the Conseil Régional du Centre, the French National Institute for Agricultural Research (INRA) and the French National Institute of Health and Medical Research (Inserm). ARN acknowledges funding through Grants CGL2011-25906 (Ministerio de Economia, Spain).

The authors are grateful to the experimental units (UE-PEAT) for care of birds, and to the genotoul bioinformatics platform Toulouse Midi-Pyrenees for providing help and/or computing and/or storage resources.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at http://dx.doi. org/10.1016/j.dib.2015.06.019.

References

- P. Marie, V. Labas, A. Brionne, G. Harichaux, C. Hennequet-Antier, A.B. Rodriguez-Navarro, et al., Quantitative proteomics provides new insights into chicken eggshell matrix protein functions during the primary events of mineralization and the active calcification phase, J. Proteomics 126 (2015) 140–154.
- [2] J.A. Vizcaino, E.W. Deutsch, R. Wang, A. Csordas, F. Reisinger, D. Rios, et al., ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination, Nat. Biotechnol. 32 (2014) 223–226.
- [3] A.B. Rodriguez-Navarro, P. Marie, Y. Nys, M.T. Hincke, J. Gautron, Amorphous calcium carbonate controls avian eggshell mineralization: a new paradigm for understanding rapid eggshell calcification, J. Struct. Biol. 190 (2015) 291–303.
- [4] V. Labas, I. Grasseau, K. Cahier, A. Gargaros, G. Harichaux, A.P. Teixeira-Gomes, et al., Qualitative and quantitative peptidomic and proteomic approaches to phenotyping chicken semen, J. Proteomics 112 (2015) 313–335.
- [5] A. Keller, A.I. Nesvizhskii, E. Kolker, R. Aebersold, Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search, Anal. Chem. 74 (2002) 5383–5392.
- [6] A.I. Nesvizhskii, A. Keller, E. Kolker, R. Aebersold, A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry, Anal. Chem. 75 (2003) 4646–4658.
- [7] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T.J. Gibson, K. Karplus, W.Z. Li, et al., Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, Mol. Syst. Biol. (2011) 7.
- [8] C. Camacho, G. Coulouris, V. Avagyan, N. Ma, J. Papadopoulos, K. Bealer, et al., BLAST plus: architecture and applications, BMC Bioinform. (2009) 10.
- [9] K. Mann, B. Macek, J.V. Olsen, Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer, Proteomics 6 (2006) 3801–3810.

- [10] K. Mann, J.V. Olsen, B. Macek, F. Gnad, M. Mann, Phosphoproteins of the chicken eggshell calcified layer, Proteomics 7 (2007) 106–115.
- [11] I. Miksik, J. Charvatova, A. Eckhardt, Z. Deyl, Insoluble eggshell matrix proteins their peptide mapping and partial characterization by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography, Electrophoresis 24 (2003) 843–852.
- [12] I. Miksik, A. Eckhardt, P. Sedlakova, K. Mikulikova, Proteins of insoluble matrix of Avian (Gallus Gallus) eggshell, Connect. Tissue Res. 48 (2007) 1–8.
- [13] I. Miksik, P. Sedlakova, K. Lacinova, S. Pataridis, A. Eckhardt, Determination of insoluble avian eggshell matrix proteins, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 205–214.
- [14] M. Rose-Martel, J.W. Du, M.T. Hincke, Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle, J. Proteomics 75 (2012) 2697–2706.
- [15] C.J. Sun, G.Y. Xu, N. Yang, Differential label-free quantitative proteomic analysis of avian eggshell matrix and uterine fluid proteins associated with eggshell mechanical property, Proteomics 13 (2013) 3523–3536.
- [16] S. Réhault-Godbert, V. Hervé, J. Gautron, C. Cabau, Y. Nys, Molecules involved in chemical defence of the chicken egg, in: Y. Nys, M. Bain, F. Van Immerseel (Eds.), Improving the Safety and Quality of Eggs and egg Products, Woodhead Publishing limited, Cambridge 2011, pp. 183–208.
- [17] S. Rehault-Godbert, V. Labas, E. Helloin, V. Herve-Grepinet, C. Slugocki, M. Berges, et al., Ovalbumin-related protein X is a heparin-binding ov-serpin exhibiting antimicrobial activities, J. Biol. Chem. 288 (2013) 17285–17295.
- [18] V. Herve-Grepinet, S. Rehault-Godbert, V. Labas, T. Magallon, C. Derache, M. Lavergne, et al., Purification and characterization of avian beta-defensin 11, an antimicrobial peptide of the hen egg, Antimicrob. Agents Chemother. 54 (2010) 4401–4408.
- [19] O. Wellman-Labadie, J. Picman, M.T. Hincke, Antimicrobial activity of cuticle and outer eggshell protein extracts from three species of domestic birds, Br. Poult. Sci. 49 (2008) 133–143.
- [20] J.A. Garibaldi, Role of microbial iron transport compounds in bacterial spoilage of eggs, Appl. Microbiol. 20 (1970) 558–560.
- [21] J. Gautron, S. Rehault-Godbert, G. Pascal, Y. Nys, M.T. Hincke, Ovocalyxin-36 and other LBP/BPI/PLUNC-like proteins as molecular actors of the mechanisms of the avian egg natural defences, Biochem. Soc. Trans. 39 (2011) 971–976.
- [22] M. Bourin, J. Gautron, M. Berges, S. Attucci, G. Le Blay, V. Labas, et al., Antimicrobial potential of egg yolk ovoinhibitor, a multidomain kazal-like inhibitor of chicken egg, J. Agric. Food Chem. 59 (2011) 12368–12374.
- [23] J. Xing, O. Wellman-Labadie, J. Gautron, M.T. Hincke, Recombinant eggshell ovocalyxin-32: expression, purification and biological activity of the glutathione S-transferase fusion protein, Comp. Biochem. Pysiol. B Biochem. Mol. Biol. 147 (2007) 172–177.
- [24] J. Gautron, Y. Nys, Function of eggshell matrix proteins, in: R. Huopalahti, R. Lopez-Fandino, M. Anton, R. Schade (Eds.), Bioactive Egg Compounds, Springer-VerlagGermany 2007, pp. 109–115.

V-Discussion et perspectives

1 Discussion générale

Mes recherches ont porté sur l'étude des mécanismes de formation de la coquille d'œuf de poule. Ce processus de biominéralisation conduit à l'élaboration d'une coquille dont l'ultrastructure parfaitement contrôlée et aboutie est à l'origine de ses propriétés mécaniques remarquables (Nys et al, 2004, Hincke et al, 2012). Cette calcification se produit en plusieurs étapes à partir des sécrétions minérales et organiques de l'utérus au sein du fluide utérin (Nys et al, 1991). La matrice organique intervient dans le processus de minéralisation en influençant le type polymorphique et la morphologie des cristaux de calcite et en contrôlant la croissance des cristaux comme cela a pu être démontré in vitro et in vivo (Dominguez-Vera et al, 2000, Panheleux et al, 2000, Nys et al, 2004, Ahmed et al, 2005, Hernandez-Hernandez et al, 2008a, Hernandez-Hernandez et al, 2008b, Hincke et al, 2012). Ainsi, en présence de protéines du fluide utérin ou de la matrice organique de la coquille, le seul type polymorphique obtenu est la calcite, contrairement aux conditions contrôles où les trois types polymorphiques, calcite (55%), aragonite (22,5%) et vatérite (22,5%), sont représentés (Hernandez-Hernandez et al, 2008a, Hernandez-Hernandez et al, 2008b). L'adsorption des protéines de la matrice organique conduit quant à elle à l'inhibition de la croissance cristalline de la calcite sur certaines faces. Les cristaux de calcite présentent alors une morphologie modifiée par rapport à la morphologie rhomboédrique obtenue en absence de matrice organique. Elle se caractérise par un allongement du cristal selon l'axe-c (plus grande longueur du cristal) et l'apparition de nouvelles faces cristallines parallèles à cet axe (Figure 10).





Lors des premiers évènements de minéralisation sur les noyaux mamillaires, les premiers cristaux de calcite ne présentent pas d'orientation privilégiée de leurs axes-c, les cristaux étant orientés dans toutes les directions (voir Figures 6 a et 7 a de la synthèse bibliographique) (Rodriguez-Navarro and Garcia-Ruiz, 2000, Nys et al, 2004). L'action de la matrice organique conduit à l'obtention de cristaux de morphologie allongée (Figure 10 b). La croissance des unités cristallines se poursuit et des évènements de compétition se mettent progressivement en place au cours de la croissance cristalline (Figure 6 b de la synthèse bibliographique). La croissance des unités cristallines avec des cristaux dont l'axe-c se développe vers l'intérieur est inhibée par les membranes coquillières (Arias et al, 1997). De même, les unités cristallines avec des cristaux qui se développent parallèlement à la surface de l'œuf vont se rencontrer et arrêter de croitre dans cette direction du fait d'une compétition physique. Seule une croissance vers l'extérieur est possible lorsque la minéralisation continue (voir Figure 6 c de la synthèse bibliographique). Ce phénomène aboutit à la mise en place d'une orientation privilégiée progressive des cristaux avec un axe-c perpendiculaire à la surface de la coquille (Rodriguez-Navarro and Garcia-Ruiz, 2000). Dans la couche palissadique, la coquille sera constituée d'unités cristallines avec des cristaux dont l'axe-c sera perpendiculaire à la surface (Rodriguez-Navarro and Garcia-Ruiz, 2000, Nys et al, 2004) (Figure 7 b et c de la synthèse bibliographique).

Dans ce contexte, mon travail de thèse a consisté à déterminer des constituants-clés de la matrice organique intervenant dans les interactions matrice organique/minéraux au cours des différentes étapes du processus de biominéralisation. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux trois principales phases de la minéralisation (initiation, croissance et terminale). Pour ce faire, nous avons identifié, quantifié les protéines de la matrice organique et mesuré leur variation d'abondance dans le fluide utérin lors de ces trois principaux stades. Dans un second temps, nous avons étudié plus particulièrement les différents évènements se produisant au cours de la phase initiale de la minéralisation. Cette dernière qui est constituée de différents évènements (nucléation, apparition de la calcite sur les noyaux mamillaires et accroissement des unités cristallines) est une étape déterminante dans la mise en place de l'orientation des cristaux qui définissent la structure du biomatériau et par conséquent ses propriétés mécaniques. Des coquilles en formation ont été recueillies aux différents temps de la phase initiale de la minéralisation. Dans le cadre d'une coopération internationale entre mon laboratoire d'accueil et l'université de Grenade (Espagne), j'ai contribué à une étude sur la caractérisation des évènements minéralogiques lors de l'initiation de la minéralisation qui a permis des avancées importantes sur la nature du carbonate de calcium impliqué dans ces évènements. Sur ces mêmes échantillons de coquille en formation, une étude protéomique quantitative qui couvre la totalité des évènements-clés de l'initiation de la minéralisation a été réalisée.

Ce travail protéomique complète l'inventaire global des protéines de la coquille de l'œuf et de son milieu de formation. Parmi celles-ci, nous avons plus particulièrement porté notre attention sur 20 acteurs majeurs potentiellement déterminants dans ces évènements de minéralisation.

1.1 Evènements minéralogiques de l'initiation de la minéralisation

Un de nos objectifs a été de suivre la composition minéralogique et cristallographique d'échantillons de coquilles en cours de formation (article n°3). Le résultat marquant de cette étude est la mise en évidence pour la première fois du carbonate de calcium amorphe lors de la biominéralisation chez un vertébré et la compréhension de son implication dans ce processus. Nous avons également confirmé que la minéralisation débute à 5 heures après l'ovulation par le dépôt des noyaux mamillaires et établi qu'une première phase minérale de carbonate de calcium est présente sous forme amorphe sur la totalité des membranes coquillières. Elle se poursuit par la transformation du carbonate de calcium amorphe en

calcite à 6 heures après l'ovulation et l'établissement d'unités cristallines de calcite en croissance à 7 heures après l'ovulation.

Ces résultats apportent un éclairage nouveau sur les évènements précoces de la minéralisation et sur le processus dans son ensemble. Comme cela a pu être évoqué pour les minéralisations chez les invertébrés (Addadi *et al*, 2003), le carbonate de calcium amorphe apparaît comme un intermédiaire essentiel du processus de minéralisation. Il peut servir de réserve d'ions carbonate et calcium et de précurseur transitoire au polymorphe cristallin ensuite formé. L'agrégation de nanoparticules de carbonate de calcium amorphe est une étape-clé de l'initiation de la minéralisation. Ces particules sont ensuite transformées en calcite par un processus de dissolution/recristallisation. Le passage par une forme amorphe contribue à la vitesse de minéralisation élevée de la coquille. Les réactions de transformation des ions en carbonate de calcium amorphe et du carbonate de calcium amorphe en calcite sont plus favorables d'un point de vue énergétique que la transformation directe des ions en solution en calcite.

Comme évoqué précédemment, la matrice organique joue un rôle important dans ces différents évènements par le contrôle qu'elle exerce lors de la mise en place et la croissance des cristaux de calcite. Elle pourrait également stabiliser la forme amorphe de carbonate de calcium déposée en début de minéralisation, comme cela est le cas chez les invertébrés (Ma *et al*, 2007, Politi *et al*, 2007, Ndao *et al*, 2010, Gong *et al*, 2012, Rao *et al*, 2013, Su *et al*, 2013) ou intervenir dans sa transformation en calcite. Nous avons ainsi souhaité identifier et caractériser d'un point de vue fonctionnel les protéines présentes lors de ces différents évènements de minéralisation afin de mettre en évidence celles jouant un rôle pivot dans ces derniers.

1.2 Inventaire global des protéines de la matrice organique

L'identification et la caractérisation des protéines de la matrice organique nous a conduits à effectuer un inventaire global de cette dernière. Dans une première étape, les trois principaux stades de la minéralisation ont été explorés par une analyse du fluide utérin. Celuici est bien adapté pour une étude protéomique car il contient tous les précurseurs minéraux et organiques de la coquille sous forme soluble et son analyse ne requiert pas d'étape préalable de dénaturation. Au total, 308 protéines ont été identifiées dans le fluide utérin (articles n°1 et 2). Dans une seconde étape, nos études ont ciblé l'initiation de la minéralisation, phase cruciale pour l'établissement de l'ultrastructure de la coquille et la détermination des propriétés mécaniques qui en découlent. Trois étapes essentielles de cette phase où la vitesse de minéralisation est faible ont été étudiées. Une comparaison a été effectuée avec une étape de la phase de croissance linéaire, où le dépôt minéral est le plus rapide. Au total, 216 protéines de la matrice organique de la coquille ont été identifiées dans cette étude (articles n° 4 et 5).

Les protéines que nous avons ainsi mises en évidence ont ensuite été comparées aux protéines identifiées au cours d'études protéomiques antérieures. Mann et collaborateurs (Mann et al, 2006, Mann et al, 2007a) ont caractérisé la matrice organique solubilisée à partir de la coquille achevée, sans distinguer les différentes couches, mais en incluant la recherche spécifique des protéines phosphorylées. Sun et collaborateurs (Sun et al, 2013) ont réalisé un protéome de la matrice organique solubilisée et ont comparé des coquilles fragiles et résistantes. Ces coquilles étaient prélevées au cours de leur formation lors de la phase de croissance (18 heures après l'ovulation) et les protéines caractérisées correspondent à celles déposées dans les couches mamillaires et palissadiques. Dans deux autres études, Miksik et collaborateurs (Miksik et al, 2007, Miksik et al, 2010) ont divisé la coquille achevée en quatre fractions (couche mamillaire, deux fractions de la couche palissadique et cuticule) et ont identifié les protéines de la fraction insoluble de la matrice organique dans chacune des fractions. Les résultats de ces dernières études restent cependant limités puisque seulement 6 et 28 nouvelles protéines ont été identifiées dans chacune de ces études (Miksik et al, 2007, Miksik et al, 2010). Dans une étude récente, Rose-Martel et collaborateurs (Rose-Martel et al, 2012) ont caractérisé 47 protéines dans la cuticule, couche organique la plus externe de la coquille. Sun et collaborateurs (Sun et al, 2013) ont été les premiers à s'intéresser aux protéines présentes dans le fluide utérin, comparant les protéines présentes dans celui de poules pondant des œufs soit à coquilles fortes soit à coquilles faibles. Comme pour leur étude portant sur la coquille, les prélèvements ont eu lieu à un seul temps de la calcification de la coquille, 18 heures après l'ovulation du jaune.

Notre première ambition a été de rassembler tous les identifiants protéiques mis en évidence dans ces études et d'éliminer la redondance existante entre les protéines par une analyse bioinformatique. Ce travail d'intégration permet d'obtenir une liste non redondante des protéines identifiées à ce jour dans la coquille et dans le fluide utérin. Elle pourra servir de base de comparaison lors d'études futures sur la coquille ou le fluide. Nous avons ainsi pu établir deux listes cohérentes des constituants de la matrice organique composées de 550 protéines pour le fluide utérin et de 675 protéines pour la coquille (article n°1). La comparaison des listes de protéines mises en évidence au cours de nos différentes études avec

ces listes non redondantes a établi que 94 protéines étaient identifiées pour la première fois dans le fluide utérin (article n°1) et 24 dans la coquille (article n°4). Nous avons ainsi porté le nombre des protéines identifiées dans le fluide utérin à 644 (article n°1) et celui des protéines identifiées dans la coquille à 699 (article n°4). L'ensemble de nos travaux a permis d'apporter de nouvelles connaissances sur la composition protéique de la coquille ainsi que sur celui de son milieu de formation, le fluide utérin.

Au cours de la rédaction de cette thèse, deux nouvelles études portant sur la matrice organique de la coquille sont parues. Dans la première, Miksik et collaborateurs (Miksik et al, 2014) analysent la fraction insoluble de la cuticule, la couche organique la plus externe de la coquille, et identifient 29 protéines toutes identifiées au préalable dans la coquille ou le fluide utérin. L'abondance de 14 d'entre elles diffère en fonction de la zone de cuticule étudiée (taches de pigmentation de diamètre d'environ 300 µm, taches de pigmentation de diamètre d'une dizaine de µm ou zone autour des taches). Dans la seconde, Rose-Martel et collaborateurs (Rose-Martel et al, 2015) se sont intéressés à la composition des noyaux mamillaires. Ils ont comparé les protéomes des membranes coquillières sur lesquelles sont ancrés ou non les noyaux mamillaires dans deux modèles différents (œufs fertilisés et œufs non fertilisés). Dans le modèle œufs fertilisés, les coquilles d'œufs ont été prélevées à deux stades du développement embryonnaire, au jour 15 et au jour 19. Au jour 15, 317 protéines uniquement présentes dans les membranes coquillières ont été identifiées. Au jour 19, 168 protéines présentes à la fois dans les membranes coquillières et les noyaux mamillaires ont été identifiées. La comparaison entre les deux listes montre que 57 protéines sont spécifiques du jour 19 et correspondraient aux protéines des noyaux mamillaires dans ce modèle. Dans le modèle des œufs non fertilisés, les coquilles d'œufs ont été traitées ou non à l'acide chlorhydrique pendant 30 minutes. En absence de traitement, 80 protéines uniquement présentes dans les membranes coquillières ont été identifiées. Après traitement à l'acide chlorhydrique, 144 protéines présentes dans les membranes coquillières et les noyaux mamillaires sont identifiées. La comparaison entre les deux listes montre que 70 protéines sont présentes spécifiquement suite au traitement et correspondraient aux protéines des noyaux mamillaires dans ce modèle. Les 57 et 70 protéines considérées comme les protéines des noyaux mamillaires dans chacun des deux modèles ont été comparées et 18 sont communes entre les deux modèles et sont potentiellement des protéines plus spécifiquement présentes dans les noyaux mamillaires. Certaines peuvent lier le calcium ou sont des protéines chaperonnes ou des inhibiteurs de protéases et pourraient jouer un rôle fondamental dans l'initiation de la minéralisation. La comparaison de ces protéines avec celles identifiées au

préalable dans la coquille et le fluide utérin est en cours dans notre laboratoire. Elle permettra d'actualiser les protéomes globaux de la matrice organique de la coquille et du fluide utérin.

1.3 Caractérisation quantitative et fonctionnelle des protéines

Suite à l'inventaire global, l'objectif principal de mes travaux était l'analyse quantitative des protéines prédominantes de la matrice organique de la coquille au cours de différentes étapes-clés du processus de minéralisation. Cette analyse a été couplée à une analyse fonctionnelle des protéines surabondantes en se basant sur l'utilisation des connaissances existantes et d'outils bioinformatiques. Cette nouvelle approche, qui étudie les variations d'abondance des protéines durant la calcification, complète les études antérieures et apporte ainsi de nouvelles informations sur la localisation des protéines selon les différentes couches de la coquille et permet de hiérarchiser les acteurs fonctionnels clés dans chacune des phases du processus de minéralisation.

La première étape s'intéressait au processus de minéralisation dans son ensemble (articles n°1 et 2). Dans cette étude, 96 des 308 protéines identifiées ont été quantifiées à ces trois stades. Parmi ces protéines, 64 présentent une abondance différentielle à au moins un des trois stades. Cinq profils protéiques ont pu être définis. L'étude fonctionnelle des protéines identifiées nous a permis de mettre en évidence 24 protéines qui interviendraient dans la minéralisation et présentes dans l'un ou l'autre des profils. L'analyse protéomique quantitative (articles n°4 et 5) réalisée sur la matrice organique de la coquille nous a permis de déterminer les protéines présentes et potentiellement actives durant les évènements minéralogiques décrits dans l'article n°3. Les 216 protéines identifiées ont été quantifiées dans chacun de ces évènements. Parmi ces protéines, 175 sont surabondantes à au moins un des évènements étudiés. Dix profils protéiques ont été rassemblés en cinq groupes qui peuvent être décrits au regard des évènements minéralogiques définis protéines identifiées nous a permis de mettre en évidence 77 protéines qui pourraient être impliquées dans le processus de minéralisation de façon directe ou indirecte et présentes dans l'un ou l'autre des profils.

Parallèlement à ces protéines éventuellement impliquées de façon directe ou indirecte dans le processus de minéralisation, nos travaux révèlent des protéines potentiellement antimicrobiennes. Ces protéines ont pour fonction d'assurer la stérilité de la lumière de l'oviducte et de l'œuf tout au long du processus de formation de la coquille et dans chacune des couches la constituant. Elles sont distribuées de manière équitable dans les différents

profils protéiques mis en évidence au cours de nos analyses (articles n°1 et 4). Leurs fonctions sont détaillées dans les articles n°1 et 5. Une partie de ces protéines correspond à des fragments d'immunoglobulines (chaines légères comme chaines lourdes), qui participent à l'immunité adaptative. L'autre partie correspond à divers composants chimiques intervenant dans l'immunité innée. Différentes stratégies pour lutter contre les pathogènes sont retenues par ces composants : dégradation de certains constituants des pathogènes (le lysozyme dégrade les peptidoglycanes des parois bactériennes des bactéries Gram positives), stockage d'éléments nutritifs essentiels pour les pathogènes qui ne seront alors plus disponibles pour la croissance de ces derniers (l'ovotransferrine stocke le fer) ou activité anti-protéase qui va limiter le pouvoir pathogène des protéases exogènes sécrétées par certaines bactéries pour décomposer les protéines de l'hôte afin de les inactiver ou de les utiliser comme source de nutriments.

1.4 Candidats protéiques mis en évidence

Au travers des études protéomiques réalisées, nous avons pu mettre en évidence des protéines intervenant dans le processus de minéralisation à chacun des stades et/ou à chacun des évènements de l'initiation du processus de minéralisation. Parmi celles-ci, 20 candidats nous sont apparus déterminants au vu de leurs fonctions potentielles, de leur abondance dans le fluide ou la matrice organique de la coquille et de leur surabondance dans une des étapesclés du processus de minéralisation. L'abondance de ces protéines dans nos analyses est en accord avec les résultats obtenus par Mann et collaborateurs (Mann *et al*, 2006). Nous identifions 14 des 32 protéines classées comme des protéines de la matrice organique de haute abondance et 4 (nucléobindine-2, glypican-4, HAPLN3, ovomucoïde) des 72 classées comme des protéines d'abondance intermédiaire. Les deux dernières, l'ovocalyxine-25 et LOC428451, ne sont pas identifiées par Mann et collaborateurs (Mann *et al*, 2006). Les 20 protéines sont décrites ci-après en fonction de leur fonction potentielle.

1.4.1 <u>Protéines directement impliquées dans la minéralisation</u>

Protéines connues pour jouer un rôle dans la minéralisation

L'ovotransferrine se distingue dans nos travaux par son abondance élevée tant dans le fluide utérin (où elle est la protéine la plus abondante) que dans la matrice organique de la coquille (entre la 2^{ème} et la 5^{ème} protéine en terme d'abondance en fonction du stade) (articles

n°1 et 4). Elle apparaît surabondante au cours de l'initiation dans le fluide utérin comme dans la matrice organique de la coquille et plus particulièrement lors des premiers évènements de minéralisation caractérisés par le dépôt de carbonate de calcium amorphe (articles n°1 et 4). Ces observations sont en cohérence avec sa localisation au niveau des membranes coquillières et des noyaux mamillaires dans la coquille et sa mise en évidence en quantité plus importante au cours de l'initiation dans le fluide utérin lors d'une étude antérieure (Gautron *et al*, 2001b). Cette protéine est connue pour modifier la morphologie des cristaux de carbonate de calcium *in vitro* (Gautron *et al*, 2001b). Au vu de sa surabondance, elle pourrait participer à la stabilisation de la forme désordonnée de carbonate de calcium déposée lors des premiers évènements ou à la modification morphologique des cristaux de calcite.

L'ovalbumine est identifiée dans nos études comme une des protéines majeures de la matrice organique de la coquille (5^{ème} protéine en terme d'abondance dans le fluide utérin et entre la 2^{ème} et la 7^{ème} protéine selon les stades dans la matrice organique) (articles n°1 et 4). Nos résultats indiquent une surabondance de l'ovalbumine au cours de l'initiation de la minéralisation à la fois dans le fluide utérin et dans la matrice organique de la coquille et plus particulièrement lors de la formation d'unités cristallines de calcite en accroissement (articles n°1 et 4). Ceci est en cohérence avec les résultats antérieurs qui indiquent que cette protéine est localisée au niveau des noyaux mamillaires dans la coquille (Hincke, 1995) et présente en quantité plus importante dans le fluide utérin lors de la phase d'initiation (Gautron et al, 1997). L'ovalbumine a la possibilité de lier le calcium et est considérée comme une éponge à cations (Schwahn et al, 2004, Pipich et al, 2008). Cette propriété suggère que l'ovalbumine serait un acteur important de la minéralisation. De plus, Pipich et collaborateurs (Pipich et al, 2008) ont observé in vitro des modifications de la structure tridimensionnelle de l'ovalbumine et une agrégation de la protéine en présence d'ions calcium. Ils ont également observé que la première forme de carbonate de calcium obtenue en présence d'ovalbumine est amorphe et que celle-ci se transforme ensuite en phases cristallines plus stables (vatérite puis aragonite). A partir de ces observations, ils ont élaboré un scénario de la minéralisation du carbonate de calcium en présence d'ovalbumine, représenté Figure 11.



Figure 11 : Formation de carbonate de calcium en présence d'ovalbumine (Pipich *et al*, 2008)

D'après ce scénario, l'ovalbumine lie les ions calcium (Figure 11 a), ce qui entraîne un changement de conformation de la protéine (Figure 11 b). Un certain nombre de molécules d'ovalbumine s'agrège (Figure 11 c). Du carbonate de calcium est formé par l'association d'ions carbonate aux ions calcium, dans un premier temps sous forme amorphe (Figure 11 d). Des formes cristallines de carbonate de calcium plus stables sont obtenues à partir de la forme amorphe à la suite d'une série de transformations chimiques (Figure 11 e). L'ovalbumine a également été montrée comme pouvant modifier la morphologie des cristaux de carbonate de calcium (Hernandez-Hernandez *et al*, 2008a, Wang *et al*, 2010) et pourrait aussi stabiliser la forme amorphe du carbonate de calcium (Wang *et al*, 2010).

Le lysozyme a été majoritairement localisé dans les membranes coquillières et les noyaux mamillaires au niveau de la coquille et en quantité légèrement plus importante au cours de la phase de croissance au niveau du fluide utérin (Hincke *et al*, 2000). Il est la protéine de la matrice organique observée comme la plus abondante dans nos travaux $(2^{\text{ème}}$ protéine dans le fluide utérin et $1^{\text{ère}}$ dans la matrice organique, tous stades confondus, en terme d'abondance) (articles n°1 et 4). Cette forte concentration est cohérente avec les

Western Blotting réalisés sur le fluide utérin et dans différents extraits protéiques de coquille (Hincke *et al*, 2000). Le lysozyme est une protéine majeure de la matrice organique quel que soit le stade de la minéralisation et peut être considéré comme un acteur important de la calcification. Cette protéine est connue pour modifier la morphologie des cristaux de carbonate de calcium *in vitro* (Hincke *et al*, 2000). De plus, deux études montrent que le lysozyme possède une capacité de stabilisation du carbonate de calcium amorphe *in vitro* (Voinescu *et al*, 2007, Wang *et al*, 2009b) mais ces résultats ne sont pas confirmés par une troisième étude (Wolf *et al*, 2011).

L'ovocléidine-17 apparaît comme la 11^{ème} protéine du fluide utérin en terme d'abondance et la 3^{ème} protéine de la matrice organique de la coquille, quel que soit le stade étudié (articles n°1 et 4). Nos travaux mettent en évidence que l'ovocléidine-17 est surabondante lors de l'initiation de la minéralisation tant dans le fluide utérin que dans la matrice organique de la coquille. Au cours de la phase initiale, elle est plus particulièrement concentrée lors de la transformation du carbonate de calcium amorphe en calcite. Cette surabondance est en adéquation avec les différentes hypothèses formulées sur le rôle de l'ovocléidine-17 dans le processus de minéralisation. Elle a été montrée comme pouvant modifier la morphologie des cristaux de calcite (Reyes-Grajeda et al, 2004). De plus, une simulation moléculaire a permis d'émettre l'hypothèse que cette protéine pouvait transformer le carbonate de calcium amorphe en calcite selon un cycle catalytique défini (Figure 12) : l'ovocléidine-17 se fixe à une particule de carbonate de calcium amorphe et conduit sa transformation en calcite. La croissance du cristal de calcite induit la libération de la protéine, qui est alors libre de se fixer à une nouvelle particule de carbonate de calcium amorphe (Freeman et al, 2010). Trois configurations de liaison au carbonate de calcium pour la catalyse ont été proposées (Freeman et al, 2011).

Discussion et perspectives



Figure 12 : Cycle catalytique de la transformation du carbonate de calcium amorphe en calcite par l'ovocléidine-17 (Freeman *et al*, 2010)

Protéines de liaison au calcium

Quatre protéines liant le calcium mises en évidence lors de nos études constituent des candidats fonctionnels majeurs pour intervenir dans le processus de minéralisation.

EDIL3 (EFG-like repeats and discoidin I-like domains 3) apparaît comme une protéine importante de la matrice organique de la coquille entre 6 heures et 16 heures après l'ovulation (5^{eme} protéine à 6 et 7 heures et 4^{eme} protéine à 16 heures après l'ovulation) et est également présente dans le fluide utérin (51^{eme} protéine en terme d'abondance) (articles n°1 et 4). Elle est surabondante lors de l'initiation dans le fluide utérin et tout au long des étapes de la calcification dans la matrice organique de la coquille à l'exception du dépôt de carbonate de calcium amorphe 5 heures après l'ovulation (articles n°1 et 4). Il est à noter que son transcrit est retrouvé exprimé de façon importante par l'utérus (Brionne *et al*, 2014). Elle contient trois domaines de liaison type EGF-like, dont un seul lie le calcium. Ce domaine est un domaine d'environ 45 acides aminés. Six cystéines permettent la formation de trois ponts disulfures. Sa structure est composée de deux feuillets β à deux brins parallèles (Campbell and Bork, 1993). Ces deux feuillets forment une poche dans laquelle va pouvoir se loger le calcium.

MFGE8 (Milk fat globule-EGF factor 8 protein) apparaît comme la $20^{\text{ème}}$ protéine de la matrice organique de la coquille en terme d'abondance à 7 heures après l'ovulation et est également identifiée dans le fluide utérin ($75^{\text{ème}}$ protéine) (articles n°1 et 4). Elle est reportée comme étant surabondante au cours de l'initiation de la minéralisation, que ce soit dans le fluide utérin ou la matrice organique de la coquille, et plus précisément lors de la formation

d'unités cristallines de calcite en accroissement dans la matrice organique (articles n°1 et 4). Comme pour EDIL3, son transcrit est retrouvé exprimé de façon importante par l'utérus (Brionne *et al*, 2014). MFGE8 appartient à la même famille qu'EDIL3 et comporte deux domaines de liaison au calcium de type EGF-like.

La nucléobindine-2 est la 16^{eme} et 12^{eme} plus abondante protéine à 7 et 16 heures après l'ovulation, mais n'est pas identifiée dans le fluide utérin (article n°4). Nos résultats soulignent que cette protéine est surabondante dans la matrice organique tout au long du processus de calcification à l'exception de la phase de dépôt de carbonate de calcium amorphe 5 heures après l'ovulation (article n°4). Ce résultat confirme ceux de l'analyse transcriptomique qui montre que le transcrit de la nucléobindine-2 est surexprimé par l'utérus lorsqu'une coquille est en cours de minéralisation (Jonchere *et al*, 2010). Elle contient deux domaines de liaison au calcium de type EF-hand. Le domaine EF-hand est composé d'environ 30 acides aminés. Il présente une structure en hélice-boucle-hélice : deux hélices α d'une dizaine d'acides aminés entourent un domaine plus flexible de 12 acides aminés dans le motif conservé. Comme pour le domaine EGF-like, la structure forme une poche où l'ion calcium peut se loger (Lewit-Bentley and Rety, 2000, Gifford *et al*, 2007).

L'albumine est la 3^{eme} protéine en terme d'abondance dans le fluide utérin et la 13^{eme} protéine à 5 heures après l'ovulation et 3^{eme} protéine aux 3 autres stades dans la matrice organique de la coquille (articles n°1 et 4). Elle est surabondante aux stades croissance et terminal dans le fluide utérin (article n°1) et lors de la mise en place de la couche palissadique dans la matrice organique de la coquille (article n°4). Ces propriétés de liaison au calcium (Kraghhansen and Vorum, 1993) font de cette protéine un candidat fonctionnel à étudier.

L'hémopexine (25^{eme} protéine du fluide utérin et entre la 11^{eme} et la 23^{eme} protéine de la matrice organique selon les stades, articles n°1 et 4) est surabondante durant l'initiation, à la fois dans le fluide utérin et dans la matrice organique de la coquille. Elle est plus particulièrement concentrée lors des premiers évenements de minéralisation caractérisés par le dépôt d'une phase désordonnée de carbonate de calcium (articles n°1 et 4). Cette protéine présente des capacités de liaison des ions métalliques divalents (Mauk *et al*, 2005) et pourrait donc lier les ions calcium pour stabiliser la phase amorphe.

Protéines associées aux protéoglycanes

Les protéoglycanes sont composées d'une partie protéique sur laquelle sont ancrés des sucres complexes. Elles ont la capacité de lier les ions calcium (Hunter *et al*, 1988). Des liaisons peuvent s'établir entre ces ions et les charges négatives portées par les protéoglycanes. L'hypothèse a été émise que ces molécules pouvaient intervenir dans le processus de minéralisation (Fernandez *et al*, 1997, Fernandez *et al*, 2001).

L'ovocléidine-116 apparaît comme la 2^{eme} protéine de la matrice organique en terme d'abondance à 16 heures après l'ovulation et la 13^{eme} protéine du fluide utérin (articles n°1 et 4). Elle est surabondante lors de la phase de croissance active caractérisée par la mise en place de la couche palissadique de la coquille avec une orientation privilégiée des cristaux de calcite, que ce soit dans le fluide utérin ou dans la matrice organique de la coquille (articles n°1 et 4). Ces résultats confirment la localisation antérieure de l'ovocléidine-116 dans les noyaux mamillaires et la couche palissadique (Hincke *et al*, 1999). La séquence N-terminale obtenue pour l'ovocléidine-116 correspond à celle du cœur protéique d'un protéoglycane à dermatane sulfate présent dans la coquille (Hincke *et al*, 1999). Son implication dans la minéralisation est suggérée par la surexpression de son transcrit lors de la calcification de la coquille (Jonchere *et al*, 2010). De plus, la RT-PCR quantitative montre que l'expression du transcrit est 2,6 fois plus importante lors de la calcification par rapport à une absence de calcification (Figure 13) (Brionne *et al*, 2014).



Figure 13 : Comparaison de l'expression du transcrit de l'ovocléidine-116 entre une condition normale et une condition où l'œuf est expulsé (Brionne *et al*, 2014)

Le glypican-4 est une protéine présente dans la matrice organique de la coquille uniquement à 16 heures après l'ovulation et abondante à ce stade ($20^{\text{éme}}$ protéine en terme d'abondance) (article n°4). Elle est également identifiée dans le fluide utérin ($185^{\text{ème}}$ protéine) (article n°1). Elle est retrouvée surabondante dans la matrice organique de la coquille lors de la formation de la couche palissadique avec la mise en place de l'orientation privilégiée des cristaux de calcite (article n°4). Ce profil d'abondance est en corrélation avec l'expression du gène correspondant déterminée par Northern Blotting (Lavelin *et al*, 2002). Le gène est exprimé par les cellules de l'utérus de façon la plus importante entre 8 heures et 12 heures après l'entrée de l'œuf dans l'utérus, soit environ entre 13 heures et 17 heures après l'ovulation, c'est-à-dire lors de la phase de croissance active de la coquille. Le glypican-4 fait partie de la famille des glypicans, qui sont définis comme des héparanes sulfates. Au vu de son profil d'abondance, elle pourrait, comme l'ovocléidine-116, intervenir plus particulièrement lors de la phase de croissance active.

HAPLN3 (Hyaluronan And Proteoglycan LiNk protein 3) est une protéine majeure de la matrice organique de la coquille (9^{eme} à 23^{eme} protéine en terme d'abondance selon le stade) (article n°4). Elle est également identifiée dans le fluide utérin (147^{eme} protéine) (article n°1). Elle est surabondante dans la matrice organique lors des premiers évenements de minéralisation, caractérisés par le dépôt d'une phase amorphe de carbonate de calcium (article n°4). Cette protéine nous apparaît intéressante par sa capacité à lier les protéoglycanes (Spicer *et al*, 2003).

Protéines mises en évidence dans la minéralisation par une approche génomique

L'ovocalyxine-32 apparaît comme une protéine relativement abondante du fluide utérin $(29^{\text{ėme}} \text{ protéine en terme d'abondance})$ et de la matrice organique de la coquille (entre la $26^{\text{ėme}}$ et la $51^{\text{ėme}}$ protéine en fonction du stade) (articles n°1 et 4). Nos résultats montrent que l'ovocalyxine-32 est surabondante lors de l'initiation de la minéralisation tant dans le fluide utérin que dans la matrice organique de la coquille et plus particulièrement lors de la formation d'unités cristallines en accroissement pour la matrice organique de la coquille (articles n°1 et 4). Ils sont toutefois en contradiction avec des résultats antérieurs qui localisent l'ovocalyxine-32 dans les couches les plus externes de la coquille (haut de la couche palissadique, couche des cristaux verticaux et cuticule) (Gautron *et al*, 2001a). L'implication de l'ovocalyxine-32 dans le processus de minéralisation est mise en évidence par différentes analyses génétiques. Dans une première étude, Dunn et collaborateurs (Dunn

et al, 2009a) ont identifié des polymorphismes du gène de l'ovocalyxine-32 chez des poules Rhode Island et réalisé différentes mesures phénotypiques sur les coquilles d'œufs de ces mêmes poules. Le nucléotide en position 626 du gène peut ainsi être une cytosine ou une thymine et les poules, être homozygotes (C/C ou T/T) ou hétérozygotes (C/T) pour ce gène. Différents caractères phénotypiques de la coquille d'œuf ont été déterminés comme la rigidité dynamique, la force de rupture, l'épaisseur totale de la coquille ou l'épaisseur de la couche mamillaire. Il apparaît dans cette étude qu'un polymorphisme du gène de l'ovocalyxine-32 est associé à l'épaisseur de la couche mamillaire. Dans une seconde étude, Dunn et collaborateurs (Dunn et al, 2012) ont réalisé le même type d'expérimentation en mesurant d'autres caractères phénotypiques de la coquille, comme la taille et l'orientation des cristaux de calcite composant la coquille. Un polymorphisme du gène de l'ovocalyxine-32 apparaît associé à l'orientation de cristaux de calcite. Takahashi et collaborateurs (Takahashi et al, 2009) ont sélectionné deux lignées divergentes de poules en fonction de la résistance de la coquille et réalisé un croisement de ces lignées sur deux générations. Un QTL influençant la forme (petite et grande longueur de l'œuf) et la masse de l'œuf a été localisé sur la partie distale du chromosome 9. Ce QTL contient le gène de l'ovocalyxine-32.

1.4.2 Protéines régulant la fonction d'autres protéines

Ces protéines réguleraient la fonction des autres protéines et interviendraient ainsi de façon indirecte dans le processus de minéralisation. En effet, la minéralisation de la coquille a lieu dans un milieu extracellulaire et la régulation du processus doit ainsi être effectuée dans ce milieu par des protéines sécrétées *in situ*.

Protéines chaperonnes

Les protéines chaperonnes participent au repliement des protéines. Au sein du fluide utérin, elles interviendraient dans la bonne conformation des protéines de la matrice organique, permettant leur rôle dans la biominéralisation. Elles sont également impliquées dans les interactions protéine/protéine et de ce fait pourraient limiter l'activité biologique d'une protéine guidant la minéralisation.

La clusterine est abondante dans la coquille ($7^{\text{ème}}$ à $29^{\text{ème}}$ protéine en terme d'abondance selon les stades) (article n°4). Elle est également identifiée dans le fluide utérin ($58^{\text{ème}}$ protéine) (article n°1). La clusterine est surabondante lors de l'initiation de la minéralisation tant dans le fluide utérin que dans la coquille et plus particulièrement lors de la formation d'unités cristallines en croissance (articles n°1 et 4). Elle est exprimée dans les membranes coquillières et toute la partie calcifiée de la coquille, en quantité plus importante dans la couche mamillaire, le haut de la couche palissadique et la couche des cristaux verticaux (Mann *et al*, 2003). Elle est également plus abondante dans le fluide utérin lors de la phase de croissance active de la minéralisation (Mann *et al*, 2003). Son implication dans le processus de minéralisation est suggérée par la surexpression de son transcrit lorsqu'une coquille est en cours de formation dans l'utérus (Brionne *et al*, 2014). Elle peut être définie comme une protéine chaperonne qui empêcherait les protéines de la matrice organique de s'agréger de façon anormale (Mann *et al*, 2003).

L'ovocalyxine-21 a été identifiée comme étant la protéine la plus abondante de la matrice organique de la coquille (Mann *et al*, 2006). Dans nos études, elle est la 15^{eme} protéine de la matrice organique en terme d'abondance à 16 heures après l'ovulation et la 4^{eme} protéine du fluide utérin (articles n°1 et 4). Elle est surabondante lors de la phase de croissance active de la coquille à la fois dans le fluide utérin et dans la matrice organique de la coquille, phase caractérisée par la mise en place de la couche palissadique avec une orientation privilégiée des cristaux de calcite (articles n°1 et 4). Comme pour la clusterine, son rôle dans la minéralisation est suggéré par la surexpression de son transcrit lors de la calcification de la coquille dans l'utérus (Brionne *et al*, 2014). Cette protéine contient un domaine BRICHOS et, à ce titre, est considérée comme une protéine chaperonne (Gautron and Nys, 2007a).

PPIB (Peptidylprolyl isomerase B) est une protéine abondante de la matrice organique de la coquille (18^{eme}) à 45^{eme} protéine en fonction des stades) (article n°4). Elle est également identifiée parmi les protéines du fluide utérin (77^{eme} protéine) (article n°1). Elle est retrouvée surabondante dans la matrice organique de la coquille lors de la formation de la couche palissadique avec la mise en place d'une orientation privilégiée des cristaux de calcite (article n°4). PPIB appartient à la famille des peptidylprolyl isomérases qui catalysent l'isomérisation cis-trans de la liaison peptidique entre un acide aminé et la proline et présentent également des propriétés de chaperons moléculaires (Fischer and Bang, 1985).

Inhibiteurs de protéases

Les protéases jouent un rôle dans la régulation du processus de minéralisation par leur capacité à dégrader les protéines soit pour les inactiver soit pour transformer une protéine immature en protéine fonctionnelle. Les inhibiteurs de protéases interviendraient de façon indirecte en régulant l'activité des protéases dans le milieu de formation.

La cystatine C, un inhibiteur de protéases à cystéine (Hall *et al*, 1995), est une protéine majeure de la matrice organique de la coquille (21^{ème} protéine dans la fluide utérin, 10^{ème}

protéine à 5, 6 et 7 heures et 8^{em} protéine à 16 heures après l'ovulation dans la matrice organique) (articles n°1 et 4). Elle est surabondante au stade terminal dans le fluide utérin (article n°1) et lors de la formation de la couche palissadique lors de la mise en place d'une orientation privilégiée des cristaux de calcite dans la matrice organique de la coquille (article n°4).

L'ovomucoïde présente une abondance élevée à la fois dans le fluide utérin $(10^{\text{ème}})$ protéine en terme d'abondance) et dans la matrice organique de la coquille (entre la 4^{ème} et la 26^{ème} protéine selon les stades) (articles n°1 et 4). Elle est surabondante lors de l'initiation de la minéralisation à la fois dans le fluide utérin et dans la matrice organique de la coquille et plus particulièrement lors des premiers évènements de minéralisation (articles n°1 et 4). Cette protéine contient trois domaines Kazal-like et est connue pour inhiber les protéases à sérine (Rehault-Godbert *et al*, 2011).

L'ovocalyxine-25 est une protéine relativement abondante tant du fluide utérin $(16^{\text{ème}} \text{ protéine en terme d'abondance)}$ que de la matrice organique de la coquille (entre la $26^{\text{ème}}$ et la $31^{\text{ème}}$ protéine selon les stades) (articles n°1 et 4). Cette protéine est surabondante au stade initial dans le fluide utérin et tout au long de la calcification de la coquille dans la matrice organique de la coquille (articles n°1 et 4). Elle contient deux domaines inhibiteurs de protéases, un domaine de type Kunitz et un domaine WAP (Gautron and Nys, 2007a). Rose-Martel et collaborateurs (Rose-Martel *et al*, 2012) ont identifié l'ovocalyxine-25 comme étant une des protéines les plus abondantes de la cuticule, la couche organique externe de la coquille. Cette couche est connue pour être la première barrière contre les contaminations bactériennes de l'œuf et pour être dotée d'une activité antimicrobienne. Les auteurs suggèrent que l'ovocalyxine-25, comme d'autres inhibiteurs de protéases présents dans la cuticule, pourrait participer à cette activité (Rose-Martel *et al*, 2012).

> Phosphatases

Le degré de phosphorylation des protéines de la matrice organique est connu pour influer sur leurs fonctions. Ainsi, l'ostéopontine phosphorylée inhibe *in vitro* la précipitation du carbonate de calcium en solution, mesurée par l'ajout d'hydroxyde de sodium nécessaire au maintien du pH de la solution (la précipitation conduisant à une production d'ions H+ et à une acidification du milieu). Au contraire, l'ostéopontine préalablement déphosphorylée par une phosphatase alcaline ne possède plus cette capacité (Hincke and St. Maurice, 1998). L'ostéopontine présente trois sites de phosphorylation, les sérines 12, 14 et 15 (Hincke and St. Maurice, 1998). Par analogie avec l'ostéopontine, nous pouvons supposer que le degré de phosphorylation des protéines de la matrice organique influence la cinétique de minéralisation. Les kinases et les phosphatases apparaissent donc comme des candidates intéressantes de la régulation de la fonction des protéines intervenant dans la calcification.

LOC428451 est la 12^{em} protéine de la matrice organique de la coquille en terme d'abondance à 7 heures après l'ovulation et est également identifiée dans le fluide utérin (articles n°1 et 4). Nos résultats montrent que cette protéine est surabondante lors de l'initiation de la minéralisation, tant dans le fluide utérin que dans la matrice organique de la coquille, et plus particulièrement lors de la formation d'unités cristallines de calcite en accroissement dans la matrice organique (articles n°1 et 4). L'analyse de sa séquence montre que cette protéine contient un domaine phosphatase et qu'elle peut donc ôter des groupements phosphate des protéines qu'elle régule.

1.5 Conclusion

Les travaux réalisés ont révélé de nouveaux éléments sur le déroulement du processus de minéralisation, en particulier le rôle du carbonate de calcium amorphe comme un constituant minéral essentiel des phases précoces de la calcification. Par ailleurs, nous avons quantifié et hiérarchisé des protéines de la matrice organique intervenant dans la minéralisation. La Figure 14 présente les 20 protéines-clés qui participeraient de façon directe au processus de calcification (protéines associées à la biominéralisation, de liaison au calcium, constituants des protéoglycanes) ou indirecte (régulation de l'activité des protéines intervenant sur la minéralisation), soit dans les phases précoces de la minéralisation (5-7 heures après l'ovulation), soit dans la phase de croissance active (14-16 heures après l'ovulation). L'activité biologique de ces candidats devra être explorée au cours d'expérimentations supplémentaires décrites dans la partie perspectives.



<u>Rôle direct</u> : ovotransferrine, ovalbumine, lysozyme, ovocléidine-17, EDIL3, MFGE8, nucléobindine-2, hémopexine, HAPLN3, ovocalyxine-32 <u>Rôle indirect</u> : clusterine, ovomucoïde, ovocalyxine-25, ovocalyxine-32, LOC428451 Croissance active 14-16 heures après l'ovulation



<u>Rôle direct</u> : lysozyme, EDIL3, nucléobindine-2, albumine, ovocléidine-116, glypican-4 <u>Rôle indirect</u> : ovocalyxine-21, PPIB, cystatine C, ovocalyxine-25

Figure 14 : Répartition des protéines candidates intervenant dans les différents événements de minéralisation

2 <u>Perspectives</u>

Mes recherches ont principalement porté sur l'identification des protéines de la matrice organique de la coquille d'œuf de poule à différents temps clés du processus de minéralisation par une analyse protéomique quantitative. Elles seront complétées par une analyse transcriptomique du tissu utérin aux mêmes temps-clés du processus, réalisée par la méthode RNA-Sequencing. Ces deux analyses complémentaires permettront d'identifier des candidats impliqués dans la calcification de la coquille dont l'abondance varie en fonction de cette cinétique. Nos travaux ont ainsi déjà mis en évidence 20 protéines abondantes et surabondantes à au moins une des étapes-clés pouvant jouer un rôle dans le processus de minéralisation. Cette approche sera suivie d'une étape de validation expérimentale des candidats identifiés de manière à caractériser leur localisation, déterminer les facteurs physiologiques de la variation. Cette démarche est représentée par la Figure 15.



Figure 15 : Représentation schématique des perspectives de thèse

2.1 Mise en évidence de candidats impliqués dans la minéralisation

Une analyse transcriptomique du tissu utérin chez la poule par RNA-Sequencing est prévue dans le cadre du projet ANR IMPACT (Identification of Matrix Protein Affecting Calcite Texture in chicken and guinea fowl eggshells). Ce projet vise à identifier des candidats potentiels impliqués dans le processus de minéralisation à ses différentes étapes-clés et à confirmer leur implication dans celui-ci. L'analyse protéomique réalisée au cours de ma thèse et l'analyse transcriptomique complémentaire par RNA-seq chez la poule sont incluses dans la tâche 1 de ce projet ANR (Figure 16).





Les échantillons de tissus utérins utilisés pour l'analyse transcriptomique ont été prélevés sur les mêmes animaux et aux quatre mêmes stades du processus de minéralisation que dans notre étude présentée chapitre 2 (premiers évènements de nucléation caractérisés par le dépôt de carbonate de calcium amorphe, transformation du carbonate de calcium amorphe en calcite, formation d'unités cristallines de calcite en accroissement et formation de la couche palissadique de la coquille avec mise en place d'une orientation privilégiée des cristaux de calcite). Elle permettra d'identifier les transcrits différentiellement exprimés à au moins un de ces stades. Les protéines correspondantes seront traduites. Ces protéines constitueront des candidats potentiels intervenant dans le processus de minéralisation au(x) stade(s) où les transcrits sont surexprimés. Les listes de protéines mises en évidence par protéomique au cours de mes travaux et par transcriptomique seront analysées et comparées par des outils bioinformatiques. Nous pourrons ainsi déterminer si les candidats mis en évidence par transcriptomique et leurs profils d'abondance seront les mêmes que ceux révélés par protéomique. Ce travail fait partie de la tâche 4 de l'ANR IMPACT qui vise à reprendre tous

les résultats et à établir des corrélations entre les analyses à haut-débit (protéomique et transcriptomique) et les observations et analyses minéralogiques et cristallographiques réalisées sur les coquilles (tâche 3) pour confirmer l'implication des protéines identifiées dans les différentes étapes clés du processus de minéralisation.

2.2 Validation expérimentale des candidats

Les analyses quantitatives protéomiques et transcriptomiques identifieront un grand nombre de candidats protéiques pouvant être impliqués dans le processus de minéralisation. Il s'agira désormais de conduire un ensemble d'études sur ces protéines et celles issues de l'analyse transcriptomique pour valider expérimentalement leur implication dans le processus de minéralisation. L'analyse que j'ai menée a souligné l'importance de 20 protéines semblant jouer un rôle clé. Certaines ont un rôle déjà démontré vis-à-vis du processus de minéralisation, tandis que d'autres dont le rôle biologique n'est pas démontré nous apparaissent plus pertinentes à considérer dans un premier temps : EDIL3, MFGE8, la nucléobindine-2 ou l'albumine retenues pour leur capacité à lier les ions calcium, le glypican-4 retenu pour être un protéoglycane ou l'ovocalyxine-21 retenue pour être une protéine chaperonne.

La première étape nécessaire à l'étude de leur activité biologique apparaît être la purification de ces protéines de la matrice organique. Trois protéines de la matrice organique ont déjà été purifiées, l'ovocléidine-17 (Hincke *et al*, 1995), l'ovocléidine-116 (Hincke *et al*, 1999) et l'ovocalyxine-32 (Gautron *et al*, 2001a). Les purifications de l'ovocléidine-17 et de l'ovocléidine-116 font appel à une colonne d'hydroxyapatite et celle de l'ovocalyxine-32 à une colonne de sépharose. Pour les protéines identifiées liant le calcium (EDIL3, MFGE8, nucléobindine-2 et albumine), la séquence de purification pourra s'inspirer de ce qui a été fait pour l'ovocléidine-17 et l'ovocléidine-116. Les protéines sont en effet susceptibles de se lier à l'hydroxyapatite (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂). Différents difficultés peuvent apparaître dans cette étape : obtenir les protéines en concentration suffisante pour réaliser la suite des expérimentations et conserver la structure et la fonctionnalité de la protéine purifiée nécessaires aux mesures d'activités biologiques. Cependant, les protéines évoquées sont des protéines majeures de la matrice organique et devraient donc être présentes en quantité relativement importante dans la matrice.

Une fois purifiées, l'implication des protéines dans le processus de minéralisation pourra être évaluée *in vitro* par un test d'interaction protéine/minéral. Ce test, effectué dans un dispositif appelé champignon de minéralisation (Figure 17), sera réalisé en collaboration avec l'université de Grenade (Espagne) dans le cadre de la tâche 3 du projet ANR IMPACT (Figure 16).





Figure 17 : Photographie et représentation schématique du dispositif de minéralisation champignon de minéralisation (Dominguez-Vera *et al*, 2000)

La capacité à modifier la morphologie, le type polymorphique et la cinétique d'obtention des cristaux de carbonate de calcium des protéines purifiées sera examinée. Il est à noter que pour réaliser ce test, la protéine doit être soluble. Or, les essais de purification effectués par mon laboratoire d'accueil montrent que, dans la plupart des cas, les protéines de la matrice organique une fois purifiées précipitent et deviennent insolubles. Outre des protéines purifiées, des protéines recombinantes ou de fusion pourraient être utilisées pour ce test. Des expériences de cristallisation du carbonate de calcium *in vitro* en présence de protéines de fusion ont déjà été réalisées pour des protéines impliquées dans la minéralisation chez certains invertébrés (GST-PFMG1 (Liu *et al*, 2007) ou MBP-perlucine (Wang *et al*, 2008)).

En complément de la fonctionnalité de protéines candidates déjà évoquées, l'ovocléidine-17 apparaît intéressante à étudier par cette méthode. En effet, cette protéine de la matrice organique, déjà purifiée, caractérisée et cristallisée (Hincke *et al*, 1995, Mann and Siedler, 1999, Reyes-Grajeda *et al*, 2004, Lakshminarayanan *et al*, 2005), est prédite par des modélisations moléculaires pour stabiliser le carbonate de calcium amorphe (Freeman *et al*, 2010, Freeman *et al*, 2011) mais cette fonction reste hypothétique. Le test d'interaction permettra de confirmer les modifications minérales supposées. Il s'agira de compléter ces mesures par des tests d'évaluation du rôle vis à vis du carbonate de calcium amorphe. Cette validation serait une avancée majeure dans la compréhension du processus de minéralisation dans son ensemble. Ce test pourra également être effectué avec des fractions protéiques extraites de la coquille. Au cours de mon doctorat, l'effet des fractions protéiques de la coquille aux mêmes stades du processus de minéralisation que ceux étudiés section 2.2 a été évalué. Cette étude préliminaire montre que l'ajout des fractions protéiques de la matrice organique ralentit la formation de cristaux de carbonate de calcium par rapport aux conditions contrôles. Ce ralentissement est d'autant plus important que les fractions sont prélevées tardivement au cours du processus de minéralisation.

Les protéines purifiées pourront également servir à la production d'anticorps. L'équipe FRPO possède une expertise dans le développement d'anticorps dirigés contre des protéines de la matrice organique de la coquille. Ces anticorps pourront aussi être produits à partir de protéines recombinantes ou de peptides issus des protéines d'intérêt. Les anticorps seront utilisés pour localiser les protéines candidates par différentes techniques immunologiques et ainsi déterminer leur répartition entre les différentes couches. Des expériences d'immunofluorescence sur des coupes de coquilles décalcifiées ou d'immunocytochimie sur des sections de coquilles minéralisées ont déjà été menées pour des protéines connues de la matrice organique (Hincke, 1995, Hincke et al, 1999, Hincke et al, 2000, Gautron et al, 2001b, Gautron et al, 2007a). Les anticorps serviront également à étudier les variations d'abondance des protéines candidates dans la coquille à différents stades du processus de minéralisation. Ces approches permettront d'identifier des candidats pouvant intervenir dans le processus de minéralisation. Les méthodes employées pourront être le dosage quantitatif ELISA par compétition (développé pour certaines protéines de la matrice organique de la coquille (Panheleux et al, 2000)) ou le Western Blotting semi-quantitatif (utilisé pour certains constituants majeurs de la matrice organique (Hincke et al, 1999, Hincke et al, 2000, Gautron et al, 2001b, Mann et al, 2003, Gautron et al, 2007a)). Ces méthodes demandent cependant une extraction la plus complète et la plus reproductible possible des protéines de la matrice organique pour être fiables. De plus, les dosages ELISA déjà réalisés par mon équipe d'accueil ont nécessité une dilution importante des protéines de la matrice organique testées, ce qui peut conduire à une perte de précision de la méthode. Ces résultats compléteront ceux obtenus par protéomique pour les protéines d'intérêt, les stades étudiés pouvant être plus nombreux. L'abondance des protéines pourra également être étudiée dans différentes conditions physiologiques afin de mettre en évidence les facteurs conduisant à sa variation. L'abondance sera comparée dans des situations où la qualité de coquille diffère (coquilles fragiles contre coquilles solides). Différents modèles peuvent être développés. Les poules pourront être de la même lignée mais la qualité de la coquille variera en fonction de l'âge

(modèle développé par Panhéleux et collaborateurs (Panheleux *et al*, 2000)), suite à la mue (modèle développé par Ahmed et collaborateurs (Ahmed *et al*, 2005)) ou suite à une sélection sur critères mécaniques (modèle développé par Sun et collaborateurs (Sun *et al*, 2013)). Les poules pourront aussi être de deux lignées différentes et connues pour leur différence de qualité de coquille. La comparaison pourra également être faite en présence et en absence de minéralisation suite à l'expulsion de l'œuf avant la calcification de la coquille (modèle développé par Brionne et collaborateurs (Brionne *et al*, 2014)).

Les variations d'abondance des protéines candidates seront aussi évaluées de façon indirecte en étudiant l'expression des transcrits correspondant par RT-PCR quantitative. De même que précédemment, l'expression des transcrits sera analysée à différents stades du processus de minéralisation. Les résultats permettront de confirmer ceux des analyses à haut débit et seront complémentaires pour les protéines d'intérêt. L'expression des transcrits sera également analysée dans différentes conditions physiologiques selon les modèles détaillés cidessus. Brionne et collaborateurs (Brionne *et al*, 2014) ont déjà réalisé des expériences de RT-PCR quantitative sur certains des transcrits qu'ils avaient mis en évidence comme étant différentiellement exprimés lors de la calcification de la coquille afin de confirmer leurs résultats obtenus par microarray mais les transcrits ont été choisis aléatoirement et ne correspondent pas à nos candidats.

La variation d'abondance des protéines n'est cependant pas la seule cause possible d'un changement de la qualité de coquille. Un polymorphisme au niveau de la séquence génique d'une protéine peut de même conduire à ce changement sans variation de la quantité de protéine dans la matrice organique. Il peut avoir pour conséquence une mutation faux-sens (qui peut conduire à une modification de la structure de la protéine et à sa non-fonctionnalité) ou une mutation non-sens (qui aboutit à une protéine tronquée non-fonctionnelle). Comme cela a déjà été réalisé pour certaine protéines de la matrice organique, des SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) dans les gènes des protéines candidates à étudier seront localisés. Parallèlement, différents paramètres phénotypiques de la qualité de la coquille seront mesurés comme la résistance à la rupture ou l'épaisseur de ses différentes couches. Nous déterminerons ensuite s'il existe une corrélation entre les SNP et les traits phénotypiques de la coquille. Des études antérieures ont ainsi montré une influence de l'ovalbumine sur l'épaisseur de la coquille, sa résistance à la rupture et la taille des cristaux, de l'ovotransferrine sur la taille des cristaux, de l'ostéopontine sur la dureté de la coquille (ou fracture toughness exprimée en N/mm^{3/2} et calculée selon la formule développée par M. Bain (Bain, 1990)), de l'ovocléidine-116 sur la forme de l'œuf, l'épaisseur de la coquille et l'orientation des cristaux et l'ovocalyxine-32 sur l'épaisseur de la couche mamillaire et sur l'orientation des cristaux (Dunn *et al*, 2009a, Dunn *et al*, 2012). Nous pourrons également envisager de localiser des QTL influençant différents caractères phénotypiques de coquille, comme cela a pu être fait lors d'une étude précédente (Takahashi *et al*, 2009). Des QTLs influençant la masse ou l'épaisseur de la coquille ont ainsi été localisés sur le chromosome 9 chez la poule. A terme, cette approche génétique permettra de cibler encore plus précisément les candidats protéiques impliqués dans la minéralisation.

A la suite de ces travaux, il s'agira de confirmer la fonction des protéines candidates dans le processus de minéralisation. Pour ce faire, comme cela a été développé chez les mollusques (Fang *et al*, 2011), nous pourrons imaginer inhiber *in vivo* l'expression d'un gène candidat et mesurer les effets de cette inhibition sur la minéralisation de la coquille. Dans ce cadre, la lipofection semble être la meilleure stratégie comme cela a pu être utilisé chez la souris (Wadehra *et al*, 2006). Cette méthode consiste à synthétiser des shRNA ou des siRNA en s'appuyant sur le génome de la poule. Des liposomes seraient ajoutés à ces derniers. Le mélange ainsi obtenu serait injecté dans la lumière utérine à l'aide d'un cathéter ensuite enlevé. Pour réaliser la pose du cathéter, une injection de prostaglandines provoquerait l'expulsion de l'œuf déjà en cours de formation. Dans un même temps, l'éversion du cloaque faciliterait l'accès à l'orifice vaginal par lequel serait introduit le cathéter. Le temps d'action des liposomes et des shRNA ou siRNA devra préalablement être évalué.

Une fois l'implication des protéines confirmée, nous établirons la structure 3D de la protéine. Celle-ci pourra être analysée par modélisation informatique par partir de la séquence ou par cristallisation de la protéine. Cette structure servira à une étude de la relation structure-fonction de la protéine. Nous pourrons imaginer modéliser la liaison de la protéine au cristal et visualiser les effets d'une mutation de la protéine sur sa structure et sur cette liaison.

Toutes les perspectives présentées ci-dessus portent sur la poule. Une suite envisagée est de réaliser les mêmes expériences chez une autre espèce aviaire, la pintade. La coquille de pintade est en effet une exception parmi les coquilles d'oiseaux. Elle présente des caractéristiques mécaniques supérieures aux autres coquilles comparativement à sa masse. Ces propriétés seraient dues à une réorientation des cristaux de calcite composant la coquille aux 2/3 de la couche palissadique. L'étude de cette coquille permettrait donc de comprendre les mécanismes de cette réorientation qui peut être considérée comme une nucléation secondaire et de les comparer aux mécanismes de la nucléation primaire au niveau des noyaux mamillaires.

VI-Conclusion
Au travers de ces recherches, je me suis intéressée à la biominéralisation de la coquille d'œuf de poule et plus particulièrement à la composition de la matrice organique et à ses variations au cours du processus de calcification. La matrice organique, qui ne représente que 3,5% de la coquille, joue pourtant un rôle fondamental dans la bonne formation de cette dernière par ses interactions avec les cristaux de carbonate de calcium. Connaître les protéines qui la composent et leur rôle dans la calcification permet de mieux appréhender le processus complexe qu'est la biominéralisation.

Au cours de mon doctorat, j'ai eu pour objectif principal d'identifier, de quantifier et d'étudier la fonction des protéines de la matrice organique au cours des différents stades du processus de biominéralisation. Dans un premier temps, j'ai participé à la description des évènements minéralogiques se déroulant lors de l'initiation et de la phase de croissance active de la minéralisation. En collaboration avec le docteur Alejandro Rodriguez-Navarro (université de Grenade), un scénario de ces différents évènements a pu être établi. Nous avons également mis en évidence pour la première fois la présence d'une phase transitoire amorphe de carbonate de calcium. Dans un second temps, nous avons cherché à identifier les composants de la matrice organique intervenant dans ces différents évènements. En collaboration avec le laboratoire de spectrométrie de masse de la PAIB2, j'ai réalisé deux analyses protéomiques quantitatives. La première a porté sur l'ensemble de la biominéralisation, les trois étapes principales étant représentées ; la seconde s'est focalisée plus particulièrement sur la phase initiale de la minéralisation. Les résultats obtenus ont mis en évidence des composants intervenant dans le processus de minéralisation à chacune des étapes étudiées. De nouveaux candidats ont pu également être identifiés, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives de recherches. Ils seront à étudier dans un avenir proche et leur rôle dans la minéralisation restera à confirmer.

Nos recherches représentent une des toutes premières études à haut débit analysant la variation de l'abondance des composants de la matrice organique de la coquille d'œuf de poule lors de la cinétique de biominéralisation. Elles complètent les recherches antérieures qui avaient permis l'identification de près de 700 protéines et de plus de 600 transcrits utérins surexprimés par l'utérus. Elles ont également permis d'approfondir les connaissances que nous avions sur le processus de biominéralisation en tant que tel et plus particulièrement sur les premiers évènements.

Les résultats de ces recherches seront utiles pour la filière avicole. La qualité sanitaire des œufs de consommation est en effet un enjeu primordial pour celle-ci. L'identification de

marqueurs biologiques de la solidité de la coquille ouvre des perspectives en termes de sélection assistée par marqueurs pour assurer une meilleure protection du contenu de l'œuf. La coquille d'œuf est une biocéramique fabriquée à basse température et à basse pression. Aussi les connaissances engendrées dans cette thèse seront utiles à la connaissance des processus d'élaboration des biomatériaux.

Ce projet s'intègre dans la thématique de l'équipe « Fonction et Régulation de Protéines de l'Oeuf » au sein de laquelle j'ai été accueillie durant mes trois années de doctorat. Ses objectifs premiers sont de comprendre les systèmes de défenses naturelles de l'œuf en caractérisant de façon exhaustive ses différents composants et leurs variations afin d'améliorer ces systèmes. Ses objectifs participent à la stratégie globale de l'Unité de Recherches Avicoles qui s'intéresse à la physiologie et à la génétique des espèces aviaires, du niveau moléculaire aux interactions entre l'animal et son environnement. Différents aspects sont abordés : la nutrition et le métabolisme des animaux, la qualité des produits de la filière avicole (œufs et viande), la sélection et l'élaboration de systèmes d'élevages innovants. Ce travail fait également partie intégrante du projet ANR IMPACT qui vise à caractériser les protéines de la matrice organique des coquilles d'œufs de poule et de pintade intervenant dans le processus de calcification par des approches à haut débit protéomiques et transcriptomiques.

D'un point de vue personnel, ces trois années restent une expérience très enrichissante. J'ai non seulement été intégrée au sein d'une équipe de recherches mais j'ai également eu la possibilité de collaborer avec des personnes extérieures qui m'ont aidée à réaliser ce travail, tant pour les analyses protéomiques (plateforme PAIB2 de l'INRA de Tours), que pour les mesures *in situ* sur la coquille (Docteur Rodriguez-Navarro à Grenade). Cette dernière collaboration a fait l'objet d'un séjour de 3 semaines dans ce laboratoire et constitue pour moi un enrichissement autant personnel que professionnel. Ces personnes m'ont fait partager leurs compétences et m'ont formée à des techniques très différentes. J'ai ainsi pu approfondir et développer toutes les connaissances en spectrométrie de masse et en microscopie acquises pendant mes deux années de Master de Biologie Biochimie et les appliquer de façon concrète. Enfin, ce travail m'a permis de découvrir un monde qui m'était jusque-là inconnu, celui de la filière avicole. J'ai acquis des connaissances sur la physiologie de la poule, plus particulièrement sur sa reproduction et le processus de biominéralisation de la coquille d'œuf, et sur les différents modes d'élevage.

VII-Liste des travaux associés

Articles scientifiques dans des revues à comité de lecture

• **Pauline Marie**, Valérie Labas, Aurélien Brionne, Grégoire Harichaux, Christelle Hennequet-Antier, Yves Nys, Joël Gautron (2015), *Quantitative proteomics and bioinformatic analysis provide new insight into protein function during avian eggshell biomineralization*, Journal of Proteomics, 113 (178-193)

• **Pauline Marie**, Valérie Labas, Aurélien Brionne, Grégoire Harichaux, Christelle Hennequet-Antier, Yves Nys, Joël Gautron (2014), *Data set for the proteomic inventory and quantitative analysis of chicken uterine fluid during eggshell biomineralization*, Data in Brief, 1 (65-69)

• Alejandro B. Rodríguez-Navarro, **Pauline Marie**, Yves Nys, Maxwell T. Hincke, Joel Gautron (2015), *Amorphous calcium carbonate controls avian eggshell mineralization: a new paradigm for understanding rapid eggshell calcification*, Journal of Structural Biology, 190 (291-303)

• **Pauline Marie**, Valérie Labas, Aurélien Brionne, Grégoire Harichaux, Christelle Hennequet-Antier, Alejandro B. Rodriguez-Navarro, Yves Nys, Joël Gautron (2015), *Quantitative proteomics provides new insights into chicken eggshell matrix protein functions during the primary events of mineralisation and the active calcification phase*, Journal of Proteomics, 126 (140-154)

• **Pauline Marie**, Valérie Labas, Aurélien Brionne, Grégoire Harichaux, Christelle Hennequet-Antier, Alejandro B. Rodriguez-Navarro, Yves Nys, Joël Gautron (2015), *Data set for the proteomic inventory and quantitative analysis of chicken eggshell matrix proteins during the primary events of eggshell mineralization and the active growth phase ofcalcification*, Data in Brief, 4 (430-436)

Communications à des congrès scientifiques

(la personne ayant réalisé la communication est indiquée en gras)

Colloques internationaux :

• P. Marie, V. Labas, G. Harichaux, A. Brionne, Y. Nys and J. Gautron, *Characterization and quantification of proteins secreted by uterus during initiation, growth and arrest of eggshell biomineralisation*, 12th International Symposium on Biomineralization, Freiberg (Germany), 27-30/08/2013 (Présentation orale sur la première partie des travaux)

• P. Marie, V. Labas, G. Harichaux, A. Brionne, Y. Nys and **J. Gautron**, *Quantification and characterization of proteins secreted by uterus during initiation, growth and arrest of eggshell biomineralisation*, XVth European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products, Bergame (Italy), 15-19/09/2013 (Présentation orale sur la première partie des travaux et rédaction d'un article)

• P. Marie, A. Rodriguez-Navarro, V. Labas, G. Harichaux, A. Brionne, Y. Nys and J. Gautron, *Eggshell mineralisation: relationship between in situ observations and organic matrix composition*, XIVth European Poultry Conference, Stavanger (Norway), 23-26/06/2014 (Présentation affichée sur la seconde partie des travaux)

Colloques nationaux :

• P. Marie, V. Labas, G. Harichaux, A. Brionne, Y. Nys and J. Gautron, *Utilization of label free spectral counting to quantify the proteins involved in the various phases of chicken eggshell mineralisation*, 29^{èmes} Journées Françaises de Spectrométrie de Masse, Orléans (France), 17-20/09/2012 (Présentation affichée sur la première partie des travaux)

P. Marie, V. Labas, G. Harichaux, A. Brionne, Y. Nys et J. Gautron, Utilisation de la méthode label free spectral counting pour quantifier les protéines impliquées dans les différentes phases de minéralisation de la coquille d'œuf de poule, 29^{ème} Congrès de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyses Protéomiques, Rouen (France), 15-17/10/2012 (Présentation affichée sur la première partie des travaux)

• P. Marie, V. Labas, G. Harichaux, A. Brionne, Y. Nys et J. Gautron, *Quantification et caractérisation des protéines sécrétées par l'utérus lors de l'initiation, la croissance et l'arrêt*

de la minéralisation de la coquille d'œuf de poule, 10^{èmes} Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, La Rochelle (France), 26-28/03/2013 (Présentation affichée sur la première partie des travaux, courte présentation orale du poster et rédaction d'un article)

P. Marie, V. Labas, G. Harichaux, A. Brionne, Y. Nys et J. Gautron, *Quantification et caractérisation des protéines sécrétées par l'utérus lors de l'initiation, de la croissance et de l'arrêt de la minéralisation de la coquille d'œuf de poule*, 15^{èmes} Journées Françaises de la Biologie des Tissus Minéralisés, Poitiers (France), 30-31/05/2013 (Présentation orale sur la première partie des travaux)

• P. Marie, V. Labas, G. Harichaux, A. Brionne, Y. Nys et J. Gautron, *Quantification et caractérisation des protéines intervenant dans la minéralisation de la coquille d'œuf de poule*, 26^{ème} colloque BioTechnoCentre, Seillac (France), 10-11/10/2013 (Présentation affichée sur la première partie des travaux)

• P. Marie, A.Rodriguez-Navarro, V. Labas, G. Harichaux, A. Brionne, Y. Nys et J. Gautron, *Minéralisation de la coquille d'oeuf de poule : Relation entre observation in situ et composition de la matrice organique*, 16^{èmes} Journées Françaises de la Biologie des Tissus Minéralisés, Limoges (France), 14-16/05/2014 (Présentation orale sur la deuxième partie des travaux)

Type de contrat	Dates	Intitulé	Montant	Implication
ANR	2013-2017	IMPACT : Identification of Matrix Proteins Affecting Calcite Texture in chicken and guinea fowl eggshells	290155€	Participation aux tâches 1,3 et 4

Participation à des programmes de recherche

Bourses et subventions obtenues

- Subvention de l'Université de Tours pour un stage de 3 semaines dans le laboratoire du docteur Alejandro Rodriguez-Navarro
- Bourse de la Branche Européenne de la WPSA (World Poultry Science Association) pour assister à la XIVth European Poultry Conference (programme Jeunes)

<u>VIII-Références</u> bibliographiques

Abatangelo, G., D. Dagagordini, I. Castellani and R. Cortivo, 1978, Some observations on the calcium-ion binding to the eggshell matrix, Calcified Tissue Research, 26, (3): 247-252.

Addadi, L., D. Joester, F. Nudelman and S. Weiner, 2006, *Mollusk shell formation: A source of new concepts for understanding biomineralization processes*, Chemistry-A European Journal, 12, (4): 981-987.

Addadi, L., S. Raz and S. Weiner, 2003, *Taking advantage of disorder: amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralization*, Advanced Materials, 15, (12): 959-970.

Addadi, L. and S. Weiner, 1992, *Control and design principles in biological mineralization*, Angewandte Chemie-International Edition in English, 31, (2): 153-169.

Ahmed, A. M. H., A. B. Rodriguez-Navarro, M. L. Vidal, J. Gautron, J. M. Garcia-Ruiz and Y. Nys, 2005, *Changes in eggshell mechanical properties, crystallographic texture and in matrix proteins induced by moult in hens*, British Poultry Science, 46, (3): 268-279.

Akagawa, M., Y. Wako and K. Suyama, 1999, *Lysyl oxidase coupled with catalase in egg shell membrane*, Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1434, (1): 151-160.

Allemand, D., E. Tambutte, D. Zoccola and S. Tambutte, 2011, Coral calcification, cells to reefs, *Coral Reefs: An Ecosystem in Transition*, Z. Dubinsky and N. Stambler: 119-150.

Anton, M., F. Nau, V. Lechevalier, C. Guerin-Dubiard and T. Croguennec, 2010, Egg products: functional ingredients for complex matrices Les ovoproduits: des ingredients fonctionnels pour des matrices complexes, INRA Productions Animales, 23, (2): 215-224.

Arias, J. L., D. A. Carrino, M. S. Fernandez, J. P. Rodriguez, J. E. Dennis and A. I. Caplan, 1992, *Partial biochemical and immunochemical characterization of avian eggshell extracellular matrices*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 298, (1): 293-302.

Arias, J. L. and M. S. Fernandez, 2001, *Role of extracellular matrix molecules in shell formation and structure*, Worlds Poultry Science Journal, 57, (4): 349-357.

Arias, J. L., M. S. Fernandez and A. I. Caplan, 1991, *Research note - absence from avian eggshell membranes of epitopes recognized by antikeratin antibodies*, Poultry Science, 70, (7): 1647-1650.

Arias, J. L., D. J. Fink, S. Q. Xiao, A. H. Heuer and A. I. Caplan, 1993, *Biomineralization and eggshells - cell-mediated acellular compartments of mineralized extracellular-matrix*, International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 145, 145: 217-250.

Arias, J. L., O. Nakamura, M. S. Fernandez, J. J. Wu, P. Knigge, D. R. Eyre and A. I. Caplan, 1997, *Role of type X collagen on experimental mineralization of eggshell membranes*, Connective Tissue Research, 36, (1): 21-33.

Bain, M, 1990, Eggshell strenght : a mecanical/ultrastructural evaluation, University of Glasgow.

Banfield, J. F., S. A. Welch, H. Z. Zhang, T. T. Ebert and R. L. Penn, 2000, Aggregationbased crystal growth and microstructure development in natural iron oxyhydroxide biomineralization products, Science, 289, (5480): 751-754.

Bedouet, L., D. Duplat, A. Marie, L. Dubost, S. Berland, M. Rousseau, C. Milet and E. Lopez, 2007a, *Heterogeneity of proteinase inhibitors in the water-soluble organic matrix from the oyster nacre*, Marine Biotechnology, 9, (4): 437-449.

Bedouet, L., A. Marie, L. Dubost, J. Peduzzi, D. Duplat, S. Berland, M. Puissegur, H. Boulzaguet, M. Rousseau, C. Milet and E. Lopez, 2007b, *Proteomics analysis of the nacre soluble and insoluble proteins from the oyster Pinctada margaritifera*, Marine Biotechnology, 9, (5): 638-649.

Beniash, E., J. Aizenberg, L. Addadi and S. Weiner, 1997, *Amorphous calcium carbonate transforms into calcite during sea urchin larval spicule growth*, Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, 264, (1380): 461-465.

Blank, S., M. Arnoldi, S. Khoshnavaz, L. Treccani, M. Kuntz, K. Mann, G. Grathwohl and M. Fritz, 2003, *The nacre protein perlucin nucleates growth of calcium carbonate crystals*, Journal of Microscopy-Oxford, 212: 280-291.

Bourin, M., J. Gautron, M. Berges, S. Attucci, G. Le Blay, V. Labas, Y. Nys and S. Rehault-Godbert, 2011, *Antimicrobial Potential of Egg Yolk Ovoinhibitor, a Multidomain Kazal-like Inhibitor of Chicken Egg*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, (23): 12368-12374.

Brionne, A., Y. Nys, C. Hennequet-Antier and J. Gautron, 2014, *Hen uterine gene* expression profiling during eggshell formation reveals putative proteins involved in the supply of minerals or in the shell mineralization process, BMC Genomics, 15.

Burley, R. W. and D. V. Vadehra, 1989, *The Avian Egg - Chemistry and Biology*. New York, John Wiley and Sons.

Callewaert, L. and C. W. Michiels, 2010, *Lysozymes in the animal kingdom*, Journal of Biosciences, 35, (1): 127-160.

Campbell, I. D. and P. Bork, 1993, *Epidermal growth factor-like modules*, Current Opinion in Structural Biology, 3, (3): 385-392.

Carrino, D. A., J. E. Dennis, T. M. Wu, J. L. Arias, M. S. Fernandez, J. P. Rodriguez, D. J. Fink, A. H. Heuer and A. I. Caplan, 1996, *The avian eggshell extracellular matrix as a model for biomineralization*, Connective Tissue Research, 35, (1-4): 325-328.

Carrino, D. A., J. P. Rodriguez and A. I. Caplan, 1997, *Dermatan sulfate proteoglycans from the mineralized matrix of the avian eggshell*, Connective Tissue Research, 36, (3): 175-193.

Cartwright, J. H. E., A. G. Checa, J. D. Gale, D. Gebauer and C. I. Sainz-Diaz, 2012, *Calcium Carbonate Polyamorphism and Its Role in Biomineralization: How Many Amorphous Calcium Carbonates Are There?*, Angewandte Chemie-International Edition, 51, (48): 11960-11970.

Chien, Y. C., M. T. Hincke, H. Vali and M. D. McKee, 2008, Ultrastructural matrixmineral relationships in avian eggshell, and effects of osteopontin on calcite growth in vitro, Journal of Structural Biology, 163, (1): 84-99.

Chowdhury, S. D., 1990, *Shell membrane-protein system in relation to lathyrogen toxicity and copper deficiency*, Worlds Poultry Science Journal, 46, (2): 153-169.

Chumnarnsilpa, S., A. Loonchanta, B. Xue, H. Choe, D. Urosev, H. Wang, U. Lindberg, L. D. Burtnick and R. C. Robinson, 2006, *Calcium ion exchange in crystalline gelsolin*, Journal of Molecular Biology, 357, (3): 773-782.

Cordeiro, C. M. M., H. Esmaili, G. Ansah and M. T. Hincke, 2013, *Ovocalyxin-36 Is a Pattern Recognition Protein in Chicken Eggshell Membranes*, Plos One, 8, (12).

D'Ambrosio, C., S. Arena, A. Scaloni, L. Guerrier, E. Boschetti, M. E. Mendieta, A. Citterio and P. G. Righetti, 2008, *Exploring the chicken egg white proteome with combinatorial peptide ligand libraries*, Journal of Proteome Research, 7, (8): 3461-3474.

Dellett, M., W. Hu, V. Papadaki and S.-i. Ohnuma, 2012, *Small leucine rich proteoglycan family regulates multiple signalling pathways in neural development and maintenance*, Development Growth & Differentiation, 54, (3): 327-340.

Dennis, J. E., S. Q. Xiao, M. Agarwal, D. J. Fink, A. H. Heuer and A. I. Caplan, 1996, *Microstructure of matrix and mineral components of eggshells from white leghorn chickens (Gallus gallus)*, Journal of Morphology, 228, (3): 287-306.

Dominguez-Vera, J. M., J. Gautron, J. M. Garcia-Ruiz and Y. Nys, 2000, *The effect of avian uterine fluid on the growth behavior of calcite crystals*, Poultry Science, 79, (6): 901-907.

Drake, J. L., T. Mass, L. Haramaty, E. Zelzion, D. Bhattacharya and P. G. Falkowski, 2013, *Proteomic analysis of skeletal organic matrix from the stony coral Stylophora pistillata*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110, (10): 3788-3793.

Dunn, I. C., N. T. Joseph, M. Bain, A. Edmond, P. W. Wilson, P. Milona, Y. Nys, J. Gautron, M. Schmutz, R. Preisinger and D. Waddington, 2009a, *Polymorphisms in*

eggshell organic matrix genes are associated with eggshell quality measurements in pedigree *Rhode Island Red hens*, Animal Genetics, 40, (1): 110-114.

Dunn, I. C., A. B. Rodriguez-Navarro, K. McDade, M. Schmutz, R. Preisinger, D. Waddington, P. W. Wilson and M. M. Bain, 2012, *Genetic variation in eggshell crystal size and orientation is large and these traits are correlated with shell thickness and are associated with eggshell matrix protein markers*, Animal Genetics, 43, (4): 410-418.

Dunn, I. C., P. W. Wilson, Z. Lu, M. M. Bain, C. L. Crossan, R. T. Talbot and D. Waddington, 2009b, *New hypotheses on the function of the avian shell gland derived from microarray analysis comparing tissue from juvenile and sexually mature hens*, General and Comparative Endocrinology, 163, (1-2): 225-232.

Duplat, D., M. Puissegur, L. Bedouet, A. Rousseau, H. Boulzaguet, C. Milet, D. Sellos, A. Van Wormhoudt and E. Lopez, 2006, *Identification of calconectin, a calcium-binding protein specifically expressed by the mantle of Pinctada margaritifera*, Febs Letters, 580, (10): 2435-2441.

EFSA, 2014, *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012*, EFSA Journal, 12, (2).

Endo, H., P. Persson and T. Watanabe, 2000, *Molecular cloning of the crustacean DD4 cDNA encoding a Ca2+-binding protein*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 276, (1): 286-291.

Fang, D., G. R. Xu, Y. L. Hu, C. Pan, L. P. Xie and R. Q. Zhang, 2011, Identification of Genes Directly Involved in Shell Formation and Their Functions in Pearl Oyster, Pinctada fucata, Plos One, 6, (7).

Farinazzo, A., U. Restuccia, A. Bachi, L. Guerrier, F. Fortis, E. Boschetti, E. Rasoli, A. Citterio and P. G. Righetti, 2009, *Chicken egg yolk cytoplasmic proteome, mined via combinatorial peptide ligand libraries*, Journal of Chromatography A, 1216, (8): 1241-1252.

Fernandez, M. S., M. Araya and J. L. Arias, 1997, *Eggshells are shaped by a precise spatio-temporal arrangement of sequentially deposited macromolecules*, Matrix Biology, 16, (1): 13-20.

Fernandez, M. S., C. Escobar, I. Lavelin, M. Pines and J. L. Arias, 2003, *Localization of osteopontin in oviduct tissue and eggshell during different stages of the avian egg laying cycle*, Journal of Structural Biology, 143, (3): 171-180.

Fernandez, M. S., A. Moya, L. Lopez and J. L. Arias, 2001, Secretion pattern, ultrastructural localization and function of extracellular matrix molecules involved in eggshell formation, Matrix Biology, 19, (8): 793-803.

Filmus, J., M. Capurro and J. Rast, 2008, *Glypicans*, Genome Biology, 9, (5).

Fischer, G. and H. Bang, 1985, *The refolding of urea-denatured ribonuclease-a is catalyzed by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*, Biochimica Et Biophysica Acta, 828, (1): 39-42.

Fischer, G., B. Wittmannliebold, K. Lang, T. Kiefhaber and F. X. Schmid, 1989, *Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins*, Nature, 337, (6206): 476-478.

Freeman, C. L., J. H. Harding, D. Quigley and P. M. Rodger, 2010, *Structural control of crystal nuclei by an eggshell protein*, Angewandte Chemie-International Edition, 49, (30): 5135-5137.

Freeman, C. L., J. H. Harding, D. Quigley and P. M. Rodger, 2011, *Simulations of ovocleidin-17 binding to calcite surfaces and its implications for eggshell formation*, Journal of Physical Chemistry C, 115, (16): 8175-8183.

Gautron, J., M. T. Hincke, K. Mann, M. Panheleux, M. Bain, M. D. McKee, S. E. Solomon and Y. Nys, 2001a, *Ovocalyxin-32, a novel chicken eggshell matrix protein - Isolation, amino acid sequencing, cloning, and immunocytochemical localization*, Journal of Biological Chemistry, 276, (42): 39243-39252.

Gautron, J., M. T. Hincke and Y. Nys, 1997, *Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens*, Connective Tissue Research, 36, (3): 195-210.

Gautron, J., M. T. Hincke, M. Panheleux, J. M. Garcia-Ruiz, T. Boldicke and Y. Nys, 2001b, *Ovotransferrin is a matrix protein of the hen eggshell membranes and basal calcified layer*, Connective Tissue Research, 42, (4): 255-267.

Gautron, J., E. Murayama, A. Vignal, M. Morisson, M. D. McKee, S. Rehault, V. Labas, M. Belghazi, M.-L. Vidal, Y. Nys and M. T. Hincke, 2007a, *Cloning of ovocalyxin-36, a novel chicken eggshell protein related to lipopolysaccharide-binding proteins, bactericidal permeability-increasing proteins, and plunc family proteins*, Journal of Biological Chemistry, 282, (8): 5273-5286.

Gautron, J., F. Nau, K. Mann, C. Guerin-Dubiard, S. Rehault, M. T. Hincke and Y. Nys, 2007b, *Molecular approaches for the identification of novel egg components*, Worlds Poultry Science Journal, 63, (1): 82-90.

Gautron, J. and Y. Nys,2007a, Eggshell matrix proteins, *Bioactive egg compounds.*, R. Huopalahti, R. Lopez-Fandino, M. Anton and R. Schade: 103-108.

Gautron, J. and Y. Nys,2007b, Function of eggshell matrix proteins, *Bioactive egg compounds*, R. Huopalahti, R. Lopez-Fandino, M. Anton and R. Schade. (Germany), Springer-Verlag: 109-115.

Gautron, J., M. Pain, S. Solomon and Y. Nys, 1996, Soluble matrix of hen's eggshell extracts changes in vitro the rate of calcium carbonate precipitation and crystal morphology, British Poultry Science, 37, (4): 853-866.

Gautron, J., S. Rehault-Godbert, V. Jonchere, V. Herve-Grepinet, K. Mann and Y. Nys, 2010, *High-throughput technology (proteomics and transcriptomics) to identify and functionally characterise new egg proteins*, INRA Productions Animales, 23, (2): 133-141.

Gautron, J., S. Rehault-Godbert, Y. Nys, K. Mann and P. G. Righetti, 2011a, Use of high-throughput technology to identify new egg components.

Gautron, J., S. Rehault-Godbert, G. Pascal, Y. Nys and M. T. Hincke, 2011b, *Ovocalyxin-36 and other LBP/BPI/PLUNC-like proteins as molecular actors of the mechanisms of the avian egg natural defences*, Biochemical Society Transactions, 39: 971-976.

Gifford, J. L., M. P. Walsh and H. J. Vogel, 2007, *Structures and metal-ion-binding properties of the Ca*²⁺-*binding helix-loop-helix EF-hand motifs*, Biochemical Journal, 405: 199-221.

Gong, N. P., J. L. Shangguan, X. J. Liu, Z. G. Yan, Z. J. Ma, L. P. Xie and R. Q. Zhang, 2008, *Immunolocalization of matrix proteins in nacre lamellae and their in vivo effects on aragonitic tablet growth*, Journal of Structural Biology, 164, (1): 33-40.

Gong, Y. U. T., C. E. Killian, I. C. Olson, N. P. Appathurai, A. L. Amasino, M. C. Martin, L. J. Holt, F. H. Wilt and P. Gilbert, 2012, *Phase transitions in biogenic amorphous calcium carbonate*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109, (16): 6088-6093.

Gotliv, B. A., N. Kessler, J. L. Sumerel, D. E. Morse, N. Tuross, L. Addadi and S. Weiner, 2005, *Asprich: A novel aspartic acid-rich protein family from the prismatic shell matrix of the bivalve Atrina rigida*, Chembiochem, 6, (2): 304-314.

Guerin-Dubiard, C., M. Anton, J. Gautron, Y. Nys and F. Nau,2010, Composition de l'oeuf, *Science et technologie de l'oeuf Volume II De l'oeuf aux ovoproduits*, F. Nau, C. Guerin-Dubiard, F. Baron and J.-L. Thapon: 1-176.

Guerin-Dubiard, C., M. Pasco, D. Molle, C. Desert, T. Croguennec and F. Nau, 2006, *Proteomic analysis of hen egg white*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, (11): 3901-3910.

Hall, A., K. Hakansson, R. W. Mason, A. Grubb and M. Abrahamson, 1995, Structural basis for the biological specificity of cystatin-c - identification of leucine-9 in the n-terminal binding region as a selectivity-conferring residue in the inhibition of mammalian cysteine peptidases, Journal of Biological Chemistry, 270, (10): 5115-5121.

Harris, E. D., J. E. Blount and R. M. Leach, 1980, *Localization of lysyl oxidase in hen oviduct - implications in eggshell membrane formation and composition*, Science, 208, (4439): 55-56.

Hasegawa, Y. and K. Uchiyama, 2005, *cDNA clonings of shell matrix proteins from scallop shell*, Fisheries Science, 71, (5): 1174-1178.

Hattan, S. J., T. M. Laue and N. D. Chasteen, 2001, *Purification and characterization of a novel calcium-binding protein from the extrapallial fluid of the mollusc, Mytilus edulis*, Journal of Biological Chemistry, 276, (6): 4461-4468.

Heizmann, C. W., G. Fritz and B. W. Schafer, 2002, *S100 proteins: Structure, functions and pathology*, Frontiers in Bioscience, 7: D1356-D1368.

Hermann, A., R. Donato, T. M. Weiger and W. J. Chazin, 2012, *S100 calcium binding proteins and ion channels*, Frontiers in Pharmacology, 3.

Hernandez-Hernandez, A., J. Gomez-Morales, A. B. Rodriguez-Navarro, J. Gautron, Y. Nys and J. M. Garcia-Ruiz, 2008a, *Identification of some active proteins in the process of hen eggshell formation*, Crystal Growth & Design, 8, (12): 4330-4339.

Hernandez-Hernandez, A., M. L. Vidal, J. Gomez-Morales, A. B. Rodriguez-Navarro, V. Labas, J. Gautron, Y. Nys and J. M. G. Ruiz, 2008b, *Influence of eggshell matrix proteins* on the precipitation of calcium carbonate (CaCO3), Journal of Crystal Growth, 310, (7-9): 1754-1759.

Hincke, M., J. Gautron, Y. Nys, A. B. Rodriguez-Navarro and M. D. McKee, 2011, *The* eggshell: structure and protective function.

Hincke, M. T., 1995, *Ovalbumin is a component of the chicken eggshell matrix*, Connective Tissue Research, 31, (3): 227-233.

Hincke, M. T., A. M. Bernard, E. R. Lee, C. P. W. Tsang and R. Narbaitz, 1992, Solubleprotein constituents of the domestic-fowls eggshell, British Poultry Science, 33, (3): 505-516.

Hincke, M. T., Y. C. Chien, L. C. Gerstenfeld and M. D. McKee, 2008, *Colloidal-gold immunocytochemical localization of osteopontin in avian eggshell gland and eggshell*, Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 56, (5): 467-476.

Hincke, M. T., J. Gautron, M. Panheleux, J. Garcia-Ruiz, M. D. McKee and Y. Nys, 2000, *Identification and localization of lysozyme as a component of eggshell membranes and eggshell matrix*, Matrix Biology, 19, (5): 443-453.

Hincke, M. T., J. Gautron, C. P. W. Tsang, M. D. McKee and Y. Nys, 1999, *Molecular cloning and ultrastructural localization of the core protein of an eggshell matrix proteoglycan, ovocleidin-116*, Journal of Biological Chemistry, 274, (46): 32915-32923.

Hincke, M. T., Y. Nys and J. Gautron, 2010, *The Role of Matrix Proteins in Eggshell Formation*, Journal of Poultry Science, 47, (3): 208-219.

Hincke, M. T., Y. Nys, J. Gautron, K. Mann, A. B. Rodriguez-Navarro and M. D. McKee, 2012, *The eggshell: structure, composition and mineralization*, Frontiers in Bioscience-Landmark, 17: 1266-1280.

Hincke, M. T. and M. St. Maurice, 1998, Phosphorylation-dependent modulation of calcium carbonate precipitation by chicken eggshell matrix proteins, *Sixth International Conference on chemistry and biology of mineralized tissues*, Vittel, France.

Hincke, M. T., C. P. W. Tsang, M. Courtney, V. Hill and R. Narbaitz, 1995, *Purification and immunochemistry of a soluble matrix protein of the chicken eggshell (ovocleidin-17)*, Calcified Tissue International, 56, (6): 578-583.

Huang, J., C. Zhang, Z. J. Ma, L. P. Xie and R. Q. Zhang, 2007, *A novel extracellular EF-hand protein involved in the shell fonnation of pearl oyster*, Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 1770, (7): 1037-1044.

Humphreys, D. T., J. A. Carver, S. B. Easterbrook-Smith and M. R. Wilson, 1999, *Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins*, Journal of Biological Chemistry, 274, (11): 6875-6881.

Hunter, G. K., K. S. Wong and J. J. Kim, 1988, *Binding of calcium to glycosaminoglycans* - *an equilibrium dialysis study*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 260, (1): 161-167.

Inoue, H., T. Ohira, N. Ozaki and H. Nagasawa, 2003, *Cloning and expression of a cDNA encoding a matrix peptide associated with calcification in the exoskeleton of the crayfish*, Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, 136, (4): 755-765.

Inoue, H., T. Ohira, N. Ozaki and H. Nagasawa, 2004, *A novel calcium-binding peptide from the cuticle of the crayfish, Procambarus clarkii*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 318, (3): 649-654.

Jonchere, V., A. Brionne, J. Gautron and Y. Nys, 2012, *Identification of uterine ion* transporters for mineralisation precursors of the avian eggshell, BMC Physiology, 12, (10).

Jonchere, V., S. Rehault-Godbert, C. Hennequet-Antier, C. Cabau, V. Sibut, L. A. Cogburn, Y. Nys and J. Gautron, 2010, *Gene expression profiling to identify eggshell proteins involved in physical defense of the chicken egg*, BMC Genomics, 11.

Joubert, C., D. Piquemal, B. Marie, L. Manchon, F. Pierrat, I. Zanella-Cleon, N. Cochennec-Laureau, Y. Gueguen and C. Montagnani, 2010, *Transcriptome and proteome analysis of Pinctada margaritifera calcifying mantle and shell: focus on biomineralization*, Bmc Genomics, 11: 13.

Kinoshita, S., N. Wang, H. Inoue, K. Maeyama, K. Okamoto, K. Nagai, H. Kondo, I. Hirono, S. Asakawa and S. Watabe, 2011, *Deep Sequencing of ESTs from Nacreous and Prismatic Layer Producing Tissues and a Screen for Novel Shell Formation-Related Genes in the Pearl Oyster*, Plos One, 6, (6): 19.

Kodali, V. K., S. A. Gannon, P. Sivakumar, R. Sonali, T. Polenova and C. Thorpe, 2011, *A novel disulfide-rich protein motif from avian eggshell membranes*, Plos One, 6, (3).

Kong, Y. W., G. Jing, Z. G. Yan, C. Z. Li, N. P. Gong, F. J. Zhu, D. X. Li, Y. R. Zhang, G. L. Zheng, H. Z. Wang, L. P. Xie and R. Q. Zhang, 2009, *Cloning and Characterization of Prisilkin-39, a Novel Matrix Protein Serving a Dual Role in the Prismatic Layer Formation from the Oyster Pinctada fucata*, Journal of Biological Chemistry, 284, (16): 10841-10854.

Kono, M., N. Hayashi and T. Samata, 2000, *Molecular mechanism of the nacreous layer formation in Pinctada maxima*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 269, (1): 213-218.

Kraghhansen, U. and H. Vorum, 1993, *Quantitative-analyses of the interaction between calcium-ions and human serum-albumin*, Clinical Chemistry, 39, (2): 202-208.

Kubo, A., A. Yuba-Kubo, S. Tsukita and M. Amagai, 2008, Sentan: A Novel Specific Component of the Apical Structure of Vertebrate Motile Cilia, Molecular Biology of the Cell, 19, (12): 5338-5346.

Lakshminarayanan, R., J. S. Joseph, R. M. Kini and S. Valiyaveettil, 2005, Structurefunction relationship of avian eggshell matrix proteins: A comparative study of two major eggshell matrix proteins, ansocalcin and OC-17, Biomacromolecules, 6, (2): 741-751.

Lakshminarayanan, R., R. M. Kini and S. Valiyaveettil, 2002, *Investigation of the role of ansocalcin in the biomineralization in goose eggshell matrix*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, (8): 5155-5159.

Lakshminarayanan, R., S. Valiyaveettil, V. S. Rao and R. M. Kini, 2003, *Purification, characterization, and in vitro mineralization studies of a novel goose eggshell matrix protein, ansocalcin*, Journal of Biological Chemistry, 278, (5): 2928-2936.

Lavelin, I., N. Meiri, M. Einat, O. Genina and M. Pines, 2002, *Mechanical strain regulation of the chicken glypican-4 gene expression in the avian eggshell gland*, American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 283, (4): R853-R861.

Lavelin, I., N. Yarden, S. Ben-Bassat, A. Bar and M. Pines, 1998, *Regulation of osteopontin gene expression during egg shell formation in the laying hen by mechanical strain*, Matrix Biology, 17, (8-9): 615-623.

Le Roy, N., B. Marie, B. Gaume, N. Guichard, S. Delgado, I. Zanella-Cleon, M. Becchi, S. Auzoux-Bordenave, J.-Y. Sire and F. Marin, 2012, *Identification of Two Carbonic*

Anhydrases in the Mantle of the European Abalone Haliotis tuberculata (Gastropoda, Haliotidae): Phylogenetic Implications, Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution, 318B, (5): 353-367.

Leach, R. M., 1982, *Biochemistry of the organic matrix of the eggshell*, Poultry Science, 61, (10): 2040-2047.

Levi-Kalisman, Y., G. Falini, L. Addadi and S. Weiner, 2001, *Structure of the nacreous organic matrix of a bivalve mollusk shell examined in the hydrated state using Cryo-TEM*, Journal of Structural Biology, 135, (1): 8-17.

Lewit-Bentley, A. and S. Rety, 2000, *EF-hand calcium-binding proteins*, Current Opinion in Structural Biology, 10, (6): 637-643.

Li-Chan, E. and H.-O. Kim,2008, Structure and chemical composition of eggs, *Egg Bioscience and Biotechnology*, Y. Mine. Hoboken, New Jersey, John Wiley and Sons: 1-95.

Li-Chan, E. and S. Nakai, 1989, *Biochemical basis for the properties of egg white*, Critical Reviews of Poultry Biology, 2: 21-58.

Li, G.-H., Y. Mine, M. T. Hincke and Y. Nys, 2007, *Isolation and characterization of antimicrobial proteins and peptide from chicken liver*, Journal of Peptide Science, 13, (6): 368-378.

Li, S., L. P. Xie, Z. J. Ma and R. Q. Zhang, 2005, *cDNA cloning and characterization of a novel calmodulin-like protein from pearl oyster Pinctada fucata*, Febs Journal, 272, (19): 4899-4910.

Li, S., L. P. Xie, C. Zhang, Y. Zhang, M. Z. Gu and R. Q. Zhang, 2004, *Cloning and expression of a pivotal calcium metabolism regulator: calmodulin involved in shell formation from pearl oyster (Pinctada fucata)*, Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, 138, (3): 235-243.

Liu, H. L., S. F. Liu, Y. J. Ge, J. Liu, X. Y. Wang, L. P. Xie, R. Q. Zhang and Z. Wang, 2007, *Identification and characterization of a biomineralization related gene PFMG1 highly expressed in the mantle of Pinctada fucata*, Biochemistry, 46, (3): 844-851.

Liu, Z., Q. Zheng, X. Zhang and L. Lu, 2013, *Microarray Analysis of Genes Involved with Shell Strength in Layer Shell Gland at the Early Stage of Active Calcification*, Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 26, (5): 609-624.

Livingston, B. T., C. E. Killian, F. Wilt, A. Cameron, M. J. Landrum, O. Ermolaeva, V. Sapojnikov, D. R. Maglott, A. M. Buchanan and C. A. Ettensohn, 2006, *A genorne-wide analysis of biomineralization-related proteins in the sea urchin Strongylocentrotus purpuratus*, Developmental Biology, 300, (1): 335-348.

Lowenstam, H. A., 1981, Minerals formed by organisms, Science, 211, (4487): 1126-1131.

Ma, Z. J., J. Huang, J. Sun, G. N. Wang, C. Z. Li, L. P. Xie and R. Q. Zhang, 2007, *A novel extrapallial fluid protein controls the morphology of nacre lamellae in the pearl oyster, Pinctada fucata*, Journal of Biological Chemistry, 282, (32): 23253-23263.

Mann, K., 2007, The chicken egg white proteome, Proteomics, 7, (19): 3558-3568.

Mann, K., 2008, *Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane*, Proteomics, 8, (11): 2322-2332.

Mann, K., J. Gautron, Y. Nys, M. D. McKee, T. Bajari, W. J. Schneider and M. I. Hincke, 2003, *Disulfide-linked heterodimeric clusterin is a component of the chicken eggshell matrix and egg white*, Matrix Biology, 22, (5): 397-407.

Mann, K., B. Macek and J. V. Olsen, 2006, *Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer*, Proteomics, 6, (13): 3801-3810.

Mann, K. and M. Mann, 2008, *The chicken egg yolk plasma and granule proteomes*, Proteomics, 8, (1): 178-191.

Mann, K. and M. Mann, 2011, *In-depth analysis of the chicken egg white proteome using an LTQ Orbitrap Velos*, Proteome Science, 9: 6.

Mann, K. and M. Mann, 2013, *The proteome of the calcified layer organic matrix of turkey* (*Meleagris gallopavo*) eggshell, Proteome Science, 11.

Mann, K., J. V. Olsen, B. Macek, F. Gnad and M. Mann, 2007a, *Phosphoproteins of the chicken eggshell calcified layer*, Proteomics, 7, (1): 106-115.

Mann, K. and F. Siedler, 1999, *The amino acid sequence of ovocleidin 17, a major protein of the avian eggshell calcified layer*, Biochemistry and Molecular Biology International, 47, (6): 997-1007.

Mann, K. and F. Siedler, 2004, Ostrich (Struthio camelus) eggshell matrix contains two different C-type lectin-like proteins. Isolation, amino acid sequence, and posttranslational modifications, Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 1696, (1): 41-50.

Mann, K. and F. Siedler, 2006, *Amino acid sequences and phosphorylation sites of emu and rhea eggshell C-type lectin-like proteins*, Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, 143, (2): 160-170.

Mann, K., F. Siedler, L. Treccani, F. Heinemann and M. Fritz, 2007b, *Perlinhibin, a cysteine-, histidine-, and arginine-rich miniprotein from abalone (Haliotis laevigata) nacre, inhibits in vitro calcium carbonate crystallization*, Biophysical Journal, 93, (4): 1246-1254.

Mann, K., I. M. Weiss, S. Andre, H. J. Gabius and M. Fritz, 2000, *The amino-acid* sequence of the abalone (Haliotis laevigata) nacre protein perlucin - Detection of a functional

C-type lectin domain with galactose/mannose specificity, European Journal of Biochemistry, 267, (16): 5257-5264.

Mann, K., F. H. Wilt and A. J. Poustka, 2010, *Proteomic analysis of sea urchin (Strongylocentrotus purpuratus) spicule matrix*, Proteome Science, 8.

Mann, S., 1983, *Mineralization in biological-systems*, Structure and Bonding, 54: 125-174.

Marie, B., C. Joubert, A. Tayale, I. Zanella-Cleon, C. Belliard, D. Piquemal, N. Cochennec-Laureau, F. Marin, Y. Gueguen and C. Montagnani, 2012, *Different secretory repertoires control the biomineralization processes of prism and nacre deposition of the pearl oyster shell*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109, (51): 20986-20991.

Marie, B., N. Le Roy, I. Zanella-Cleon, M. Becchi and F. Marin, 2011a, *Molecular Evolution of Mollusc Shell Proteins: Insights from Proteomic Analysis of the Edible Mussel Mytilus*, Journal of Molecular Evolution, 72, (5-6): 531-546.

Marie, B., A. Marie, D. J. Jackson, L. Dubost, B. M. Degnan, C. Milet and F. Marin, 2010a, *Proteomic analysis of the organic matrix of the abalone Haliotis asinina calcified shell*, Proteome Science, 8: 11.

Marie, B., N. Trinkler, I. Zanella-Cleon, N. Guichard, M. Becchi, C. Paillard and F. Marin, 2011b, *Proteomic Identification of Novel Proteins from the Calcifying Shell Matrix of the Manila Clam Venerupis Philippinarum*, Marine Biotechnology, 13, (5): 955-962.

Marie, B., I. Zanella-Cleon, N. Guichard, M. Becchi and F. Marin, 2011c, Novel Proteins from the Calcifying Shell Matrix of the Pacific Oyster Crassostrea gigas, Marine Biotechnology, 13, (6): 1159-1168.

Marie, B., I. Zanella-Cleon, N. Le Roy, M. Becchi, G. Luquet and F. Marin, 2010b, *Proteomic Analysis of the Acid-Soluble Nacre Matrix of the Bivalve Unio pictorum: Detection of Novel Carbonic Anhydrase and Putative Protease Inhibitor Proteins*, Chembiochem, 11, (15): 2138-2147.

Marin, F., R. Amons, N. Guichard, M. Stigter, A. Hecker, G. Luquet, P. Layrolle, G. Alcaraz, C. Riondet and P. Westbroek, 2005, *Caspartin and calprismin, two proteins of the shell calcitic prisms of the Mediterranean fan mussel Pinna nobilis*, Journal of Biological Chemistry, 280, (40): 33895-33908.

Marin, F. and G. Luquet, 2004, *Molluscan shell proteins*, Comptes Rendus Palevol, 3, (6-7): 469-492.

Mauk, M. R., F. I. Rosell, B. Lelj-Garolla, G. R. Moore and A. G. Mauk, 2005, *Metal ion binding to human hemopexin*, Biochemistry, 44, (6): 1864-1871.

Medakovic, D., 2000, *Carbonic anhydrase activity and biomineralization process in embryos, larvae and adult blue mussels Mytilus edulis L*, Helgoland Marine Research, 54, (1): 1-6.

Michenfelder, M., G. Fu, C. Lawrence, J. C. Weaver, B. A. Wustman, L. Taranto, J. S. Evans and D. E. Morsel, 2003, *Characterization of two molluscan crystal-modulating biomineralization proteins and identification of putative mineral binding domains*, Biopolymers, 70, (4): 522-533.

Miksik, I., J. Charvatova, A. Eckhardt and Z. Deyl, 2003, *Insoluble eggshell matrix* proteins - their peptide mapping and partial characterization by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography, Electrophoresis, 24, (5): 843-852.

Miksik, I., A. Eckhardt, P. Sedlakova and K. Mikulikova, 2007, *Proteins of insoluble matrix of Avian (Gallus Gallus) eggshell*, Connective Tissue Research, 48, (1): 1-8.

Miksik, I., P. Ergang and J. Pacha, 2014, *Proteomic analysis of chicken eggshell cuticle membrane layer*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406, (29): 7633-7640.

Miksik, I., P. Sedlakova, K. Lacinova, S. Pataridis and A. Eckhardt, 2010, *Determination of insoluble avian eggshell matrix proteins*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 397, (1): 205-214.

Mineki, M. and M. Kobayashi, 1997, *Microstructure of yolk from fresh eggs by improved method*, Journal of Food Science, 62, (4): 757-761.

Miyamoto, H., T. Miyashita, M. Okushima, S. Nakano, T. Morita and A. Matsushiro, 1996, *A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93, (18): 9657-9660.

Miyashita, T., R. Takagi, M. Okushima, S. Nakano, H. Miyamoto, E. Nishikawa and A. Matsushiro, 2000, *Complementary DNA cloning and characterization of pearlin, a new class of matrix protein in the nacreous layer of oyster pearls*, Marine Biotechnology, 2, (5): 409-418.

Morita, S., C. Tagai, T. Shiraishi, K. Miyaji and S. Iwamuro, 2013, Differential mode of antimicrobial actions of arginine-rich and lysine-rich histones against Gram-positive Staphylococcus aureus, Peptides, 48: 75-82.

Moya, A., S. Tambutte, A. Bertucci, E. Tambutte, S. Lotto, D. Vullo, C. T. Supuran, D. Allemand and D. Zoccola, 2008, *Carbonic anhydrase in the scleractinian coral Stylophora pistillata - Characterization, localization, and role in biomineralization*, Journal of Biological Chemistry, 283, (37): 25475-25484.

Ndao, M., E. Keene, F. F. Amos, G. Rewari, C. B. Ponce, L. Estroff and J. S. Evans, 2010, *Intrinsically Disordered Mollusk Shell Prismatic Protein That Modulates Calcium Carbonate Crystal Growth*, Biomacromolecules, 11, (10): 2539-2544.

Nys, Y.,2010, Structure et formation de l'oeuf, *Science et technologie de l'oeuf Volume I : Production et qualité*, F. Nau, C. Guerin-Dubiard, F. Baron and J.-L. Thapon: 161-250.

Nys, Y., J. Gautron, J. M. Garcia-Ruiz and M. T. Hincke, 2004, *Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins*, Comptes Rendus Palevol, 3, (6-7): 549-562.

Nys, Y., J. Gautron, M. D. McKee, J. M. Garcia-Ruiz and T. Hincke, 2001, *Biochemical and functional characterisation of eggshell matrix proteins in hens*, Worlds Poultry Science Journal, 57, (4): 401-413.

Nys, Y. and N. Guyot,2011, Egg formation and chemistry, *Improving the safety and quality of eggs and egg products. Volume 1: Egg chemistry, production and consumption*, Y. Nys, M. Bain and F. v. Immerseel. Cambridge, UK, Woodhead Publishing Ltd: 83-132.

Nys, Y., M. T. Hincke, J. L. Arias, J. M. Garcia-Ruiz and S. E. Solomon, 1999, *Avian eggshell mineralization*, Poultry and Avian Biology Reviews, 10, (3): 143-166.

Nys, Y., J. Zawadzki, J. Gautron and A. D. Mills, 1991, *Whitening of brown-shelled eggs -Mineral-composition of uterine fluid and rate of protoporphyrin deposition*, Poultry Science, 70, (5): 1236-1245.

Panheleux, M., M. Bain, M. S. Fernandez, I. Morales, J. Gautron, J. L. Arias, S. E. Solomon, M. Hincke and Y. Nys, 1999, *Organic matrix composition and ultrastructure of eggshell: a comparative study*, British Poultry Science, 40, (2): 240-252.

Panheleux, M., Y. Nys, J. Williams, J. Gautron, T. Boldicke and M. T. Hincke, 2000, *Extraction and quantification by ELISA of eggshell organic matrix proteins (ovocleidin-17, ovalbumin, ovotransferrin) in shell from young and old hens*, Poultry Science, 79, (4): 580-588.

Pines, M., V. Knopov and A. Bar, 1995, *Involvement of osteopontin in egg shell formation in the laying chicken*, Matrix Biology, 14, (9): 765-771.

Pipich, V., M. Balz, S. E. Wolf, W. Tremel and D. Schwahn, 2008, *Nucleation and growth of CaCO(3) mediated by the egg-white protein ovalbumin: A time-resolved in situ study using small-angle neutron scattering*, Journal of the American Chemical Society, 130, (21): 6879-6892.

Politi, Y., J. Mahamid, H. Goldberg, S. Weiner and L. Addadi, 2007, *Asprich mollusk shell protein: in vitro experiments aimed at elucidating function in CaCO3 crystallization*, Crystengcomm, 9, (12): 1171-1177.

Poon, S., S. B. Easterbrook-Smith, M. S. Rybchyn, J. A. Carver and M. R. Wilson, 2000, *Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state*, Biochemistry, 39, (51): 15953-15960.

Ramos-Silva, P., J. Kaandorp, L. Huisman, B. Marie, I. Zanella-Cleon, N. Guichard, D. J. Miller and F. Marin, 2013, *The Skeletal Proteome of the Coral Acropora millepora: The Evolution of Calcification by Co-Option and Domain Shuffling*, Molecular Biology and Evolution, 30, (9): 2099-2112.

Rao, A., J. Seto, J. K. Berg, S. G. Kreft, M. Scheffner and H. Coelfen, 2013, *Roles of larval sea urchin spicule SM50 domains in organic matrix self-assembly and calcium carbonate mineralization*, Journal of Structural Biology, 183, (2): 205-215.

Raz, S., P. C. Hamilton, F. H. Wilt, S. Weiner and L. Addadi, 2003, *The transient phase of amorphous calcium carbonate in sea urchin larval spicules: The involvement of proteins and magnesium ions in its formation and stabilization*, Advanced Functional Materials, 13, (6): 480-486.

Rehault-Godbert, S., V. Herve-Grepinet, J. Gautron, C. Cabau, Y. Nys and M. Hincke,2011, Molecules involved in chemical defence of the chicken egg, *Improving the safety and quality of eggs and egg products. Volume 1: Egg chemistry, production and consumption*, Y. Nys, M. Bain and F. v. Immerseel. Cambridge, UK, Woodhead Publishing Ltd: 183-208.

Rehault-Godbert, S., V. Labas, E. Helloin, V. Herve-Grepinet, C. Slugocki, M. Berges, M. C. Bourin, A. Brionne, J. C. Poirier, J. Gautron, F. Coste and Y. Nys, 2013, *Ovalbumin-related Protein X Is a Heparin-binding Ov-Serpin Exhibiting Antimicrobial Activities*, Journal of Biological Chemistry, 288, (24): 17285-17295.

Reyes-Grajeda, J. P., A. Moreno and A. Romero, 2004, *Crystal structure of ovocleidin-17, a major protein of the calcified Gallus gallus eggshell - Implications in the calcite mineral growth pattern*, Journal of Biological Chemistry, 279, (39): 40876-40881.

Rodriguez-Navarro, A. and J. M. Garcia-Ruiz, 2000, *Model of textural development of layered crystal aggregates*, European Journal of Mineralogy, 12, (3): 609-614.

Rose-Martel, M., J. W. Du and M. T. Hincke, 2012, *Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle*, Journal of Proteomics, 75, (9): 2697-2706.

Rose-Martel, M., S. Smiley and M. T. Hincke, 2015, *Novel identification of matrix proteins involved in calcitic biomineralization*, Journal of Proteomics, 116: 81-96.

Rossi, M. and K. d. Reu, 2011, *Alternative hen housing systems and egg quality*. Cambridge, UK, Woodhead Publishing Ltd.

Samata, T., N. Hayashi, M. Kono, K. Hasegawa, C. Horita and S. Akera, 1999, *A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of Pinctada fucata*, Febs Letters, 462, (1-2): 225-229.

Sarashina, I. and K. Endo, 2001, *The complete primary structure of molluscan shell protein* 1 (*MSP-1*), an acidic glycoprotein in the shell matrix of the scallop Patinopecten yessoensis, Marine Biotechnology, 3, (4): 362-369.

Sauveur, B. and M. de Reviers, 1988, *Reproduction and egg production in poultry Reproduction des volailles et production d'oeufs*.

Schmid, F. X., 1993, *Prolyl isomerase - enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions*, Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 22: 123-143.

Schwahn, D., M. Balz and W. Tremel, 2004, *Crystallization of the CaCO(3) mineral in the presence of the protein ovalbumin*, Physica B-Condensed Matter, 350, (1-3): E947-E949.

Shen, X. Y., A. M. Belcher, P. K. Hansma, G. D. Stucky and D. E. Morse, 1997, Molecular cloning and characterization of lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of Haliotis rufescens, Journal of Biological Chemistry, 272, (51): 32472-32481.

Solomon, S. E., 1991, Eggs and eggshell quality.

Spicer, A. P., A. Joo and R. A. Bowling, 2003, *A hyaluronan binding link protein gene family whose members are physically linked adjacent to chrondroitin sulfate proteoglycan core protein genes - The missing links*, Journal of Biological Chemistry, 278, (23): 21083-21091.

Su, J., X. Liang, Q. Zhou, G. Zhang, H. Wang, L. Xie and R. Zhang, 2013, *Structural characterization of amorphous calcium carbonate-binding protein: an insight into the mechanism of amorphous calcium carbonate formation*, Biochemical Journal, 453: 179-186.

Sudo, S., T. Fujikawa, T. Nagakura, T. Ohkubo, K. Sakaguchi, M. Tanaka, K. Nakashima and T. Takahashi, 1997, *Structures of mollusc shell framework proteins*, Nature, 387, (6633): 563-564.

Sun, C. J., G. Y. Xu and N. Yang, 2013, *Differential label-free quantitative proteomic analysis of avian eggshell matrix and uterine fluid proteins associated with eggshell mechanical property*, Proteomics, 13, (23-24): 3523-3536.

Suzuki, M., K. Saruwatari, T. Kogure, Y. Yamamoto, T. Nishimura, T. Kato and H. Nagasawa, 2009, *An Acidic Matrix Protein, Pif, Is a Key Macromolecule for Nacre Formation*, Science, 325, (5946): 1388-1390.

Takahashi, H., D. Yang, O. Sasaki, T. Furukawa and K. Nirasawa, 2009, *Mapping of quantitative trait loci affecting eggshell quality on chromosome 9 in an F-2 intercross between two chicken lines divergently selected for eggshell strength*, Animal Genetics, 40, (5): 779-782.

Takeuchi, T., I. Sarashina, M. Iijima and K. Endo, 2008, *In vitro regulation of CaCO3 crystal polymorphism by the highly acidic molluscan shell protein Aspein*, Febs Letters, 582, (5): 591-596.

Tambutte, S., E. Tambutte, D. Zoccola, N. Caminiti, S. Lotto, A. Moya, D. Allemand and J. Adkins, 2007, *Characterization and role of carbonic anhydrase in the calcification process of the azooxanthellate coral Tubastrea aurea*, Marine Biology, 151, (1): 71-83.

Treccani, L., K. Mann, F. Heinemann and M. Fritz, 2006, *Perlwapin, an abalone nacre protein with three four-disulfide core (whey acidic protein) domains, inhibits the growth of calcium carbonate crystals*, Biophysical Journal, 91, (7): 2601-2608.

Tsukamoto, D., I. Sarashina and K. Endo, 2004, *Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 320, (4): 1175-1180.

Voinescu, A. E., D. Touraud, A. Lecker, A. Pfitzner, W. Kunz and B. W. Ninham, 2007, *Mineralization of CaCO3 in the presence of egg white lysozyme*, Langmuir, 23, (24): 12269-12274.

Wadehra, M., M. Dayal, M. Mainigi, T. Ord, R. Iyer, J. Braun and C. J. Williams, 2006, *Knockdown of the tetraspan protein epithelial membrane protein-2 inhibits implantation in the mouse*, Developmental Biology, 292, (2): 430-441.

Wang, N., Y. H. Lee and J. H. Lee, 2008, *Recombinant perlucin nucleates the growth of calcium carbonate crystals: Molecular cloning and characterization of perlucin from disk abalone, Haliotis discus discus*, Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, 149, (2): 354-361.

Wang, X., B. C. Ford, C. A. Praul and R. M. Leach, 2002, *Collagen X expression in oviduct tissue during the different stages of the egg laying cycle*, Poultry Science, 81, (6): 805-808.

Wang, X., R. Kong, X. Pan, H. Xu, D. Xia, H. Shan and J. R. Lu, 2009a, *Role of Ovalbumin in the Stabilization of Metastable Vaterite in Calcium Carbonate Biomineralization*, Journal of Physical Chemistry B, 113, (26): 8975-8982.

Wang, X., H. Sun, Y. Xia, C. Chen, H. Xu, H. Shan and J. R. Lu, 2009b, *Lysozyme mediated calcium carbonate mineralization*, Journal of Colloid and Interface Science, 332, (1): 96-103.

Wang, X. Q., C. M. Wu, K. Tao, K. Zhao, J. Q. Wang, H. Xu, D. H. Xia, H. H. Shan and J. R. Lu, 2010, *Influence of Ovalbumin on CaCO(3) Precipitation during in Vitro Biomineralization*, Journal of Physical Chemistry B, 114, (16): 5301-5308.

Weiner, S. and L. Addadi, 2011, *Crystallization pathways in biomineralization*, Annual Review of Materials Research, 41: 21-40.

Weiner, S., Y. Levi-Kalisman, S. Raz and L. Addadi, 2003, *Biologically Formed Amorphous Calcium Carbonate*, Connective Tissue Research, 44, (1): 214-218.

Weiss, I. M., S. Kaufmann, K. Mann and M. Fritz, 2000, *Purification and characterization of perlucin and perlustrin, two new proteins from the shell of the mollusc Haliotis laevigata*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 267, (1): 17-21.

Weiss, I. M., N. Tuross, L. Addadi and S. Weiner, 2002, *Mollusc larval shell formation: Amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite*, Journal of Experimental Zoology, 293, (5): 478-491.

Wellman-Labadie, O., R. Lakshminarayanan and M. T. Hincke, 2008, *Antimicrobial properties of avian eggshell-specific C-type lectin-like proteins*, Febs Letters, 582, (5): 699-704.

Wheeler, A. P., J. W. George and C. A. Evans, 1981, *Control of calcium-carbonate nucleation and crystal-growth by soluble matrix of oyster shell*, Science, 212, (4501): 1397-1398.

Wolf, S. E., J. Leiterer, V. Pipich, R. Barrea, F. Emmerling and W. Tremel, 2011, *Strong stabilization of amorphous calcium carbonate emulsion by ovalbumin: Gaining insight into the mechanism of 'polymer-induced liquid precursor' processes*, Journal of the American Chemical Society, 133, (32): 12642-12649.

Wong, M., M. J. C. Hendrix, K. Vondermark, C. Little and R. Stern, 1984, *Collagen in the eggshell membranes of the hen*, Developmental Biology, 104, (1): 28-36.

Wustman, B. A., J. C. Weaver, D. E. Morse and J. S. Evans, 2003, *Characterization of a Ca(II)-, mineral-interactive polyelectrolyte sequence from the adhesive elastomeric biomineralization protein lustrin A*, Langmuir, 19, (22): 9373-9381.

Xing, J., O. Wellman-Labadie, J. Gautron and M. T. Hincke, 2007, *Recombinant eggshell* ovocalyxin-32: Expression, purification and biological activity of the glutathione S-transferase fusion protein, Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, 147, (2): 172-177.

Yang, K. T., C. Y. Lin, J. S. Liou, Y. H. Fan, S. H. Chiou, C. W. Huang, C. P. Wu, E. C. Lin, C. F. Chen, Y. P. Lee, W. C. Lee, S. T. Ding, W. T. K. Cheng and M. C. Huang, 2007, *Differentially expressed transcripts in shell glands from low and high egg production strains of chickens using cDNA microarrays*, Animal Reproduction Science, 101, (1-2): 113-124.

Zeng, L. G., J. H. Wang, Y. J. Li, J. Q. Sheng, Q. Gu and Y. J. Hong, 2012, Molecular characteristics and expression of calmodulin cDNA from the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis schlegelii*, Genetics and Molecular Research, 11, (1): 42-52.

Zhang, C., L. P. Xie, J. Huang, X. L. Liu and R. Q. Zhang, 2006, *A novel matrix protein family participating in the prismatic layer framework formation of pearl oyster, Pinctada fucata*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 344, (3): 735-740.

Zhang, Y., L. P. Xie, Q. X. Meng, T. M. Jiang, R. L. Pu, L. Chen and R. Q. Zhang, 2003, *A novel matrix protein participating in the nacre framework formation of pearl oyster, Pinctada fucata*, Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, 135, (3): 565-573.



Pauline MARIE Biominéralisation de la coquille d'œuf de poule : caractérisation des protéines de la matrice organique impliquées dans l'initiation de la minéralisation



Résumé

L'objectif principal de cette thèse était d'identifier et de quantifier les protéines de la matrice organique qui contrôlent le type polymorphique et la morphologie des cristaux présents dans la coquille d'œuf de poule à différents stades du processus de minéralisation afin de mettre en évidence les composants impliqués dans la calcification à chacun de ces stades. Au total, 64 et 175 protéines différentiellement abondantes durant le processus de minéralisation ont été identifiées dans le milieu de formation (fluide utérin) et la matrice organique. Parmi celles-ci, les fonctions de 24 protéines du fluide utérin et de 77 issues de la coquille sont potentiellement reliées au processus de minéralisation. Nous décrivons plus particulièrement 20 protéines du fait de leur abondance et de leurs fonctions directe ou indirecte sur le processus de calcification. Des études complémentaires sur ces candidats permettront de confirmer leur implication dans la minéralisation de la coquille d'œuf.

Mots-clés : poule, coquille, biominéralisation, matrice organique, protéomique quantitative

Résumé en anglais

The aim of this PhD was to identify and quantify eggshell organic matrix proteins which control polymorphic type and morphology of crystals at different time points of the eggshell mineralization process in order to highlight particular components involved in calcification at each calcification stage. A total of 64 and 175 proteins differentially abundant during mineralization process were identified in the forming milieu (uterine fluid) and in the eggshell organic matrix respectively. Out of them, 24 uterine fluid and 77 eggshell proteins are functionally related to the mineralization process. We paid particular attention to 20 overabundant proteins with direct or indirect functional evidences related to calcification. Further studies will be necessary to confirm their involvement in the chicken eggshell mineralization.

Key words : chicken, eggshell, biominéralisation, organic matrix, quantitative proteomics