UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

UMR INRA 0083 Biologie des Oiseaux et Aviculture

THÈSE présentée par :

Lilian STAPANE

soutenue le : **17 Décembre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**

Discipline/ Spécialité : Science de la Vie et de la Santé

Biominéralisation de la coquille d'œuf de poule : mise en évidence d'un transport vésiculaire du minéral impliquant les protéines EGF-like repeats and discoidin-like domains 3 (EDIL3) et Milk fat globule EGF-factor 8 (MFGE8)

THÈSE dirigée par :

M. GAUTRON Joël	Directeur de recherche, INRA Centre Val de Loire

RAPPORTEURS :

M. MARIN Frédéric	Directeur de recherche, CNRS-Université de Bourgogne
Mme. TAMBUTTE Sylvie	Directrice de recherche, Centre Scientifique de Monaco

---

JURY :

M. ANDRES Christian	Professeur – praticien hospitalier, Université de Tours
Mme. CHAUSSAIN Catherine	Professeur – praticien hospitalier, Université Paris Descartes
M. GAUTRON Joël	Directeur de recherche, INRA Centre Val de Loire
Mme. LETERRIER Christine	Directrice de recherche, INRA Centre Val de Loire
M. MARIN Frédéric	Directeur de recherche, CNRS-Université de Bourgogne
Mme. TAMBUTTE Sylvie	Directrice de recherche, Centre Scientifique de Monaco

À mes parents et à mes frères

Remerciements

« La reconnaissance est la mémoire du cœur »

Hans Christian Anderson

Dans un premier temps, je tiens à remercier vivement Joël G. qui m'a dirigé tout au long de cette aventure, en m'apportant le soutien, les encouragements, les compétences/connaissances et tout le nécessaire pour devenir le chercheur que je suis aujourd'hui. C'est fait, le petit Padawan de la recherche est devenu Jedi. Merci d'avoir mis en œuvre tous les moyens pour explorer cette belle hypothèse.

Je tiens ensuite à exprimer toute ma gratitude à Nathalie L.R. qui a donné une dimension différente à ma thèse. Cette section est trop courte pour développer toute ma reconnaissance, mais je tiens à te remercier pour ton soutien hors pair, ta bienveillance, ta motivation, ton aide, nos échanges enrichissants et toutes les connaissances que tu m'as transmises.

Je remercie profondément tous les membres de l'équipe Défense de l'Œuf, Valorisation, Evolution : Sophie R.G., Nicolas G., Clara D., Marie-Louise Z., Thierry M., Jean-Claude P., Aurélien B., Magali C. et Nelly B. qui m'ont fourni des conditions de travail remarquables pour accomplir ce doctorat. Un grand merci pour votre soutien, votre aide, votre dynamisme, votre générosité et votre sympathie. Merci à Nelly de m'avoir fourni cette ambiance creusoise au laboratoire.

Je tiens également à remercier Yves N. pour ses conseils, ses connaissances et sa sympathie, ainsi que Maryse M. pour toute son aide et sa bonne humeur.

Un très grand merci à Maxwell H. pour ses connaissances, son aide dans la rédaction des articles, sa bonne humeur et nos échanges fructueux.

Je remercie Alejandro R.N., Christian G. et Rocio R. pour leur accueil lors de mon séjour dans leur belle ville de Grenade, leur bienveillance, et leur aide. Merci de m'avoir transmis vos compétences sur les analyses de minéralogie. Je remercie également DSM, l'Université François Rabelais de Tours et l'INRA de m'avoir permis de réaliser ce séjour.

Un merci particulier à Jacky E. pour son aide technique qui a été si précieuse. Excuse-moi, tu saurais me dire où est ce que je vais trouver une personne qui répand autant de bonne humeur ? Merci pour ton soutien, tous nos délires et toutes nos blagues.

Un merci spécial à Audrey G. qui a partagé avec moi cette aventure de thésard (#co-thésarde). Merci beaucoup pour ton soutien et tous les moments qu'on a partagés.

Merci à toutes les personnes qui ont partagé mon bureau : Mégane BRG (logistique), Maeva, Mylène, De Pauw (De Paux ?) et Loulergue pour votre soutien et pour avoir égayé mon quotidien avec nos délires, et mercéé ! J'aurais aimé continuer ce paragraphe mais je n'ai pas pu car j'ai un chien.

Merci à Pascal pour nous avoir ébloui avec ses talents surprenants et admirables dans le domaine du Desk - Art abstrait !

Merci à mes collègues du foot (Chalalalala) et du futsal de m'avoir permis de me distraire sur les terrains pendant ces 3 années.

Un merci spécial à Sabine et Alice (ça glisse, au pays des dialyses, clac-clac !) pour les jeudis plages, les bons moments partagés et tout le soutien. Merci également à la team espagnole !

Merci aux thésards, post-docs et stagiaires avec qui j'ai pu échanger durant cette thèse : Boubou, Anne So', Eva, Quentin, Maud, Aurélien, Marie, Namya, Marine, Thibaut, Sandy, Alan, Alix, Max, Anthony, Anais, Coco, Guillaume, Sarate, Justine, Flora et bien sûr el phenomeno Michou115 !

Un fat merci à mes gars sûrs : Mambu et Jerem qui m'ont soutenu jusqu'au bout. Merci d'avoir été là pour partager ces péripéties (il est chelou votre pote). Et merci à Fafa et Mika au passage !

Mes remerciements vont également à mes collègues de la 6ème promotion EIR-Agreenium.

J'exprime également toute ma gratitude à ma famille pour leur soutien sans faille. Merci de m'avoir soutenu d'une façon inconditionnelle durant cette période si intense pour moi. Ça va faire bizarre de me retourner et de voir tout ce chemin parcouru. Merci spécialement à Laura (pionono) pour avoir partagé mon quotidien, et pour tous ses délicieux plats qui m'ont rempli de force. Merci à mon frère, Roman, pour ses belles illustrations qui ont orné mes présentations.

Je tiens également à remercier les maitres de stages et encadrants, avec qui j'ai pu travailler durant mon parcours d'étudiant, pour m'avoir transmis leur passion pour la recherche.

Je tiens à remercier Valérie L. et Lucie C.S. de la plateforme PAIB de Nouzilly, Emilie B. de la plateforme GeT-GenoToul de Toulouse, et Pierre-Ivan R. et Sonia G. de la plateforme de microscopie électronique de Tours, pour l'expertise qu'ils m'ont apportée.

Un grand merci à toutes les personnes de l'unité mixte de recherche Biologie des Oiseaux et Aviculture, de l'UE Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours, de l'équipe Gonade, Conservation, Régénération, du Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français de Nouzilly, ainsi que de l'Institut Technique de l'Aviculture pour leur accueil et toute l'aide qu'ils m'ont apportée.

En dernier lieu, je souhaite remercier la région Centre-Val de Loire et l'école doctorale Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant de Université de Tours pour le financement de ma thèse, ainsi que les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Ah, j'oubliais, merci aux personnes que j'aurais pu oublier.

Résumé

L'œuf de poule constitue une chambre close et autosuffisante pour permettre le développement extra-utérin d'un embryon. L'œuf amniotique a permis l'affranchissement définitif du milieu aquatique qui était jusqu'alors essentiel pour la reproduction des espèces. La coquille de l'œuf permet de protéger le contenu nécessaire au développement du poussin de la dessiccation et des éventuelles contaminations microbiennes. La coquille est ainsi désignée comme la première barrière de défense physique de l'œuf possédant des capacités mécaniques remarquables. D'une épaisseur de 0,3 mm et d'un poids de 6 g, ce biominéral résiste à 3-4 kg de pression statique. Sa formation implique un processus de biominéralisation qui compte parmi les plus rapides sur terre. Ce processus est médié par une matrice organique qui interagit avec la phase minérale afin de contrôler la croissance des cristaux de calcite qui composent la coquille.

Afin de mieux comprendre le rôle de la matrice organique dans ce phénomène de biominéralisation, de nombreuses études ont permis d'identifier ses composants. L'essor des technologies d'analyses à haut-débit a eu un impact conséquent sur l'identification et la caractérisation des protéines de la matrice organique. Ainsi, le nombre de protéines identifiées dans la coquille est passé de 11 à plus de 900 entre 2006 et 2019. Dans l'intention de dépasser l'étape de criblage moléculaire et de hiérarchiser les protéines de la matrice organique, les études qualitatives ont été complétées par des études quantitatives et prédictives des fonctions de ces protéines dans ce processus de minéralisation. Ainsi, une étude a mentionné 22 protéines comme étant des acteurs moléculaires clefs du processus. Parmi celles-ci, EDIL3 (EGF-like repeats and discoidin-like domains 3) et MFGE8 (Milk fat globule-EGF factor 8), sont deux protéines, rapportées dans la majorité des études à haut débit et qui semblent donc avoir un rôle clef dans la formation de la coquille.

Dans ce contexte, mes recherches avaient pour but de caractériser ces deux protéines clefs, dont les fonctions lors de la calcification de la coquille étaient jusqu'alors inexplorées.

Notre premier objectif a été de caractériser les protéines EDIL3 et MFGE8 chez la poule et de déterminer leur rôle dans le processus de minéralisation de la coquille d'œuf de poule. Ainsi, nous avons retracé l'histoire évolutive commune de ces deux protéines, qui indique une divergence il y a environ 480 millions d'années ayant donné lieu aux protéines EDIL3 et MFGE8. Nos analyses d'expression des gènes *Edil3* et *Mfge8* de *Gallus gallus*, du niveau de leurs protéines encodées et de leur structure tridimensionnelle, ont ensuite permis de proposer un nouveau modèle cohérent pour la minéralisation de la coquille des oiseaux. Dans ce modèle, les protéines EDIL3 et MFGE8 seraient impliquées dans un transport vésiculaire qui permettrait de délivrer une phase de carbonate de calcium amorphe (ACC) stabilisée, sur le site de la minéralisation.

Notre second objectif a alors été de valider de manière expérimentale, ce nouveau modèle de transport vésiculaire du minéral pour la calcification de la coquille, et de caractériser ses acteurs moléculaires clefs. Ainsi, des activités de bourgeonnements de la membrane, libérant

les vésicules dans le fluide utérin, ont été visualisées *via* une analyse de microscopie électronique. La présence d'ACC à l'intérieur des vésicules extracellulaires repérées dans le fluide a ensuite été validée *via* des techniques de spectroscopies (spectroscopie des pertes d'énergie ; EELS et spectroscopie de rayons-X à dispersion d'énergie ; EDS) et de diffraction des rayons-X. L'identification des principaux acteurs moléculaires (analyse d'expression génique, protéomique, immunofluorescence et immunoblots), a finalement permis de dresser un schéma qui résume ce mécanisme assurant la stabilisation et le transport spécifique de l'ACC. Ainsi, les protéines ANXA1, ANXA2 et ANXA8 permettraient l'apport des ions calcium dans la vésicule tandis que l'enzyme CA4 assurerait l'apport des ions bicarbonates dans cette dernière, afin de permettre la formation de l'ACC. Ce dernier pourrait être stabilisé par des conditions physico-chimiques intravésiculaires optimales et la présence de protéines telles que l'ovalbumine et le lysozyme. De plus, la protéine EDIL3, et potentiellement la protéine MFGE8, pourraient de leur côté assurer l'adressage des vésicules sur le site de la minéralisation *via* leur domaine de liaison au calcium. Enfin, les protéines PDCD6IP, Syntenin-1 et Ezrin pourraient être impliquées dans la biogénèse des vésicules.

En conclusion, notre étude a conduit à la mise en évidence d'un transport vésiculaire du carbonate de calcium amorphe durant la biominéralisation de la coquille d'œuf de poule. C'est la première fois qu'un tel mécanisme est démontré dans un processus de biominéralisation carbonatée chez les vertébrés. En outre, la validation de cette voie vésiculaire a conduit à l'élaboration d'un modèle global qui résume le transport des précurseurs minéraux des vaisseaux sanguins *via* l'utérus et le fluide utérin jusqu'au front de minéralisation. Ainsi, les 3 voies qui seraient employées pour fournir les précurseurs minéraux durant la minéralisation de la coquille seraient : la voie transcellulaire, la voie vésiculaire et potentiellement la voie paracellulaire.

Les résultats de cette thèse ont contribué à l'apport de nouvelles connaissances aussi bien fondamentales (physiologie de la poule et mécanismes généraux de la biominéralisation) que pour développer de potentielles applications pour la filière œuf (nutrition et amélioration génétique).

Mots clefs : Coquille d'œuf, biominéralisation, protéines, vésicules, transport, minéral

Résumé anglais

The chicken egg is a closed and self-sufficient chamber allowing the development of the embryo outside the uterus. The amniotic egg allowed the emancipation from the aquatic milieu, which was essential for reproduction so far. The eggshell protects the egg content and is crucial for the chick development to avoid desiccation and potential microbial contaminations. The eggshell is the first physical barrier of the egg, which exhibits remarkable mechanical properties. This biomineral is only 0.3 mm thickness with a weight of 6 g but it supports 3-4 kg of static pressure. Its formation involves a biomineralization process, which is one of the fastest on earth. This process is mediated by an organic matrix interacting with the mineral phase in order to control the calcite crystal growth to form the shell.

In order to decipher the role of the organic matrix in chicken eggshell formation, numerous studies were performed to identify and characterize organic matrix proteins. The development of high-throughput techniques has dramatically improved the identification and characterization of organic matrix proteins. Thus, the number of identified eggshell proteins increases from 11 to about 900 between 2006 and 2019. In order to overpass this molecular screening and to establish a hierarchy on functional organic matrix proteins, quantitative and functional predictive analyses have been performed. Twenty-two proteins were described as major molecular actors of the eggshell biomineralization process. Among them, EDIL3 (EGF-like repeats and discoidin-like domains 3), and MFGE8 (Milk fat globule-EGF factor 8), are two proteins widely reported in high-throughput studies. They are suspected to ensure a key role in eggshell formation.

In such a context, the aim of my research was to characterize both proteins, the functions of which during eggshell formation was not yet elucidated.

The first objective was to characterize chicken EDIL3 and MFGE8 and we deciphered the common evolutionary history of these proteins that showed a distinction between EDIL3 and MFGE8 emerging around 480 million years ago, which gives rise to vertebrate EDIL3 and MFGE8. Our expression analyses of *Gallus gallus Edil3* and *Mfge8* in combination with protein level and structural analyses, allow us to propose a coherent model for chicken eggshell mineralization. In this model, EDIL3 and MFGE8 would be involved in a vesicular transport, which could deliver a stabilized amorphous calcium carbonate phase (ACC) on the mineralization site.

Our second objective was to give experimental evidence on this predicted new model involving vesicular transport of mineral for eggshell mineralization, and to characterize key molecular actors. Membrane budding activities leading to vesicle releases in the uterine fluid were observed with electron microscope observations. ACC presence inside extracellular vesicles from uterine fluid, was then confirmed through spectroscopic analyses (electron energy loss spectroscopy; EELS and energy-dispersive X-ray spectroscopy; EDS) and X-ray diffraction. Major molecular actors were identified using gene expression, proteomic and western blot analyses and immunofluorescence. These identifications led us to establish a

global diagram of the vesicular mechanism, which ensures ACC stabilization and delivery. ANXA1, ANXA2 and ANXA8 proteins would allow the calcium accumulation inside vesicle and CA4 would ensure bicarbonate accumulation leading to ACC formation. The latter could be stabilized under optimal vesicle physico-chemical conditions in combination with the presence of specific proteins such as ovalbumin and lysozyme. In addition, EDIL3 and potentially MFGE8 could ensure the guiding of vesicles through their calcium-binding domain. Finally, the proteins PDCD6IP, Syntenin-1 and Ezrin could be involved in vesicles biogenesis.

In conclusion, our study provided evidence for a vesicular transport of ACC during chicken eggshell biomineralization. It is the first time that such a mechanism is highlighted in vertebrate calcium carbonate mineralization. Moreover, the validation of a mineral vesicular pathway leads us to propose a global and coherent model of the supply of mineral transport from blood vessels, through uterus and uterine fluid until mineralization site. The three pathways involved in mineral transport during eggshell mineralization included transcellular, vesicular pathways and possibly a paracellular pathway.

The results of this PhD thesis contributed to give new insights into fundamental knowledge (chicken physiology and general biomineraliaztion process) and for potential applications in poultry industry.

Keywords: eggshell, biomineralization, proteins, vesicles, transport, mineral

Table des matières

I. Introduction..... 21

II. Revue de la bibliographie 27

1. Formation de l'œuf de poule.....29

1.1. Le système reproducteur 29
1.2. Le jaune d'œuf.....31
1.3. La membrane vitelline 34
1.4. Le blanc d'œuf.....35
1.5. La coquille d'œuf.....37

2. Structure et propriétés mécaniques de la coquille d'œuf.....39

2.1. Ultrastructure de la coquille 39
2.2. Microstructure et propriétés mécaniques de la coquille 42

3. Mécanismes généraux de la biominéralisation.....47

3.1. Le phénomène de biominéralisation.....47
3.2. Les différentes stratégies de biominéralisation 49
3.3. Les biominéralisations phosphatées et carbonatées 51
3.4. Rôle de l'ACC dans la biominéralisation carbonatée.....54
3.5. Rôle des matrices organiques en biominéralisation 57
3.6. Le transport vésiculaire en biominéralisation 63

4. Le processus de biominéralisation de la coquille d'œuf de poule 71

4.1. Apport des précurseurs minéraux sur le site de minéralisation.....71
4.2. Principales phases de la biominéralisation de la coquille d'œuf de poule.....74
4.3. La matrice organique de la coquille d'œuf 78

5. Les protéines MFGE8 et EDIL3 96

5.1. La protéine MFGE8 (Milk fat globule EGF-factor 8).....96
5.2. La protéine EDIL3 (EGF-like repeats and discoidin-like domains 3).....104
5.3. EDIL3 et MFGE8 dans la coquille d'œuf.....110

III. Objectifs de la thèse 115

IV. Résultats expérimentaux..... 121

Chapitre 1 : Le rôle des glycoprotéines EDIL3 et MFGE8 dans un nouveau modèle de transport vésiculaire pour la calcification de la coquille d'œuf des oiseaux 123

Chapitre 2 : Validation du nouveau modèle pour la biominéralisation de la coquille des oiseaux : un transport vésiculaire assure l'adressage du carbonate de calcium amorphe stabilisé 153

V. Discussion et perspectives 207

1. Discussion générale 209

1.1. Rappels du contexte de mon travail de thèse 209

1.2. Les protéines EDIL3 / MFGE8 dans la coquille d'œuf de poule.....210

1.3. EDIL3 et MFGE8 possèdent une histoire évolutive commune 212

1.4. Analyse structurale des domaines fonctionnels d'EDIL3 et MFGE8 213

1.5. Hypothèse de l'implication d'EDIL3 et MFGE8 dans un transport vésiculaire.....215

1.6. Des vésicules transportent de l'ACC dans les cellules utérines et le fluide utérin ..218

1.7. Les acteurs moléculaires clefs du transport vésiculaire impliqué dans la minéralisation de la coquille des oiseaux 219

1.8. Modèle global du transport minéral nécessaire à la formation de la coquille.....227

2. Perspectives 231

2.1. Caractérisation et localisation des acteurs moléculaires du transport vésiculaire impliqué dans la minéralisation de la coquille d'œuf de poule 233

2.2. Validation fonctionnelle du lien entre les vésicules extracellulaires et la biominéralisation de la coquille 236

2.3. Analyse de la variation du transport vésiculaire au cours de la biominéralisation de la coquille 238

2.4. Implications respectives des différentes voies de transport du minéral nécessaire à la minéralisation de la coquille d'œuf de poule.....240

2.5. Transposition du modèle du transport vésiculaire du minéral à d'autres systèmes biologiques.....243

2.6. Retombées en terme de connaissances 247

2.7. Retombées en terme d'applications potentielles 251

VI. Conclusion 257

VII. Articles et communications scientifiques 261

1. Articles scientifiques dans des revues à comité de lecture.....263

2. Communications à des congrès scientifiques 263

VIII. Références bibliographiques 267

IX. Annexes..... 301

Liste des tableaux

Tableau 1. Influence de la mue sur la qualité de coquille de l'œuf de poule 47
Tableau 2. Les protéines des matrices organiques d'invertébrés interagissant avec la phase minérale 61
Tableau 3. Les protéines des matrices d'invertébrés n'interagissant pas directement avec la phase minérale.....62

Liste des figures

Figure 1. Les compartiments de l'œuf de poule 29
Figure 2. Représentation schématique de l'oviducte de poule et de la durée des phases de dépôts des différents constituants de l'œuf 30
Figure 3. Représentation schématique d'une coupe longitudinale de l'oviducte de poule 31
Figure 4. Développement des follicules avant l'ovulation chez la poule.....32
Figure 5. Composition des différents compartiments de l'œuf 33
Figure 6. Structure de la coquille d'œuf de poule.....38
Figure 7. Analyse de la microstructure de la coquille par diffraction aux rayons X 43
Figure 8. Orientations cristallines des coquilles d'œufs de 4 espèces aviaires observées en microscopie optique à lumière polarisée 44
Figure 9. Résistance à la rupture (kg) en fonction du poids de l'œuf (g) de différentes espèces d'oiseaux 45
Figure 10. Influence de l'âge sur la qualité de coquille de l'œuf de poule 46
Figure 11. Distribution des processus de biominéralisation phosphatée et carbonatée en fonction des espèces 52
Figure 12. Observation des différents polymorphes de carbonate du calcium en microscopie électronique.....52
Figure 13. Image de microscopie électronique à transmission de vésicules extracellulaires sécrétées par les ostéoblastes lors de la formation osseuse 66
Figure 14. Schéma illustrant le mécanisme de la minéralisation osseuse médié par les vésicules extracellulaires 69
Figure 15. Schéma global décrivant les transporteurs ioniques utérins impliqués dans la biominéralisation de la coquille d'œuf de poule.....72
Figure 16. Les évènements clefs de la minéralisation de la coquille d'œuf de poule.....74
Figure 17. Cinétique de dépôt du minéral lors de la minéralisation de la coquille d'œuf de poule 75
Figure 18. Dépôt du carbonate de calcium sur les noyaux mamillaires.....75
Figure 19. Modélisation de la croissance des cristaux de carbonate de calcium au cours de la biominéralisation de la coquille d'œuf de poule.....76
Figure 20. Inhibition de la croissance cristalline *via* l'adsorption de protéines 77

Figure 21. Evolution du profil protéique du fluide utérin au cours des 3 phases principales de la minéralisation de la coquille 78
Figure 22. Influence du fluide utérin sur la minéralisation de la coquille d'œuf de poule 80
Figure 23. Les trois activités majeures des protéines de la matrice organique de la coquille d'œuf de poule.....90
Figure 24. Les fonctions associées à la biominéralisation des protéines majeures de la matrice organique de la coquille d'œuf de poule 95
Figure 25. Représentation schématique de la membrane des globules gras du lait (MFGM) ..96
Figure 26. Structure du domaine F5/8C-2 de la protéine MFGE8 de la souris 99
Figure 27. Les isoformes de la protéine MFGE8 de la souris 100
Figure 28. Les sites de glycosylation des protéines MFGE8 de l'homme, du bovin et de la souris.....101
Figure 29. Les diverses fonctions biologiques de la protéine MFGE8 identifiées chez les mammifères.....101
Figure 30. Mécanisme d'action de MFGE8 assurant la liaison entre une cellule apoptotique et un phagocyte 102
Figure 31. Modèles proposés pour la fonction de liaison de MFGE8 entre le spermatozoïde et la zone pellucide de l'ovocyte du porc.....103
Figure 32. Structure et fonctions moléculaires de la protéine EDIL3 des mammifères.....106
Figure 33. Structures tertiaires des domaines EGF-like de la protéine EDIL3 des mammifères 107
Figure 34. Les sites de glycosylation des protéines EDIL3 de l'homme et de la souris.....108
Figure 35. Les diverses fonctions biologiques de la protéine EDIL3 identifiées chez les mammifères.....108
Figure 36. Abondance des protéines EDIL3 et MFGE8 dans la matrice organique au cours du processus de biominéralisation de la coquille d'œuf de poule 112
Figure 37. Structure du premier domaine EGF-like du facteur de coagulation IX humain ...113
Figure 38. Adsorption potentielle des protéines EDIL3 et MFGE8 sur un cristal de calcite lors de la formation de la coquille.....113
Figure 39. Diagramme de la démarche suivie pour l'article 1 127
Figure 40. Diagramme de la démarche suivie pour l'article 2 156
Figure 41. Arbre phylogénétique simplifié retraçant l'histoire évolutive des protéines EDIL3 et MFGE8.....213

Figure 42. Organisation et fonctions moléculaires des domaines des protéines EDIL3 et MFGE8 de la poule 215

Figure 43. Observations de la couche palissadique de la coquille d'œuf de poule en microscopie électronique 216

Figure 44. Mécanisme potentiel de liaison des protéines EDIL3 et MFGE8 permettant l'adressage des vésicules sur le site de la minéralisation 217

Figure 45. Localisation des acteurs moléculaires clefs au niveau des vésicules extracellulaires impliquées dans transport de l'ACC durant la minéralisation de la coquille d'œuf de poule.225

Figure 46. Représentation schématique de l'implication du transport vésiculaire de l'ACC durant la phase d'initiation de la minéralisation de la coquille d'œuf de poule 226

Figure 47. Schéma du modèle global des différentes voies qui assureraient le transport du minéral durant la biominéralisation de la coquille d'œuf de poule.....228

Figure 48. Schéma de l'organisation des perspectives de ce travail de thèse 232

Figure 49. Schéma des objectifs et réalisations techniques de l'axe 1 des perspectives.....233

Figure 50. Microphotographies (MET) de coquille décalcifiée après incubation avec un anticorps (anti-OC-116) couplé à des particules d'or 234

Figure 51. Schéma des objectifs et réalisations techniques de l'axe 2 des perspectives.....236

Figure 52. Schéma des objectifs et réalisations techniques de l'axe 3 des perspectives.....240

Figure 53. Schéma des objectifs et réalisations techniques de l'axe 4 des perspectives 241

Figure 54. Schéma des objectifs et réalisations techniques de l'axe 5 des perspectives 243

Figure 55. Schéma illustrant l'organisation de la membrane chorioallantoïque et la résorption de la coquille ayant lieu entre le 10ème et 16ème jour du développement embryonnaire du poussin 247

Figure 56. Connaissances et applications potentielles qui découlent des résultats de ce doctorat 248

Figure 57. Les voies alternatives de cristallisation 250

Figure 58. Schéma illustrant le mécanisme d'un potentiel complément calcique sous forme de carbonate de calcium amorphe encapsulé et lyophilisé.....255

Certaines figures contiennent des élements du site Servier Medical Art (https://smart.servier.com/), sous la licence « Creative Commons Attribution 3.0 Unported License ».

Liste des annexes

Annexe 1. Résumé des paramètres qui affichent des variations significatives en fonction de l'âge ou de la qualité des coquilles.....303

Annexe 2. Article présentant les résultats obtenus au cours de la mobilité de 3 mois et demi dans le département de Minéralogie et Pétrologie de l'université de Grenade en Espagne ...304

Annexe 3. Article publié dans le eBook des 13ème Journées de la Recherche Avicole et palmipèdes à foie gras – 20 et 21 mars 2019) – Tours Centre des congrès Vinci 325

Liste des abréviations

Abréviations	Significations
ACAN	Aggrécane
ACC	Carbonate de calcium amorphe
ACP	Phosphate de calcium amorphe
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ALB	Albumine
ANX	Annexines
ATP	Adénosine triphosphate
ATP2A	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2
ATP2B	Plasma membrane calcium-transporting ATPase
AvBD11	Avian beta-defensin 11
BOA	Biologie des oiseaux et aviculture
BPIL	Bactericidal/permeability-increasing protein-like
BSP	Bone sialoprotein
BSQ	Bone strength quality
CA	Anhydrase carbonique
Ca^{2+}	Ion calcium
Ca^{2+}/Na^{+}	Echangeur calcium-sodium
$CaCO_3$	Carbonate de calcium
CALB1	Calbindine-1
CAM	Membrane chorioallantoïque
$CaPO_4$	Phosphate de calcium
CGPs	Cellules germinales primordiales
$Cl^{-}/HCO3^{-}$	Echangeur chlore-bicarbonate
CLDN	Claudines
CLU	Clusterine
CNPO	Comité national pour la promotion de l'œuf
CO_2	Gaz carbonique
Cas9	CRISPR-associated endonuclease
CRB	Calcium reserve body
CREMP	Protéine des membranes coquillières riche en cystéine
CRIPSR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
cryo-MEB	Cryo-microscopie électronique à balayage
cryo-MET	Cryo-microscopie électronique à transmission
CST3	Cystatine C
CX3CL1	Fractalkine
2D-XRD	Diffraction aux rayons-X en deux dimensions
DMP1	Protéine de la matrice de dentine-1
DOVE	Défenses de l'œuf, valorisation et évolution

DSPP	Sialophosphoproteine de dentine
EDIL3	EGF-like repeats and discoidin-like domains 3
EDS	Spectroscopie de rayons-X à dispersion d'énergie
EELS	Spectroscopie des pertes d'énergie
EGF-like	Epidermal growth factor like
EIR-A	École internationale de recherche d'Agreenium
emPAI	Exponentially modified protein abundance index
Esr1	Réceptor d'œstrogène 1
EXAFS	Spectrométrie d'absorption des rayons-X
EZR	Ezrine
F5/8C	Domaine des facteurs de coagulation 5/8
FSH	Hormone folliculo-stimulante
GPC4	Glypicane-4
Grp94	Endosplasmine (HSP90B1)
HAPLN	Hyaluronan and proteoglycan link protein
HCO_3^-	Ion bicarbonate
HCO_3^-/Na^+	Co-transporteur bicarbonate-sodium
HDL	Lipoprotéines de haute densité
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HPX	Hémopexine
HSPA8	Protéine heat shock cognate 71 kDa
IMPACT	Identification of matrix proteins affecting calcite texture in chicken and guinea fowl eggshells
ITAVI	Institut technique des filières avicole, cunicole et piscicole
ITPR	Récepteur inositol 1,4,5-trisphosphate
JAM	Molecule d'adhésion de jonction
Ksp	Produit de solubilité
LDL	Lipoprotéines de basse densité
LH	Hormone lutéinisante
LPS	Lipopolysaccharide
Lrp8	Low-density lipoprotein receptor-related protein 8
LYZ	Lysozyme
MFGE8	Milk fat globule-EGF factor 8
MFGM	Membrane des globules gras du lait
Mg^{2+}	Ion magnésium
micro-CT	Micro-tomographie
MMP	Matrix metalloprotéinase
MO	Matrice organique
Na^+/K^+ ATPase	Pompe sodium-potassium
NPP1	Nucleotide pyrophosphate phosphodiesterase
NUCB2	Nucleobindine-2
O_2	Oxygène
OC	Ovocléidine

OCLN	Occludines
OCX	Ovocalyxine
OIH	Ovoinhibiteur
OPN	Ostéopontine
OVAL/OVA	Ovalbumine
OVM	Ovomucoïde
OVOT	Ovotransferrine
p.o.	Post-ovulation
PO_4^{3-}	Ion phosphate
P/T	Domaine riche en proline-thréonine
PDCD6IP	Programmed cell death 6-interacting protein
PHOSPHO1	Orphan phosphatase 1
Pi	Phosphate inorganique
Pif80	Protéine de *Pinctada fucata* 80
PIT1	Transporteur de phosphate 1
Ppi	Pyrophosphate inorganique
PPIB	Peptidylprolyl isomerase B
PRL	Prolactine
PS	Phosphatidylsérines
Pth	Hormone parathyroide
RT-qPCR	PCR quantitative en temps réel à partir d'ADNc
QTL	Quantitative trait locus
Rab	Ras-related protein Rab
RGD	Motif de liaison aux intégrines
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
RNA-Seq	Séquençage du transcriptome
S100	Protéine de liaison au calcium S100
SCPP	Phosphoprotéines sécrétées liant le calcium
SDCBP	Protéine de liaison au syndecan
SLC26A	Solute carrier family 26
SLC4A	Co-transporteur sodium-bicarbonate
SLC8A	Echangeur sodium-calcium
SMPD3	Phosphodiesterase 3
SNAP	Synaptosomal-associated protein
SNP	Single nucleotide polymorphism
SPINK7	Inhibiteur de serine peptidase, Kazal type 7
TJP	Protéine des jonctions étroites
TNAP	Alkaline phosphatase non spécifique
TRPC	Short transient receptor potential channel
TRPV	Transient receptor potential vanilloide
TSG101	Tumor susceptibility gene 101 protein
TSKU	Tsukushi
Vamp	Protéine associée au membrane vésiculaire
VCAN	Versicane

VLDL	Vittelogénine et de lipoprotéines de très basse densité
VMO	Protéine de la membrane vitelline externe
VPS	Vacuolar protein sorting-associated protein
YWHAH	14-3-3 protein eta
YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta
ZP	Zone pellucide
α(-)β(-)	Intégrine

I. *Introduction*

« Au début, difficile de s'imaginer que la fin est proche, et pourtant elle l'est »

Jonathan Pasquier

Au cours de l'évolution, l'œuf amniotique a permis l'affranchissement définitif du milieu aquatique qui était jusqu'alors essentiel pour la reproduction des espèces. Les espèces terrestres aux œufs amniotiques (reptiles, oiseaux), ne sont plus contraintes à rejoindre l'eau pour se reproduire, par opposition aux espèces terrestres aux œufs non-amniotiques (amphibiens). Dans l'œuf amniotique, le contenu nécessaire au développement est protégé de la dessiccation par une enveloppe organique renforcée par des dépôts de calcaires, plus ou moins importants selon les espèces (la coquille).

Ainsi, l'œuf amniotique est l'élément clef du cycle de reproduction extra-utérin de la poule, et plus largement des oiseaux. Il correspond à une chambre aseptique et autosuffisante qui permet le développement harmonieux du poussin en 21 jours. Au cours de cette période, l'embryon dispose seulement des constituants ayant été déposés en amont dans l'œuf. Aucun constituant ou déchet du métabolisme ne peut être introduit ou extrait de l'œuf durant le développement, mis à part des composés gazeux (échanges atmosphériques dont le CO_2). La synthèse et la dégradation des composés associés au développement de l'embryon sont exclusivement assurées par les constituants de l'œuf qui disposent de propriétés biologiques remarquables. Le jaune, le blanc et la coquille contiennent toutes les réserves nutritives minérales, protéiques et lipidiques nécessaires au développement du poussin.

L'œuf est également un produit très répandu dans l'alimentation humaine. Il constitue une source équilibrée de protéines et de lipides, tout en étant peu énergétique (<100 kilocalories pour un œuf de 60 grammes). La valeur biologique des protéines de l'œuf a longtemps constitué la référence 100 pour l'alimentation humaine, du fait de sa digestibilité élevée et de son équilibre en acides aminés (OMS). De plus, l'Agence Canadienne d'inspection des aliments indique un coefficient d'efficacité protéique de 3,1 pour l'œuf, qui correspond à la valeur la plus élevée. L'œuf est donc un excellent aliment pour l'homme, qui renferme tous les acides aminés essentiels ne pouvant pas être synthétisés par l'organisme.

En 2018, 98% des Français consomment des œufs et 45 % en consomment plusieurs fois par semaine (source enquête CNPO/CSA, 2019). Un Français consomme en moyenne 220 œufs chaque année. En 2018, la production européenne d'œufs s'est élevée à 7,21 millions de tonnes, soit environ 116 milliards d'œufs. La France est le premier producteur d'œufs en Europe (12,3 % de la production européenne) avec 889 00 tonnes d'œufs, soit environ 14,3 milliards d'œufs en 2018 (source ITAVI). Actuellement, le mode de production de la filière œuf est en transition. La proportion des poules pondeuses françaises en élevages alternatifs est passée de 19 % en

2008 à 42,2 % en 2018, soit une augmentation d'un facteur 2 en 10 ans. Ainsi, les œufs issus de productions alternatives représentent plus de la moitié des œufs vendus en grande distribution (51,8%). Parmi ce pourcentage, 31,6 % sont des œufs de plein air, 17 % sont des œufs biologiques et 3,2 % sont des œufs issus de poules élevées au sol (source IRI, 2018).

La qualité sanitaire des œufs est primordiale pour garantir la sécurité alimentaire des consommateurs. En Europe, les œufs sont responsables d'environ 45 % des toxi-infections de type salmonellose, du fait de sa contamination à l'état cru (mayonnaise, sauces tièdes…). La contamination verticale d'un œuf étant extrêmement rare, il faut réduire le risque de contamination bactérienne horizontale après la ponte pour limiter le risque de toxi-infection alimentaire par l'œuf. Pour lutter contre les contaminations microbiennes, l'œuf possède deux types de défenses naturelles : une défense physique, assurée par la coquille et une défense chimique assurée par un arsenal de molécules antimicrobiennes majoritairement présentes dans le blanc d'œuf. Toutefois, pour éviter tout risque de contamination, les œufs dont la coquille est altérée sont déclassés. En conséquence, sur près de 14 milliards d'œufs produits en France chaque année, plus d'un milliard est déclassé pour défauts de coquille. Cela représente une perte économique conséquente pour la filière. Ainsi, la connaissance des défenses de l'œuf constitue un élément clef de la lutte contre les contaminations entrainant des risques sanitaires et des pertes économiques.

Pour mieux comprendre les systèmes de défenses de l'œuf et les améliorer, l'équipe « Défenses de l'Œuf, Valorisation et Evolution (DOVE) » coordonne et participe à des programmes de recherches nationaux et européens. Les objectifs de l'équipe sont d'élucider les mécanismes impliqués dans la formation de l'œuf et d'explorer la fonction des molécules de l'œuf. Pour cela, l'équipe organise ses recherches autour de deux grandes thématiques : 1) La caractérisation des structures et de la composition des œufs de table et à couver ; 2) La régulation et la variabilité de la qualité des œufs. Ce projet de doctorat s'intègre dans les thématiques de l'équipe DOVE, au sein de laquelle j'ai effectué ces 3 années de recherche. De manière plus globale, les enjeux de cette thèse s'insèrent dans les objectifs de l'unité mixte de recherche « Biologie des Oiseaux et Aviculture (BOA) », qui sont la production de connaissances dans les domaines de la physiologie et de la génétique et la contribution au développement de systèmes d'élevage durables.

Mon doctorat s'est focalisé sur la compréhension du mécanisme de formation de la coquille qui protège physiquement le contenu de l'œuf. La coquille d'œuf de poule est

composée de 95 % de minéral sous forme de calcite ($CaCO_3$), et de 3,5 % d'une matrice organique, qui en interagissant avec la phase minérale est responsable de la structure de la coquille qui lui confère ses propriétés mécaniques. De nombreuses études ont été établies pour identifier et caractériser les protéines de la matrice organique afin de mieux comprendre le mécanisme de biominéralisation de la coquille. Le développement des méthodes dites « Omiques » a permis d'identifier environ 900 protéines dans la coquille (Gautron *et al.* 2019). Afin de repérer les protéines les plus importantes du phénomène de biominéralisation, celles-ci ont été hiérarchisées aux différents stades du processus et leurs propriétés fonctionnelles ont été prédites dans une récente étude (Marie *et al.* 2015b). Parmi la vingtaine de protéines identifiées comme jouant un rôle clef dans le processus de minéralisation, seulement quelques-unes ont été explorées expérimentalement.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse a été de décrypter le rôle de deux protéines majeures du processus de biominéralisation de la coquille d'œuf, EGF-like repeats and discoidin-like domains 3 (EDIL3) et milk fat globule-EGF factor 8 (MFGE8), non étudiées vis-à-vis du processus de biominéralisation. Ces connaissances seront utiles pour mieux comprendre le processus de minéralisation de la coquille d'œuf et contribueront à l'optimisation du renforcement de son activité protectrice par voie génétique et/ou nutritionnelle. D'autre part, ces connaissances permettront d'améliorer la compréhension du mécanisme général de la biominéralisation, qui est un phénomène partagé par une multitude d'espèces. Enfin, ces recherches pourraient intéresser l'industrie des matériaux bioinspirés qui est un domaine en développement.

Afin de bien situer la problématique de cette thèse, une revue bibliographique est présentée à la suite de cette introduction générale. Dans cette revue bibliographique, la formation de l'œuf de poule et la structure de ce dernier sont tout d'abord décrites. Puis, les connaissances générales sur le phénomène de biominéralisation sont ensuite exposées, avant de se plonger dans le déroulement du processus de calcification de la coquille d'œuf. Une synthèse sur les protéines de la matrice organique qui contrôlent ce processus, et plus spécifiquement sur les protéines d'intérêts EDIL3 et MFGE8, est développée en dernier point. Après cette revue bibliographique, les résultats expérimentaux obtenus durant ce doctorat sont exposés (**Chapitres 1** et **2** de ce manuscrit) avant de les discuter et de les confronter aux travaux antérieurs afin d'émettre des hypothèses. Des perspectives de ce travail sont finalement proposées dans la dernière partie de ce manuscrit.

II. *Revue de la bibliographie*

« Il faut savoir avant que penser »

Proverbe du XVIème siècle

1. Formation de l'œuf de poule

L'œuf de poule est composé de trois compartiments principaux : le jaune (vitellus), le blanc (albumen) et la coquille (enveloppe protectrice) (**Figure 1**). Il est formé en deux phases distinctes au niveau de l'appareil reproducteur. Une première phase longue se déroule dans l'ovaire et correspond au dépôt du jaune. La seconde phase, plus courte (24 h), a lieu au niveau de l'oviducte qui assure le dépôt des autres constituants de l'œuf, après ovulation du jaune (**Figure 2**). La majorité des informations contenues dans cette partie proviennent de trois sources bibliographiques (Sauveur et De revier 1988, Nys *et al.* 2010, Nys et Guyot 2011). Les références supplémentaires mentionnées dans cette partie correspondent à des connaissances particulières non référencées dans les synthèses précédentes.

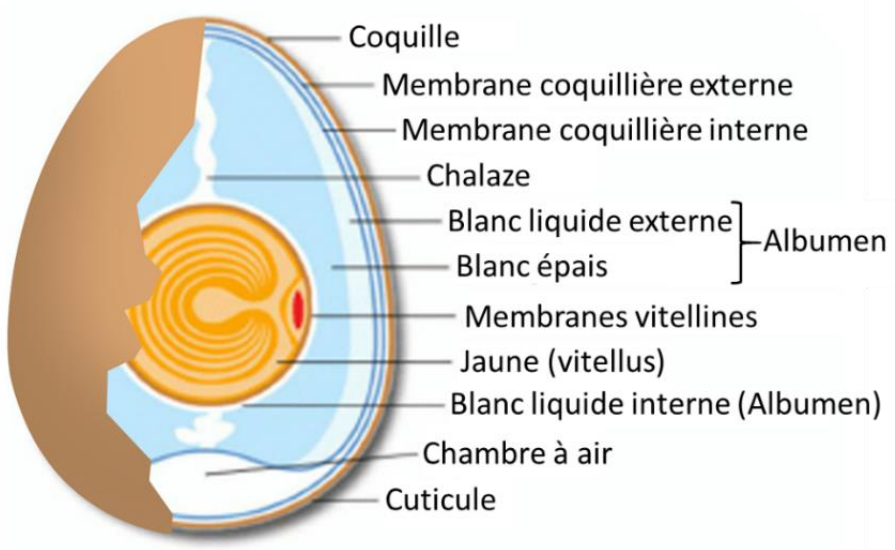


Figure 1. Les compartiments de l'œuf de poule. Adapté de (Horst 2007).

1.1. Le système reproducteur

Le système reproducteur des oiseaux femelles est composé de deux parties : les ovaires et l'oviducte. Au stade embryonnaire, deux ovaires sont initialement présents, mais seul le côté gauche de l'appareil reproducteur est développé chez la majorité des oiseaux, dont la poule. La **figure 2** illustre l'appareil reproducteur de la poule.

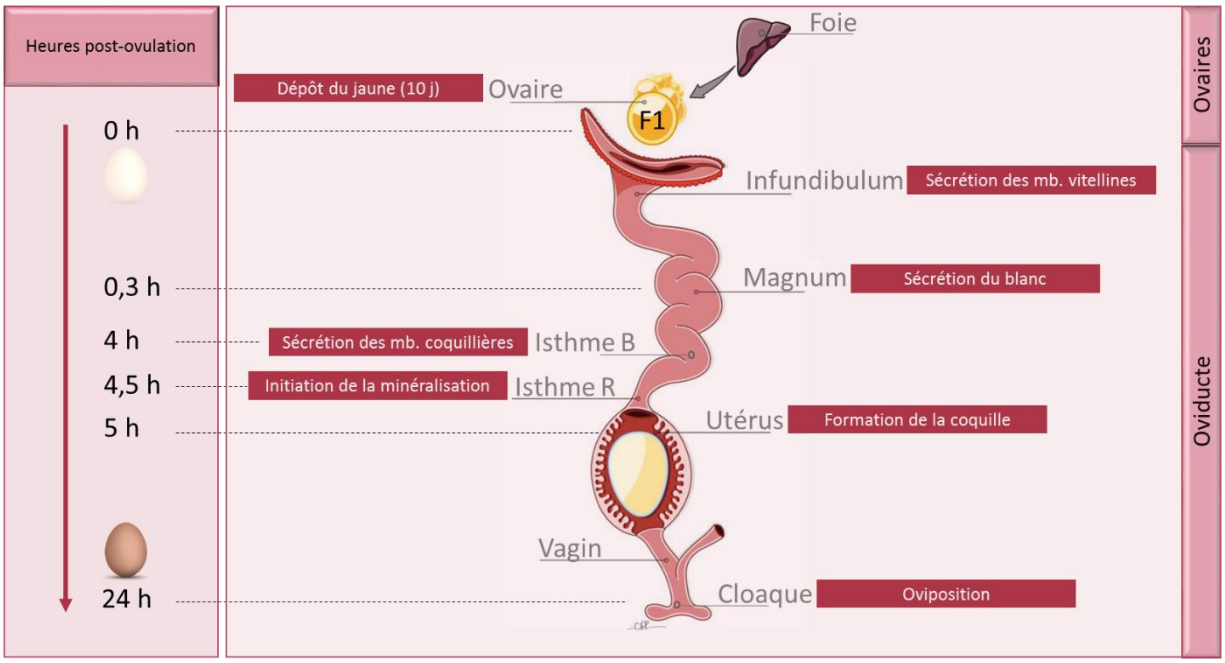


Figure 2. Représentation schématique de l'oviducte de poule et de la durée des phases de dépôts des différents constituants de l'œuf. Adapté de (Hincke *et al.* 2012).

Chez la poule mature, l'ovaire est localisé dans la partie supérieure de l'abdomen et correspond au site de formation du jaune. L'ovaire est un organe largement différencié qui assure deux rôles : la production de gamètes et la production d'hormones. Il est constitué de deux régions : la zone médullaire très vascularisée et l'enveloppe externe ou cortex. La zone corticale qui contient les follicules ovariens, est le siège de la folliculogénèse et de l'ovogénèse.

Chez la poule mature, l'oviducte est situé contre la paroi de l'abdomen et mesure environ 70 cm de long. C'est un organe composé de 5 segments qui assurent les dépôts successifs des autres constituants de l'œuf (des parties distales à proximales) : l'infundibulum, le magnum, l'isthme, l'utérus et le vagin. Lors de l'ovulation, l'infundibulum capte le jaune et sécrète les constituants de la membrane vitelline externe. Environ 20 minutes après l'ovulation, l'œuf atteint le magnum, dans lequel sont sécrétés les composants du blanc. L'œuf rejoint ensuite l'isthme blanc, 4 h après l'ovulation, où il acquiert ses membranes coquillières sur lesquelles va s'initier la minéralisation au niveau de l'isthme rouge (4 h 30 après l'ovulation). La suite de la minéralisation se déroule, entre 5 h et 22 h après l'ovulation, dans l'utérus de la poule et précède l'oviposition (ponte) qui a lieu environ 24 h après l'ovulation au niveau du cloaque. Les différents segments de l'oviducte présentent une même organisation en 7 couches distinctes (de la lumière vers l'extérieur) : un épithélium composé de 2 types cellulaires, les cellules ciliées et les cellules calciformes, une couche dite « *lamina propria* » qui contient des glandes

tubulaires pluricellulaires, une couche conjonctive interne, une couche de fibres musculaires longitudinales et une couche séreuse (**Figure 3**). Les couches musculaires assurent la circulation et la rotation de l'œuf dans l'oviducte.

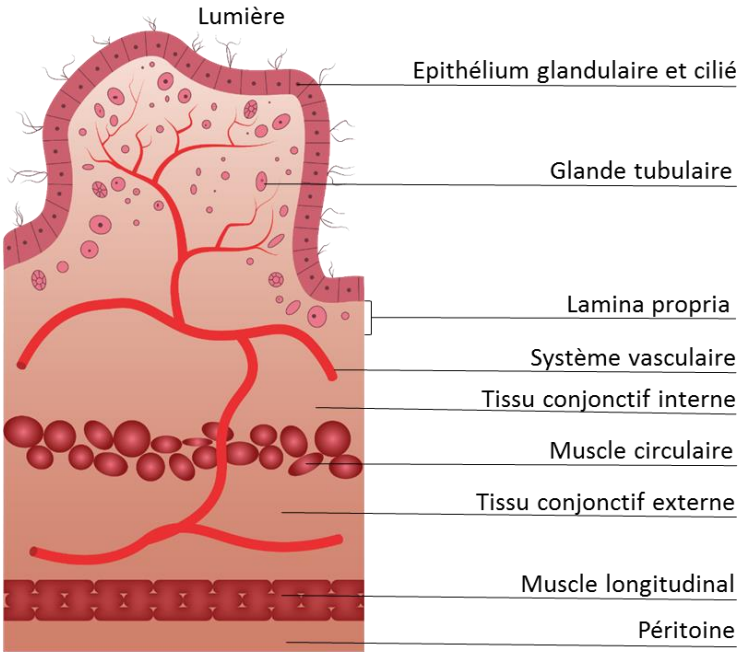


Figure 3. Représentation schématique d'une coupe longitudinale de l'oviducte de poule. Adapté de (Gilbert 1979).

1.2. Le jaune d'œuf

1.2.1. Synthèse du jaune d'œuf

A l'éclosion, le poussin femelle détient une réserve d'environ 12 000 ovocytes primaires au niveau de l'ovaire. Les ovocytes vont se développer en 3 phases pour devenir des follicules matures qui pourront être ovulés (**Figure 4**) (Rehault-Godbert et Guyot 2017). Seulement 2000 ovocytes primaires seront ovulés au cours de la vie de la poule (7 à 10 cycles de production).

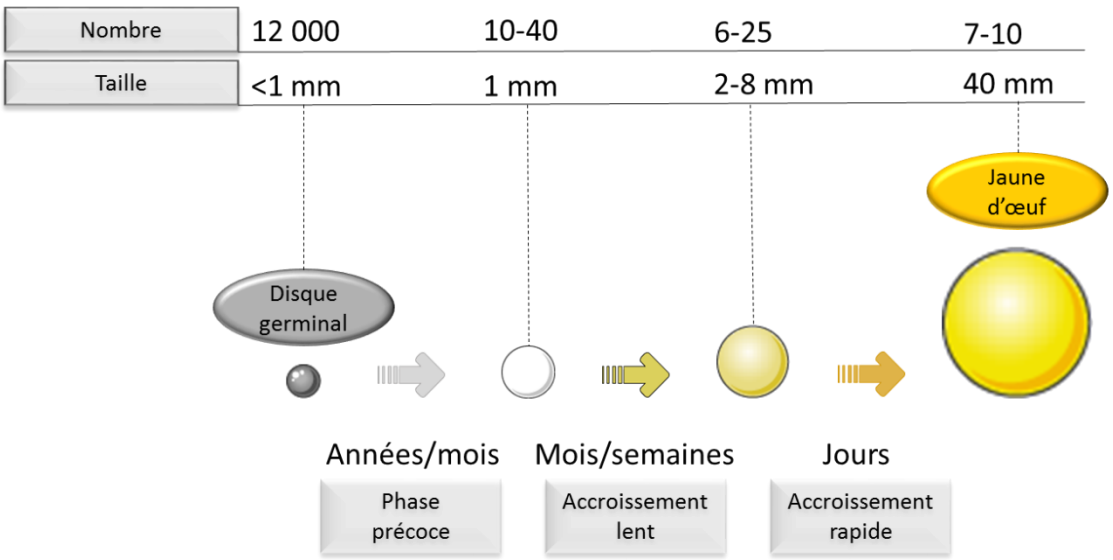


Figure 4. Développement des follicules avant l'ovulation chez la poule. Trois phases principales permettent la formation du jaune d'œuf qui est ovulé**.** Adapté de (Rehault-Godbert et Guyot 2017).

La première phase est une phase dite « précoce » qui concerne l'ensemble des ovocytes. Elle a lieu après l'éclosion et avant la maturité sexuelle (15-16 semaines chez la poule). Cette phase correspond à l'individualisation des ovocytes à travers la mise en place de l'épithélium folliculaire et une accumulation de protéines provenant de la granulosa ou du fluide périvitellin. La seconde phase est une phase d'accroissement lent sous contrôle hormonal. Après la maturité sexuelle, un nombre limité de follicules est sélectionné pour la seconde phase. Ils poursuivent leur développement par accumulation de composants protéiques et lipidiques qui entraine une augmentation du diamètre d'un facteur 4.

La troisième phase est une phase d'accroissement rapide, principalement déclenchée par la diminution de FSH (hormone folliculo-stimulante). Ainsi, à chaque cycle d'ovulation, un seul follicule est sélectionné pour rejoindre 7-10 follicules en phase de grand accroissement, déjà présents au niveau de l'ovaire. Le développement simultané des 7-10 follicules à des stades différents de croissance, permet une présence quasiment journalière, d'un seul follicule prêt à ovuler. Les follicules préovulatoires augmentent considérablement en taille durant les 6 à 14 jours précédant l'ovulation. Cet accroissement correspond à une accumulation de protéines et de lipides qui composent le jaune d'œuf (98 %). La majorité des composants du jaune est synthétisée au niveau du foie puis transférée par le réseau sanguin jusqu'à l'ovaire. Ces composants pénètrent dans le jaune *via* un mécanisme d'endocytose à sa surface (Noble et Cocchi 1990). Ce dépôt est interrompu 2-3 h avant l'ovulation. Quelques heures avant l'ovulation, une reprise de méiose est déclenchée par une décharge ovulante de LH (Luteinizing

Hormone) sous contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'ovulation du follicule mature (jaune) a lieu quotidiennement. Elle se produit 15 à 45 min après l'oviposition de l'œuf précédent. Le follicule ovulé est capté par l'oviducte où les autres constituants de l'œuf vont être déposés au niveau des différents segments de cet organe.

1.2.2. Composition du jaune d'œuf

Le jaune d'œuf représente 29 % du poids de l'œuf total. Le jaune est composé de 48 % d'eau, 34 % de lipides, 16 % de protéines, 1,5 % de minéraux, 1,5 % de vitamines et 0,5 % de glucide (**Figure 5**). Les triglycérides (65 %) représentent la majorité des lipides mais le jaune contient également des phospholipides (31 %) et du cholestérol (4 %). Tous les lipides du jaune sont associés à des protéines, formant ainsi des lipoprotéines. Ces lipoprotéines sont synthétisées dans le foie, puis transportées vers l'ovaire principalement sous forme de vittelogénine et de lipoprotéines de très basse densité (VLDL).

Composants	Coquille	Blanc	M.vitelline	Jaune
Minéraux	**95 %**	0,5 %	0,6 %	1,5 %
Protéines	3,5 %	10,5 %	**81,6 %**	16 %
Lipides	<0,1 %	0,1 %	1,3%	**34 %**
Glucides	<0,1 %	0,8 %	6,5 %	0,5 %
H_2O	1,5 %	**88,1 %**	10 %	48 %

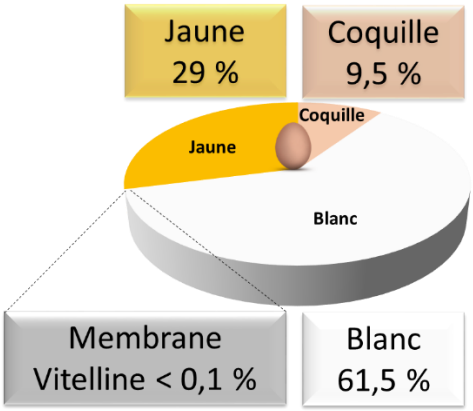


Figure 5. Composition des différents compartiments de l'œuf. Le tableau de gauche indique les compositions des différents compartiments de l'œuf. Le diagramme de droite représente les proportions (poids moyens) des différents compartiments de l'œuf. (Li-Chan et Kim 2008, Chung *et al.* 2010, Guérin-Dubiard *et al.* 2010)

Deux fractions du jaune peuvent être discernables lors d'une centrifugation : le plasma (≈78 %), correspondant au surnageant, et la fraction granulaire (≈22 %), correspondant au précipité (Li-Chan et Kim 2008). Le jaune contient 68 % de lipoprotéines de basse densité (LDL), 16 % de lipoprotéines de haute densité (HDL), 10 % de livetines et autres protéines solubles et 4 % de phosvitines (Rehault-Godbert *et al.* 2019). Dans le plasma, les protéines

majoritairement identifiées sont l'albumine sérique (α-livetine), l'α-2 macroglobuline (β-livetine) et l'immunoglobuline Y (γ-livetine). Dans la fraction granulaire, on retrouve principalement des lipoprotéines de haute densité (HDL) comme les lipovitellines et des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) comme les apoprotéines.

Deux études de protéomique ont permis d'identifier près de 230 protéines dans le jaune (Mann et Mann 2008, Farinazzo *et al.* 2009, Gautron *et al.* 2019). Parmi celles-ci, les protéines les plus abondantes sont : l'apolipoprotéine B, l'apovitellenin-1, les vitellogenines, l'albumine sérique, les immunoglobulines, l'ovalbumine et l'ovotransferrine (Rehault-Godbert *et al.* 2019). Ces protéines représentent 80 % de l'ensemble des protéines du jaune d'œuf (Rehault-Godbert *et al.* 2019). En plus de ces protéines majeures, des protéines de liaison aux vitamines, des protéases, des inhibiteurs de protéases et des protéines sériques ont également été identifiées (Mann et Mann 2008).

1.2.3. Fonction du jaune d'œuf

Le jaune d'œuf fournit les nutriments et l'énergie nécessaire lors du développement embryonnaire et au cours des premiers jours qui suivent l'éclosion.

En surface du jaune, le gamète femelle est localisé au niveau du disque germinatif. Lors de la fécondation des oiseaux, plusieurs spermatozoïdes peuvent pénétrer dans le disque germinatif. Ce phénomène de polyspermie est physiologique chez les oiseaux. Au cours de la réaction acrosomique, les spermatozoïdes hydrolysent la membrane vitelline qui entoure le jaune.

1.3. La membrane vitelline

1.3.1. Synthèse de la membrane vitelline

La membrane vitelline est constituée de deux couches périphériques séparées par une couche médiane continue difficilement dissociable.

La couche interne (membrane vitelline interne) qui entoure le jaune est sécrétée au niveau de l'ovaire par les cellules de la granulosa (Bellairs *et al.* 1963). La couche externe et la couche médiane vont être déposées pendant 20 min, au niveau de l'infundibulum qui capte le jaune ovulé. Ce segment distal de l'oviducte est également le lieu d'une éventuelle fécondation.

1.3.2. Composition de la membrane vitelline

La membrane vitelline représente moins de 0,05 % du poids de l'œuf total. D'une épaisseur de 10 µm, cette membrane est constituée de 81,6 % de protéines, 10 % d'eau, 6,5 % de glucide, 1,3 % de lipides et 0,6 % de minéraux (**Figure 5**) (Chung *et al.* 2010). La couche interne et la couche externe de la membrane vitelline constituent des réseaux de fibres

protéiques.

Une étude de protéomique sur la membrane vitelline totale a permis d'identifier 137 protéines (Mann 2008). Parmi celles-ci, les protéines majoritairement identifiées sont : l'ovalbumine, le lysozyme, la protéine Vitelline Outer Membrane I (VMOI) et la protéine Vitelline Outer Membrane II (VMOII ou AvBD11). La membrane vitelline interne contient principalement des protéines de la zone pellucide (ZP) (Waclawek *et al.* 1998, Takeuchi *et al.* 1999, Okumura *et al.* 2004) et la membrane vitelline externe est composée majoritairement d'ovomucine, de lysozyme, et de VMOI (Kido et Doi 1988).

1.3.3. Fonction de la membrane vitelline

Cette enveloppe protéique sépare physiquement le jaune du blanc. La membrane vitelline interne, principalement composée de protéine ZP, est le site d'une éventuelle fécondation et participe à l'adhésion des spermatozoïdes à l'ovocyte (Waclawek *et al.* 1998, Takeuchi *et al.* 1999, Okumura *et al.* 2004). La membrane vitelline assure également une protection physique et chimique (lysozyme et VMOI : fonction antimicrobienne) de l'ovocyte fertilisé en empêchant les pathogènes d'atteindre le jaune.

1.4. Le blanc d'œuf

1.4.1 Synthèse du blanc d'œuf

Vingt minutes après l'ovulation, l'œuf en formation atteint le plus grand segment de l'oviducte, le magnum (35 cm). C'est la région de l'oviducte avec le plus grand nombre de cellules sécrétrices et le lieu de synthèse de l'ensemble des protéines du blanc. Les cellules sécrétrices contiennent une grande quantité de matériel protéique stocké dans des granules et libéré au passage de l'œuf. Ces granules, générés par l'appareil de Golgi, englobent les protéines dans une membrane trilamélaire. Les granules fusionnent ensuite avec la membrane des cellules afin d'être extrudés pour libérer les protéines vers la lumière du tissu. La production des protéines du blanc est sous contrôle des hormones stéroïdiennes (œstrogène et progestérone) qui agissent sur les gènes des protéines du blanc (Palmiter 1972). L'ensemble des protéines du blanc sera accumulé pendant 3 h 30. A ce stade, le blanc est peu hydraté et correspond à une masse de protéines gélifiée. Le phénomène d'hydration du blanc (plumping) aura lieu pendant les 6-7 h premières heures du passage de l'œuf dans l'utérus. Ainsi, la teneur en eau du blanc sera doublée et l'œuf acquerra sa forme ovoïde définitive.

1.4.2 Composition du blanc d'œuf

Le blanc d'œuf représente 61,5 % du poids de l'œuf total. Le blanc d'œuf est composé à 88,1 % d'eau, 10,5 % de protéines, 0,8 % de glucides, 0,5 % de minéraux et 0,1 % de lipides (**Figure 5**). Le blanc d'œuf peut se décomposer en quatre structures distinctes (Gilbert 1971) (**Figure 1**):

- Le blanc liquide interne situé entre le blanc épais et le jaune (17 %)
- Le blanc épais attaché aux deux extrémités de l'œuf (57 %)
- Le blanc liquide externe situé au contact des membrane coquillières (23 %)
- Les chalazes, deux spirales situées entre les membranes coquillières et le jaune assurent la suspension de ce dernier au milieu de l'œuf (3 %).

C'est l'enrichissement d'une protéine, l'ovomucine, qui est responsable de la texture « gélifiée » du blanc épais et des chalazes. En effet, cette protéine est quatre fois plus abondante dans le blanc épais par comparaison avec le blanc liquide (Anton *et al.* 2010).

Plusieurs études ont permis l'identification de 273 protéines dans le blanc d'œuf (Mann 2007, D'Ambrosio *et al.* 2008, Li-Chan et Kim 2008, Mann et Mann 2011, Omana *et al.* 2011, Liu *et al.* 2013a, Qiu *et al.* 2013, Gautron *et al.* 2019). Les protéines majoritairement identifiées sont : l'ovalbumine, l'ovotransferrine, SPINK7, l'ovoglobuline G2, l'ovomucine, le lysozyme, l'ovoinhibiteur et l'ovoglycoprotéine. En complément des protéines majeures, le blanc contient également de nombreuses protéines présentant des activités antimicrobiennes ou d'inhibition de protéases.

1.4.3. Fonction du blanc d'œuf

Le blanc d'œuf assure deux fonctions principales dans l'œuf. Il correspond tout d'abord à une réserve nutritive lors du développement extra-utérin de l'embryon. Il assure également une défense chimique contre les agents pathogènes *via* de nombreuses protéines aux propriétés antimicrobiennes. Les activités antimicrobiennes des protéines du blanc peuvent être classées en 4 catégories : la privation de vitamines et minéraux nécessaire à la croissance microbienne, la dégradation directe des pathogènes, l'inhibition de protéases bactériennes impliquées dans l'invasion pathogène et la diminution de l'adhésion des agents microbiens (Rehault-Godbert *et al.* 2010, Bourin *et al.* 2011, Guyot *et al.* 2016).

1.5. La coquille d'œuf

1.5.1 Synthèse de la coquille d'œuf

Environ 4 h après l'ovulation, l'œuf en formation atteint l'isthme blanc où les membranes coquillières sont déposées. Ces membranes sont des réseaux de fibres protéiques sur lesquelles, au niveau de l'isthme rouge (4 h 30 après l'ovulation), se déposent des noyaux mamillaires, sièges protéiques de l'initiation de la minéralisation. L'œuf atteint l'utérus 5 h après l'ovulation et pour une durée d'environ 19h, pendant laquelle se déroule la minéralisation de la coquille. La muqueuse utérine est composée de nombreuses invaginations recouvertes d'un épithélium de surface, parsemé de glandes tubulaires responsables de la sécrétion des constituants de la coquille. Tout au long de la formation de la coquille, le fluide utérin baigne l'œuf (Gautron *et al.* 1997, Nys *et al.* 2004, Nys et Gautron 2007). Lorsque la formation de la coquille est terminée, l'œuf transite par le vagin avant de rejoindre le cloaque où il est expulsé de l'oviducte environ 24 h après l'ovulation du jaune. L'expulsion résulte d'une contraction des muscles de l'utérus et une relaxation du vagin (Saito et Shimada 1988).

1.5.2. Composition de la coquille d'œuf

La coquille représente 9,5 % du poids de l'œuf total. Elle est composée de 95 % de carbonate de calcium sous forme de calcite, de 3,5 % de matière organique (protéines, protéoglycanes…) et de 1,5 % d'eau (**Figure 5**) (Hamilton 1986, Nys *et al.* 2001, Nys *et al.* 2004, Nys *et al.* 2010, Gautron *et al.* 2019). La coquille contient 37,5 % de calcium et 58 % de bicarbonates. L'élément phosphore est également présent dans la coquille et principalement au niveau de la partie supérieure de la couche calcifiée et dans la cuticule. D'autres minéraux (magnésium, manganèse, cuivre et zinc) sont aussi retrouvés à des concentrations faibles dans la coquille.

La coquille peut se diviser en 5 couches principales (de l'intérieur vers l'extérieur): les membranes coquillières, la couche mamillaire, la couche palissadique, la couche de cristaux verticaux et la cuticule (**Figure 6**) (Nys *et al.* 2001). En outre, la coquille est traversée d'environ 10 000 pores qui correspondent à des régions non-minéralisées.

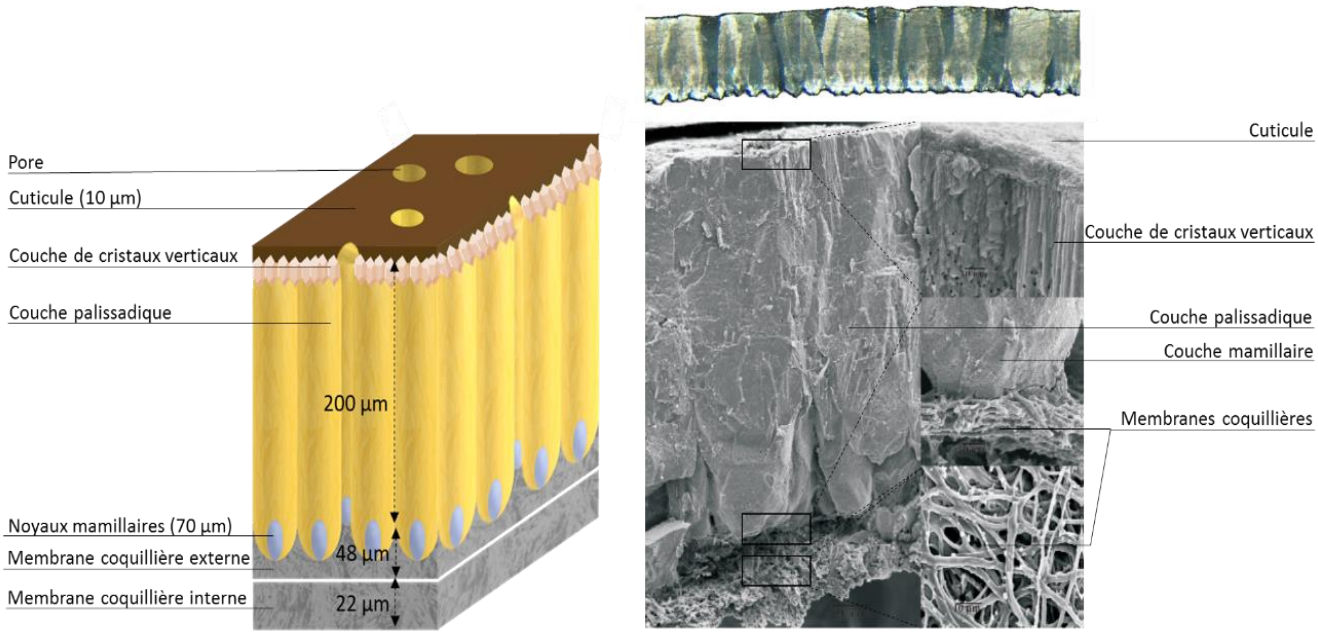


Figure 6. Structure de la coquille d'œuf de poule. L'image de gauche correspond à une représentation schématique. La microphotographie en haut à droite correspond à une observation en microscopie optique à lumière polarisée. La microphotographie en bas à droite correspond à une observation en microscopie électronique à balayage. Adapté de (Nys *et al.* 2001).

Plusieurs études de protéomique ont permis d'identifier 904 protéines dans la coquille (Gautron 2019). Les protéines majoritairement retrouvées sont : l'albumine sérique, l'ovalbumine, le lysozyme, EDIL3, l'ovotransferrine, l'ovocleidine-116, l'ovocleidine-17, l'ovocalyxine-21, et l'ovocalyxine-32 (Mann *et al.* 2006, Marie *et al.* 2015b). Des informations complémentaires concernant la composition protéique de la coquille seront détaillées dans la partie 2 de cette synthèse bibliographique.

1.5.3. Fonction de la coquille d'œuf

La coquille d'œuf calcifiée est apparue au moment de la divergence entre les amphibiens (œufs non calcifiés) et les reptiles (œufs calcifiés), il y a environ 350 million d'années (Romer 1957, Packard et Seymour 1997). Ainsi, la coquille calcifiée a permis l'affranchissement total du milieu aquatique en permettant un développement embryonnaire sur terre, dans une chambre close et aqueuse.

La coquille d'œuf permet un développement harmonieux de l'embryon des oiseaux en assurant 3 rôles majeurs :

- Elle assure les échanges d'eau et de gaz avec l'extérieur *via* les pores. Elle permet ainsi, l'entrée de l'oxygène, l'évacuation du gaz carbonique et le maintien de l'humidité.

- Elle est la première barrière physique de l'œuf et protège ce dernier contre les agressions physiques et microbiennes.
- Elle fournit le calcium nécessaire au développement du squelette de l'embryon (Freeman et Vince 1974, Hincke *et al.* 2019).

2. Structure et propriétés mécaniques de la coquille d'œuf

La coquille d'œuf est une céramique poreuse, épaisse de 0,3 mm, formée à basse température. Son organisation et sa microstructure lui confèrent des propriétés mécaniques remarquables, lui permettant ainsi d'assurer sa fonction de défense physique de l'œuf.

2.1. Ultrastructure de la coquille

2.1.1. Les membranes coquillières

Les membranes coquillières sont sécrétées 4 h après l'ovulation du jaune par les glandes tubulaires de l'isthme blanc (Leach et Roland 1982, Nys *et al.* 1999). La partie organique de ces membranes est constituée de 95 % de protéines, de 3 % de lipides et de 2 % de glucides. Elles constituent un réseau de fibres protéiques qui assure la séparation entre le blanc et la coquille. Les membranes coquillières sont composées d'une couche interne (22 µm d'épaisseur), au contact du blanc, et d'une couche externe plus épaisse (48 µm d'épaisseur). Les deux membranes sont accolées, excepté au niveau de la chambre à air où elles sont dissociées. La couche externe est le support de la mise en place de la couche calcifiée (Solomon 2010). En effet, un traitement pharmacologique altérant la synthèse des fibres des membranes coquillières perturbe considérablement la minéralisation et ainsi l'organisation structurale de la coquille (Chowdhury 1990).

Les fibres des membranes sont constituées d'un cœur central entouré d'un manteau carbohydraté. Les fibres de la membrane interne sont plus fines (0,5 nm d'épaisseur) que celles de la membrane externe (0,8 nm d'épaisseur) (Nys et Guyot 2011). Le matériel fibreux a tout d'abord été identifié comme de « l'ovokératine ». Cependant, les résultats d'études postérieures n'ont pas corroboré cette hypothèse (Leach et Roland 1982, Chowdhury 1990). La présence d'élastine a été proposée *via* l'identification de desmosine et isodesmosine, mais celle-ci n'a pas été validée avec la faible concentration en glycine reportée (Chowdhury 1990). La présence de collagène a ensuite été proposée par la mise en évidence d'hydroxyproline. Des analyses immunohistochimiques avec des anticorps polyclonaux dirigés contre le collagène de type I, V

et X ont finalement permis de confirmer la nature en partie collagénique des membranes (Wong *et al.* 1984, Arias *et al.* 1997, Wang *et al.* 2002). Le collagène de type X jouerait un rôle d'inhibiteur de la minéralisation en limitant la calcification de la coquille dans les membranes. En effet, la digestion *in vitro* de ce collagène conduit à la minéralisation des membranes (Arias *et al.* 1997, Wang *et al.* 2002). Toutefois, la composition en acides aminés des membranes diffère des tissus collagéniques. Les membranes sont constituées de 70-75 % de protéines fibreuses contenant des pontages dérivés de la lysine, de 10 % de collagènes et de glycoprotéines (Wang *et al.* 2002, Hincke *et al.* 2011). Plus récemment, une protéine riche en cystéines (CREMP) a été identifiée (Kodali *et al.* 2011). En 2017, 472 protéines ont été identifiées par analyse protéomique des membranes coquillières, dont plus de 150 spécifiques des membranes et non identifiées dans les autres compartiments de l'œuf (Ahmed *et al.* 2017).

2.1.2. La couche mamillaire

La couche mamillaire, de 70 µm d'épaisseur, est la partie calcifiée la plus interne (Guérin-Dubiard *et al.* 2010). La base de cette couche est composée de noyaux mamillaires. Ce sont des amas organiques déposés au niveau de l'isthme rouge, 4 h 30 après l'ovulation du jaune. Ils correspondent aux sites de nucléation des premiers cristaux de carbonate de calcium (Fernandez *et al.* 1997). La répartition des amas organiques en surface des membranes coquillières est sous contrôle génétique et varie selon les espèces (Nys *et al.* 2010).

La composition organique des noyaux mamillaires est peu connue. La présence de mucopolysaccharides, d'hexosamides, d'hexoses et d'acide sialique a d'abord été rapportée (Arias *et al.* 1993). D'autres études ont ensuite montré la présence d'un protéoglycane à kératane sulfate qui jouerait un rôle important pendant les premiers évènements de nucléation (Arias et Fernandez 2001, Fernandez *et al.* 2001, Arias et Fernandez 2008). En plus de sa localisation sur les sites de nucléation, sa sécrétion (≈ 5h après l'ovulation) coïncide avec l'étape de formation des noyaux mamillaires (Arias et Fernandez 2001, Fernandez *et al.* 2001). Ainsi, la résistance de la coquille d'œuf est corrélée à la teneur en kératane sulfate des noyaux mamillaires (Ha *et al.* 2007).

Entre 5 h et 10 h après l'ovulation, les cristaux de calcite formés sur les noyaux mamillaires acquièrent une morphologie allongée sous l'action de la matrice organique (Rodriguez-Navarro et Garcia-Ruiz 2000). Une structure en forme de cônes ou mamelons, caractéristique de la couche mamillaire est ainsi formée. Cette région située au-dessus des noyaux mamillaires est également composée de structures vésiculaires d'un diamètre d'environ 300 nm (Dennis *et al.* 1996).

2.1.3 La couche palissadique

La couche palissadique, épaisse de 200 µm, représente les 2/3 de l'épaisseur de la coquille (Nys *et al.* 2004, Nys et Gautron 2007, Hincke *et al.* 2012). Elle est formée par la fusion des cônes adjacents issus de la couche mamillaire entre 10 et 22 h après l'ovulation. L'absence de fusion de certains cônes entraine l'apparition de pores qui traversent la coquille de part en part (Nys *et al.* 2004). Les pores ainsi formés (≈10 µm de large au plus étroit) permettent les échanges gazeux essentiels entre l'embryon et le milieu extérieur (Nys *et al.* 2010). La couche palissadique correspond donc à une couche compacte de carbonate de calcium, associée à une phase organique.

2.1.4. La couche des cristaux verticaux

La couche de cristaux verticaux annonce la fin de la minéralisation. D'une épaisseur inférieure à 10 µm, elle est située entre la couche palissadique et la cuticule et correspond à la dernière couche calcifiée de la coquille (Nys *et al.* 2004, Hincke *et al.* 2012). Cette fine couche est essentiellement composée de cristaux de calcite adjacents et orientés perpendiculairement à la surface de l'œuf (Nys *et al.* 2010).

2.1.5. La cuticule

La dernière couche, déposée à la surface de la coquille, est la cuticule. Elle est principalement constituée de matière organique (90 % de protéines et protéoglycanes, 5 % de sucres, 3 % de minéraux et d'une faible quantité de lipides) et correspond à la couche la plus externe de la coquille (Nys *et al.* 2010). Cette couche de 10 µm est déposée environ 1 h 30 avant l'oviposition (Nys *et al.* 2004, Nys et Guyot 2011). Elle recouvre entièrement la surface de la coquille de manière à obstruer les pores et préserver ainsi l'intérieur de l'œuf de toute pénétration microbienne. Au moment de la ponte, cette couche mince va sécher et se fissurer de manière à autoriser les échanges gazeux aux niveaux des pores (Nys et Guyot 2011). Les pigments (protoporphyrines) sont majoritairement sécrétés dans la cuticule et donne la couleur aux coquilles brunes (Nys *et al.* 1991). C'est également l'unique région de la coquille contenant du phosphate de calcium sous forme d'hydroxyapatite (Dennis *et al.* 1996). Celui-ci pourrait participer à l'arrêt de la minéralisation puisque les composants phosphorés constituent un « inhibiteur » pour la minéralisation des carbonates de calcium (Lin et Singer 2005).

Rodriguez-Navarro et collaborateurs ont utilisé différentes techniques analytiques pour explorer les changements dans la cuticule en fonction de l'âge des poules et de la fraîcheur de l'œuf (Rodriguez-Navarro *et al.* 2013). Ils ont trouvé que la composition, l'épaisseur et le degré de recouvrement de la cuticule étaient fortement dépendants de ces deux variables. En effet,

durant la première année de ponte, l'épaisseur et le degré de glycosylation de la cuticule décroit avec l'âge. De plus, à la fin de la période de ponte, la composition en lipides de la cuticule diminue significativement. Les résultats indiquent également une diminution de l'humidité de la cuticule en fonction de la fraîcheur de l'œuf qui entraine une modification de composition (polysaccharides, sulfates, amides).

2.2. Microstructure et propriétés mécaniques de la coquille

La quantité de matériaux en lien avec l'épaisseur de la coquille est un paramètre prépondérant de la qualité de la coquille. Sa capacité de résistance à la rupture diminue quand l'épaisseur de la coquille est plus faible (Nys *et al.* 2010). Toutefois, l'épaisseur et la densité ne représentent pas plus de 60 % des différences de solidité observées (Richards et Swanson 1965, Rodriguez-Navarro *et al.* 2002). La microstructure de la coquille (taille/forme des cristaux et leurs orientations cristallographiques) influence également sa solidité (Nys *et al.* 1999, Rodriguez-Navarro *et al.* 2002).

2.2.1 Méthodes d'analyses de la microstructure de la coquille

Les premières études rapportant des données sur la microstructure de la coquille étaient basées sur des techniques de microscopie optique (lumière polarisée), de microscopie électronique et de diffraction aux rayons-X conventionnelle (Panheleux *et al.* 1999a, Rodriguez-Navarro *et al.* 2002, Ahmed *et al.* 2005, Hincke *et al.* 2011). Afin d'obtenir des informations quantitatives sur la micro-organisation de la coquille, des techniques plus précises et plus rapides de diffraction aux rayons-X en deux dimensions (2D-XRD) ont été mises au point (Rodriguez-Navarro 2007, Rodriguez-Navarro *et al.* 2007). Pour ces analyses, un diffractomètre à rayons-X est utilisé (**Figure 7A**). Le profil de diffraction d'un échantillon poly-cristallin comme la coquille conduit à l'observation de taches le long d'anneaux produits par des cristaux individuels. En effet, seuls les cristaux dont les directions cristallographiques *hkl* sont orientés selon les conditions de la loi de Bragg seront diffractés (cristaux 1 et 2 sur **Figure 7B**). L'intensité des « taches » composant les cercles *hkl* est proportionnelle à la taille des cristaux diffractés (Rodriguez-Navarro *et al*. 2007). Par exemple, sur la **figure 7B**, le cristal numéro 2 engendre une « tache » de diffraction d'intensité supérieure à celle du cristal 1. Le profil de diffraction est donc généré à partir des variations d'intensité *hkl* enregistrées par le détecteur (**Figure 7**). À partir du profil de diffraction obtenu, la taille et l'orientation des cristaux peuvent ainsi être déterminées automatiquement *via* un logiciel spécifique.

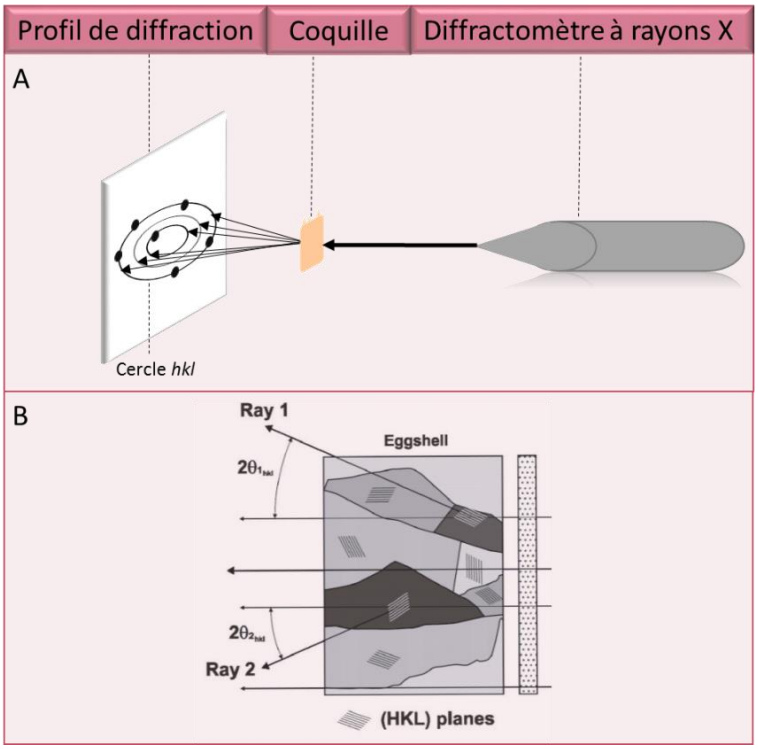


Figure 7. Analyse de la microstructure de la coquille par diffraction aux rayons-X. A. Représentation schématique de la méthodologie. **B.** Représentation schématique de la diffraction des cristaux. Adapté de (Rodriguez-Navarro *et al.* 2007).

2.2.2. Influence de la microstructure sur les propriétés mécaniques de la coquille

La microstructure de la coquille varie significativement, même entre des œufs provenant d'espèces identiques. La taille, la forme et l'orientation des cristaux influencent fortement les capacités mécaniques de la coquille. Des cristaux de taille et de forme anormales engendrent une diminution de la solidité de coquille (Rodriguez-Navarro *et al.* 2002, Ahmed *et al.* 2005, Hincke *et al.* 2011).

L'orientation préférentielle des colonnes de cristaux a également une influence importante sur les capacités de résistance de la coquille. Les colonnes de cristaux de calcite qui composent la coquille sont préférentiellement orientées selon leur axe-*c*, perpendiculaire à la surface de la coquille (**Figure 8**) (Rodriguez-Navarro 2007, Nys *et al.* 2010). La réduction de plans de clivage, liée à l'absence de direction privilégiée des cristaux tend à augmenter la solidité de la coquille. Ainsi, plus les cristaux seront orientés, moins les capacités mécaniques de la coquille seront importantes (Rodriguez-Navarro *et al.* 2002, Nys *et al.* 2010, Nys et Guyot 2011).

Selon les espèces, l'orientation des colonnes de cristaux est plus ou moins prononcée. Par exemple, les coquilles d'œuf de poule, d'autruche, de vautour, de dinde et de caille exposent des orientations cristallines beaucoup plus marquées que celle des coquilles de pintade, de canard ou d'oie (Panheleux *et al.* 1999b, Rodriguez-Navarro 2007, Rodriguez-Navarro *et al.* 2007, Nys *et al.* 2010).

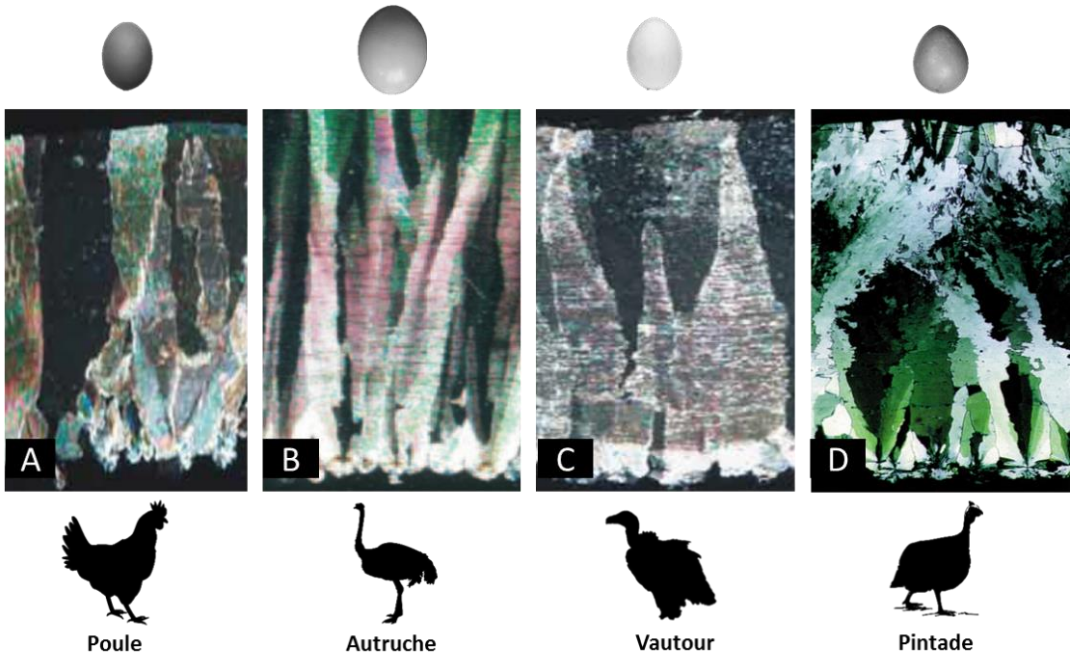


Figure 8. Orientations cristallines des coquilles d'œufs de 4 espèces aviaires observées en microscopie optique à lumière polarisée. A. poule, **B.** autruche, **C.** vautour, **D.** pintade. (Panheleux *et al.* 1999b, Rodriguez-Navarro 2007, Le Roy *et al.* 2018).

À quantité égale de coquille, la pintade possède des capacités de résistance à la rupture particulièrement importantes par comparaison aux autres espèces (**Figure 9**) (Petersen et Tyler 1966, Panheleux *et al.* 1999b). Ces propriétés résultent d'une texture spécifique et très particulière au sein de laquelle les colonnes de cristaux s'entrelacent dans la partie supérieure de la couche palissadique.

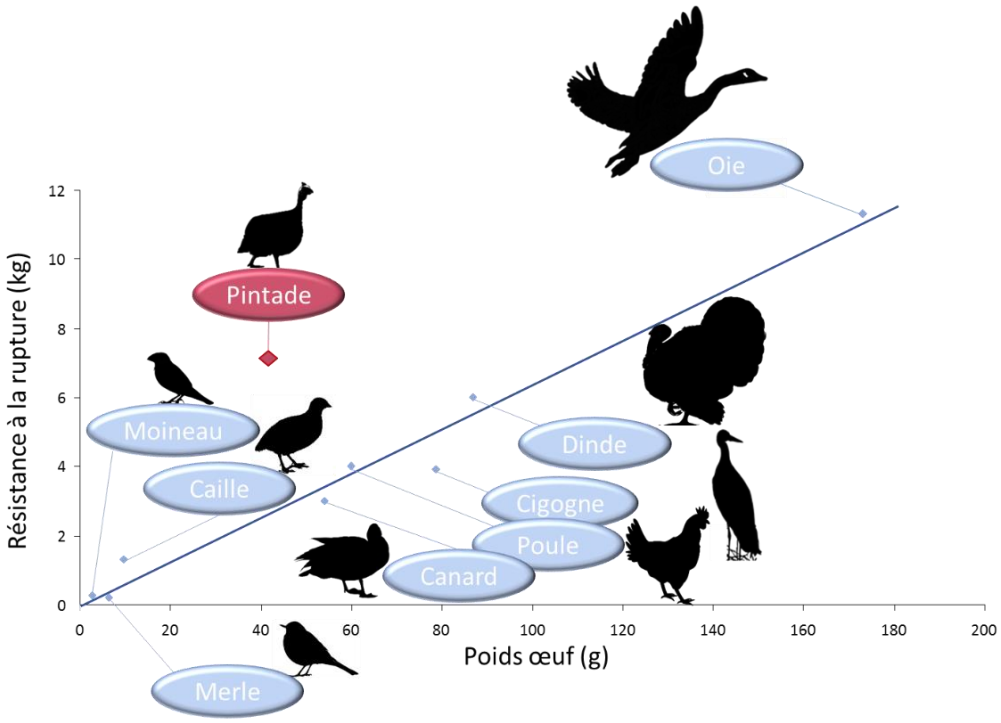


Figure 9. Résistance à la rupture (kg) en fonction du poids de l'œuf (g) de différentes espèces d'oiseaux. Adapté de (Ar *et al.* 1979, Gautron 2017b, Le Roy *et al.* 2018).

La coquille d'œuf de poule résiste à 3-4 kg de pression statique, équivalent à 30-40 N (Nys *et al.* 2004, Guérin-Dubiard *et al.* 2010, Nys *et al.* 2010, Hincke *et al.* 2011). Plusieurs variables sont directement corrélées à la microstructure de la coquille et aux propriétés mécaniques qui en résultent (De Ketelaere *et al.* 2002, Solomon 2010, Hincke *et al.* 2011). Les ressources en calcium dont disposent la poule influencent la qualité des coquilles et des os de la poule pondeuse. Le calcium assimilé par la poule *via* son alimentation est stocké au niveau des cavités de la moelle osseuse des os longs et forme les os médullaires des oiseaux. Ces os labiles qui exposent une forte activité de résorption fournissent environ 40 % du calcium de la coquille (Fleming 2008, Nys *et al.* 2010). Le renouvellement osseux et la formation de la coquille sont ainsi assurés de manière asynchrone. A l'exception de certaines productions familiales, la nutrition optimisée des poules assure un approvisionnement constant et suffisant en calcium et ce facteur n'influence pas la qualité de coquille dans les différents élevages (cages, sol, plein air ou bio). Ce facteur est donc parfaitement maîtrisé et n'est pas limitant actuellement.

Un des facteurs prépondérants de la qualité de coquille est la génétique qui a abouti, après des années de sélection, à un doublement des propriétés mécaniques de la coquille d'œufs issus de poules pondeuses. Un autre facteur prépondérant influençant les propriétés mécaniques est l'âge de la poule. La solidité de la coquille diminue avec l'âge de la poule (Rodriguez-Navarro

et al. 2002). Cette diminution est la conséquence d'une réduction de l'épaisseur de la coquille d'une part et d'une modification de la texture cristallographique d'autre part (**Figure 10**) (Rodriguez-Navarro *et al.* 2002). Avec l'âge, le poids de l'œuf augmente, tout en conservant la même quantité de coquille. De ce fait, le pourcentage de coquille diminue engendrant une diminution de la quantité de coquille par unité de surface (Travel *et al.* 2010). Les coquilles d'œufs de poules âgées se caractérisent également par un degré d'orientation cristalline plus marqué favorisant ainsi l'apparition des plans de clivage (Rodriguez-Navarro *et al.* 2002).

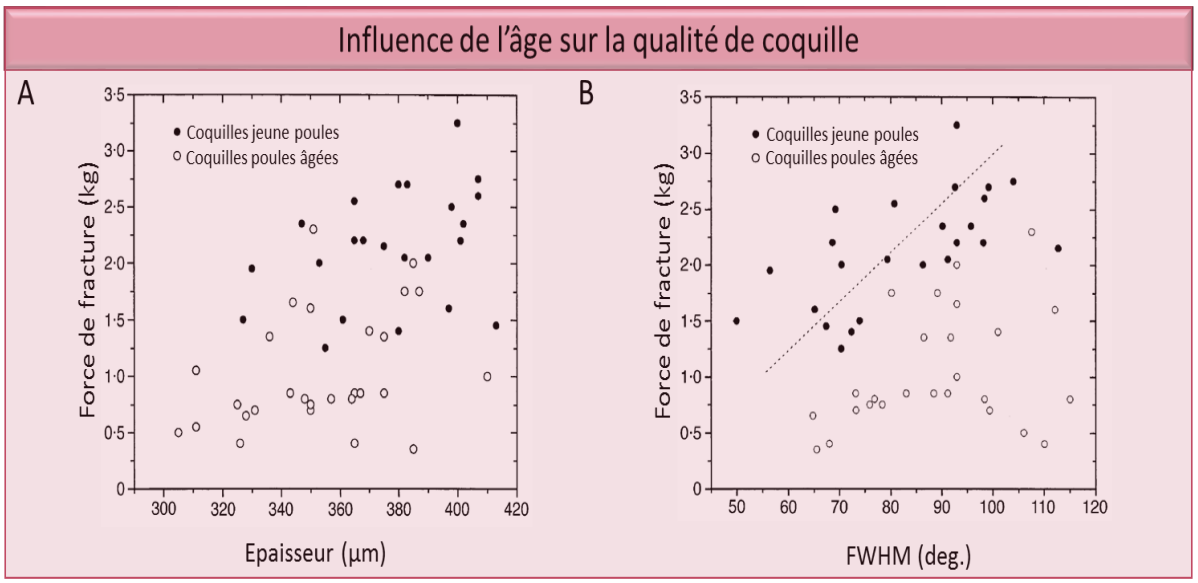


Figure 10. Influence de l'âge sur la qualité de coquille de l'œuf de poule. A. Force de fracture (kg) en fonction de l'épaisseur de la coquille. **B.** Force de fracture (kg) en fonction de l'indice d'orientation FWHM. Plus l'indice FWHM est élevé, moins les cristaux de calcite sont orientés dans la coquille. Jeunes poules : 30 semaines ; poules âgées : 58 semaines (Rodriguez-Navarro *et al.* 2002).

Chez des poules âgées, on peut restaurer les propriétés mécaniques de la coquille en provoquant une mue. Ce processus physiologique dure environ 1 mois et aboutit à une régénération de l'oviducte qui modifie la microstructure des coquilles et améliore ses propriétés mécaniques. Les œufs issus de poules âgées après mue présentent des propriétés mécaniques renforcées par rapport à des poules de même âge et n'ayant pas subi de mue. Les observations ont montré que chez les poules ayant subi la mue, les coquilles ont une texture cristallographique différente (**Tableau 1**) (Ahmed *et al.* 2005), avec la taille moyenne des cristaux de calcite diminuée mais sans changement de leur orientation. Cette diminution des cristaux de calcite engendre ainsi une augmentation des capacités mécaniques de la coquille (Ahmed *et al.* 2005). Par ailleurs, ces auteurs ont montré que la meilleure qualité de coquille observée après mue était associée à une concentration plus importante des protéines spécifiques de la coquille de l'œuf, par rapport aux autres protéines ubiquitaires.

Tableau 1. Influence de la mue sur la qualité de coquille de l'œuf de poule. (Ahmed *et al.* 2005).

Influence de la mue sur la qualité de coquille		
Paramètres	**Avant la mue**	**Après la mue**
Poids de la coquille (g)	6,24	6,22
Force de fracture (N)	28,1	36,7*
Dureté (N/mm³)	350	409*
Taille des cristaux (µm)	72	58*
Indice d'orientation cristalline	41	43

Ces dernières années, les avancées de la sélection ont permis un allongement de la période de ponte des poules pondeuses. Il y a encore peu, les poules étaient déclassées après 1 an de production (70 semaines d'âge) car le taux de ponte était inférieur à 75 % et le taux de déclassement supérieur à 8 %. L'objectif recherché est d'atteindre désormais 100 semaines d'âge d'ici quelques années. Aujourd'hui, les poules pondent plus de 80 semaines. Toutefois, certaines poules présentent des fragilités de coquille et d'os qui devront être améliorées par la génétique et des stratégies nutritionnelles adaptées.

3. Mécanismes généraux de la biominéralisation

3.1. Le phénomène de biominéralisation

Au cours des 3,5 milliards d'années d'évolution biologique, les organismes vivants ont développé un processus par lequel ils associent des éléments minéraux à des molécules organiques pour façonner des structures minéralisées rigides (Auzoux-Bordenave *et al.* 2013). Ce phénomène de biominéralisation produits des biominéraux composés, en majorité, de minéraux, de macromolécules et d'eau.

Ce sont les procaryotes qui ont été les premiers à développer cette capacité de produire des biominéraux (Weiner et Dove 2003). Actuellement, les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux assemblent plus de 60 biominéraux amorphes ou cristallins différents (Addadi

et Weiner 1992). Ces biominéraux présentent des organisations, des couleurs, des tailles, des précurseurs minéraux et des mécanismes d'élaboration très diversifiés. Toutefois, les microstructures des squelettes minéralisés provenant d'ancêtre du Cambrien sont remarquablement similaires à leurs homologues vivants (Weiner et Addadi 1997). Par exemple, la structure en prismes du phylum des mollusques actuels était déjà présente au niveau des mollusques connus les plus anciens (Weiner et Addadi 1997).

Les différents minéraux composant ces structures biominéralisées sont le phosphate de calcium, le carbonate de calcium, l'oxalate de calcium, l'oxyde de fer ou encore le sulfate et la silice (Auzoux-Bordenave *et al.* 2013). Toutefois, le calcium est le cation majoritairement utilisé dans la formation du biominéral (Weiner et Dove 2003). Ainsi, les minéraux calciques représentent environ 50 % des biominéraux connus (Lowenstam et Weiner 1989, Addadi et Weiner 1992).

La biominéralisation est un phénomène à l'interface du minéral et du vivant dont l'étude implique une multitude de disciplines scientifiques (biologie, chimie, géologie, physique, minéralogie, archéologie…). Une meilleure compréhension de ce processus permet le développement d'applications au niveau de divers secteurs :

- La santé humaine et animale : pathologies osseuses (Faibish *et al*. 2006), calculs rénaux (Alelign et Petros 2018), minéralisation ectopique cardiovasculaire (New et Aikawa 2013, Nik *et al.* 2017), pathologies dentaires (Opsahl Vital *et al.* 2012, Shao *et al.* 2019).
- L'agronomie : qualité de la coquille d'œuf (Guérin-Dubiard *et al.* 2010, Hincke *et al.* 2011, Nys et Guyot 2011, Rome et Le Roy 2016), anomalies osseuses (Fleming 2008).
- L'ingénierie des matériaux : biomimétisme des matériaux (Zhu *et al.* 2013, Chen *et al.* 2019), induction microbienne de biominéraux (Dhami *et al.* 2013), additifs pour la production de céramique (Navarro et Serra 2016).
- L'environnement : compréhension de l'acidification des océans et les effets sur les coraux et les mollusques (Fitzer *et al.* 2014, Zhao *et al.* 2017, Mollica *et al.* 2018), stratégies d'assainissement de polluants inorganiques (Benzerara *et al.* 2011).

Ainsi, de nombreux scientifiques examinent minutieusement ce mécanisme, sélectionné durant l'évolution.

3.2. Les différentes stratégies de biominéralisation

Au cours de l'évolution, les organismes vivants ont développé différentes stratégies afin d'élaborer leur structure minéralisée. Ces différentes stratégies de minéralisation peuvent être classées selon leurs mécanismes de formation du minéral. Malgré leurs divergences, toutes ces stratégies sont basées sur le même principe général de la biominéralisation, qui est la sursaturation dans un espace délimité.

3.2.1. Les deux grands processus de biominéralisation

Au sein des organismes vivants, il existe deux principaux processus de biominéralisation (Lowenstam 1981, Mann 1983) :

- La **minéralisation biologiquement induite**. C'est une minéralisation qui résulte d'interactions entre l'activité biologique d'un organisme et son environnement (Mann 1983). La composition du minéral ainsi formé, varie en fonction de l'environnement dans lequel il est formé (Frankel et Bazylinski 2003). Ce sont les conditions physico-chimiques qui favorisent, d'une manière indirecte, un certain type de biominéral (Weiner et Dove 2003). Dans ce processus, retrouvé chez certaines bactéries ou algues vertes et brunes, la part du contrôle biologique est faible.

- La **minéralisation biologiquement contrôlée**. Dans ce système de minéralisation, l'organisme utilise l'activité cellulaire pour contrôler la nucléation, la croissance et la morphologie des cristaux ainsi que la localisation du minéral déposé (Weiner et Dove 2003). Cette minéralisation implique la présence d'une matrice organique, principalement formée de protéines, protéoglycanes et polysaccharides (Mann 1983). C'est cette matrice organique qui va interagir avec le minéral pour former la structure désirée (Silyn-Roberts et Sharp 1986, Nys *et al.* 1999, Marin et Luquet 2004). Les organismes biominéralisants actuels les plus sophistiqués emploient des familles de protéines similaires pour contrôler la minéralisation (Weiner et Dove 2003).

3.2.2. Les concepts généraux de la biominéralisation contrôlée

La biominéralisation contrôlée est fondée sur des interactions entre des ions constitutifs et une matrice organique (Mann 1983, Addadi et Weiner 1992). Il existe plusieurs processus de biominéralisation contrôlée qui respectent les mêmes concepts généraux :

- Un **espace biologiquement compartimenté** qui sera le site de la minéralisation (Mann 1988, Addadi et Weiner 1992). Cet espace permet le maintien des conditions physico-

chimiques nécessaires à la biominéralisation *via* un contrôle cellulaire des entrées ioniques et organiques. Cet espace peut être inter- (entre des organismes unicellulaires en colonie), intra- (échinodermes) ou extracellulaire (endosquelette des vertébrés, coquille des oiseaux) selon les organismes.

- Une **hypersaturation ionique du milieu** dans lequel se déroule la minéralisation.

- Des **sites de nucléation** qui permettent l'initiation de la cristallisation (nucléation). En effet, les conditions d'hypersaturation dans un milieu compartimenté ne sont pas suffisantes pour précipiter un sel. La présence de sites de nucléation, qui peuvent être de différentes compositions, est une nécessité. Des amats protéiques adsorbés sur une surface sont fréquemment utilisés comme sites de nucléations.

- Un **contrôle de la croissance du minéral**. Les cristaux se développent à partir des premiers évènements de nucléation de la phase précédente. Les cristaux croissent graduellement par ajout successif de précurseurs minéraux sur le site de la minéralisation (Weiner et Addadi 1997). La croissance cristalline est sous contrôle de la matrice organique qui inhibe l'élongation du minéral selon un ou plusieurs axes, lui offrant une morphologie et une taille spécifique.

3.2.3. Les différentes biominéralisations contrôlées

La biominéralisation contrôlée se divise en trois groupes selon la localisation du processus (Watabe et Kingsley 1989).

La **biominéralisation contrôlée extracellulaire** repose sur la sécrétion d'une matrice organique à l'extérieur des cellules, au niveau d'un espace qui deviendra le site de minéralisation (Weiner et Dove 2003). Cette matrice organique est programmée pour assurer la formation du minéral. La structure et la composition de cette matrice organique sont sous contrôle génétique et propres à chaque organisme. Dans ce système, les ions précurseurs du minéral sont libérés sur le site de la minéralisation soit par des transporteurs et pompes spécifiques soit par un système vésiculaire.

La formation de l'endosquelette des vertébrés et des coquilles des mollusques et des œufs des oiseaux sont des exemples de biominéralisations contrôlées extracellulaires. Toutefois, le produit de la minéralisation osseuse est un biominéral cellulaire (composé de cellules) alors que la coquille d'œuf est un biominéral acellulaire (dépourvu de cellule).

La **biominéralisation contrôlée intercellulaire** est typique des organismes unicellulaires vivant en communauté (Weiner et Dove 2003). Ce processus est à l'interface de la biominéralisation induite et de la biominéralisation contrôlée extracellulaire. Cependant, dans ce type de minéralisation peu répandu, l'épithélium des cellules assure l'isolation du site de minéralisation et modifie la forme et le type polymorphique du minéral. Il en résulte une minéralisation du milieu intercellulaire qui ressemble à un exosquelette (Weiner et Dove 2003). Ce type de biominéralisation est retrouvé chez certaines algues du genre Chara (Borowitzka 1982).

La **biominéralisation contrôlée intracellulaire** implique des vésicules ou des vacuoles qui assurent la nucléation du minéral dans la cellule (Weiner et Dove 2003). Le minéral ainsi formé peut-être sécrété individuellement ou assemblé dans le milieu intracellulaire. La structure assemblée est ensuite libérée dans le milieu extracellulaire par exocytose. Le biominéral peut ensuite interagir avec une matrice extracellulaire afin d'être assemblé dans le but de former une structure ordonnée.

Les diatomées et certains foraminifères et échinodermes réalisent ce type de biominéralisation.

La formation d'un biominéral peut également impliquer une combinaison de différentes biominéralisations contrôlées. C'est le cas de la minéralisation osseuse qui semble impliquer des principes de biominéralisation extracellulaire mais aussi intracellulaire (Boonrungsiman *et al.* 2012, Murshed 2018).

3.3. Les biominéralisations phosphatées et carbonatées

3.3.1. La biominéralisation phosphatée

Le phosphate de calcium ($CaPO_4$), est l'un des biominéraux les plus abondants chez les vertébrés. Sa forme cristalline la plus répandue, **l'hydroxyapatite**, est retrouvée au niveau de l'endosquelette (os) et des dents des vertébrés (**Figure 11**). L'hydroxyapatite de formule $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ qui cristallise en symétrie hexagonale possède deux groupements unitaires par maille.

Le **phosphate de calcium** sous forme **amorphe** (**ACP**), de formule $Ca_3(PO4)_2.nH2O$ (Combes et Rey 2010), est principalement impliqué dans la formation osseuse dans laquelle il endosse le rôle de réserve ionique. Cette phase correspond à une forme transitoire à la phase cristalline stabilisée. Elle est aussi retrouvée au niveau de la formation des coquilles de certains mollusques (**Figure 11**).

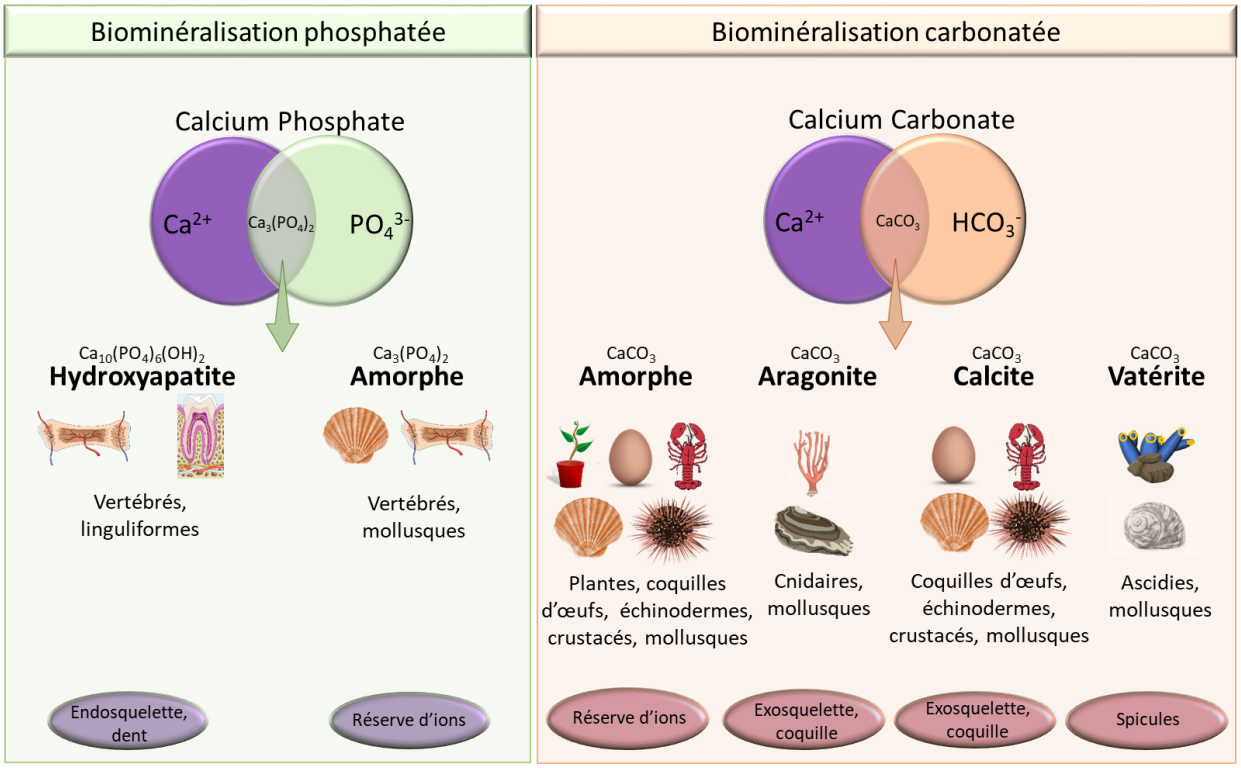


Figure 11. Distribution des processus de biominéralisation phosphatée et carbonatée en fonction des espèces.

3.3.2. La biominéralisation carbonatée

Le carbonate de calcium ($CaCO_3$), est le minéral biologiquement synthétisé le plus répandu en termes d'abondance et de distribution parmi les espèces (Lowenstam et Weiner 1989, Gunther *et al.* 2005). Les formes cristallines pures du carbonate de calcium sont l'aragonite, la calcite et la vatérite (**Figures 11** et **12**) (Teghidet 2012).

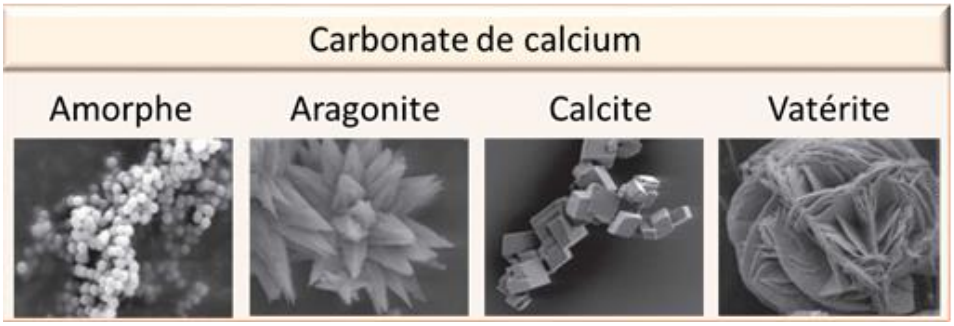


Figure 12. Observation des différents polymorphes de carbonate du calcium en microscopie électronique. (Dhami *et al.* 2013).

L**'aragonite** cristallise sous la forme orthorhombique et sa maille élémentaire contient quatre motifs $CaCO_3$. Ses cristaux se présentent souvent selon un aspect de bouquet d'aiguilles (Dědek 1966). Ce type polymorphique est retrouvé au niveau de l'exosquelette des cnidaires et de la coquille des mollusques.

La **calcite** est le polymorphe cristallin le plus stable du carbonate de calcium et le plus répandu. Elle cristallise dans un système trigonal et possède une maille élémentaire de forme rhomboèdre qui contient deux motifs de $CaCO_3$ (Dědek 1966). De nombreux organismes façonnent leur exosquelette ou leur coquille avec de la calcite. Les crustacés, les échinodermes, les mollusques ou encore les oiseaux en sont des exemples.

La **vatérite** cristallise dans le système hexagonal. Elle présente des cristaux sous forme d'aiguilles, de fleurs ou de lentilles (Dědek 1966). Cette forme de $CaCO_3$ est peu présente au niveau des minéraux naturels à cause de son instabilité. Elle recristallise généralement en calcite en présence d'eau. On retrouve cette forme au niveau des spicules d'ascidies ou en faible quantité dans la coquille de certains mollusques (Hasse *et al.* 2000).
A ces différentes formes s'ajoute la forme non cristalline du $CaCO_3$ appelée **carbonate de calcium amorphe** (**ACC**) (**Figures 11** et **12**), qui sera présentée dans le paragraphe **3.4**.

Comme pour tout processus de minéralisation, la formation du carbonate de calcium ne peut avoir lieu que si le degré de saturation de la solution est atteint (Robertson 1982). Ainsi, le carbonate de calcium est formé *via* la réaction suivante :

$$Ca^{2+} + CO_3^{2-} \leftrightarrow CaCO_3$$

Le sel obtenu est alors en équilibre entre une forme soluble et une forme solide :

$$CaCO_3 \text{ soluble} \leftrightarrow CaCO_3 \text{ solide}$$

La constante d'équilibre de cette réaction est appelée « produit de solubilité » (Ksp). Lorsque le produit $[Ca^{2+}].[CO_3^{2-}]$ noté AP est supérieur à Ksp (AP > Ksp), la solution est dite hypersaturée et la forme solide est favorisée.

Le processus de biominéralisation du carbonate de calcium se décompose en deux étapes. Durant la première étape, appelée nucléation, les premiers cristaux apparaissent sur des sites d'initiation. La croissance cristalline a ensuite lieu au cours d'une seconde étape. Les matrices organiques interviennent au cours de ces deux phases. Elles créent un support pour la nucléation (site d'initiation) et inhibent ou favorisent la croissance cristalline selon des axes privilégiés. Nous détaillerons plus loin le rôle des différentes protéines qui composent ces matrices minéralisantes.

3.4. Rôle de l'ACC dans la biominéralisation carbonatée

3.4.1. Le carbonate de calcium amorphe (ACC)

L'ACC est la seule forme de carbonate de calcium qui est isotropique en lumière polarisée. Cela signifie qu'elle est indépendante de la direction suivant laquelle on la mesure. Cette forme non cristalline, instable en condition ambiante, a alors été décrite comme amorphe puisqu'elle ne diffracte pas les rayons-X (Addadi *et al.* 2003).

Les premières études rapportant la présence d'ACC au niveau des organismes vivants (ACC biogénique) concernaient des invertébrés. Cette phase biogénique, qui présente une structure en nanosphères (**Figure 12**), a d'abord été retrouvée dans les spicules d'ascidies, d'éponges et d'oursins (Aizenberg *et al.* 1996, Beniash *et al.* 1997, Weiner et Addadi 1997). Depuis, de nombreuses études s'adonnent à décrypter le rôle de l'ACC dans le phénomène de biominéralisation.

L'ACC biogénique peut se présenter sous deux formes :

- Une **forme d'ACC stable** qui ne se transforme pas en l'un des polymorphes cristallins du carbonate de calcium. Cette forme d'ACC est stabilisée par l'organisme minéralisant. C'est par exemple le cas des spicules de l'ascidie *Pyura pachydermatina* (Aizenberg *et al.* 2002). Dans cette structure, le carbonate de calcium cristallin et l'ACC stable coexistent dans des régions distinctes. Ces deux phases sont séparées par une membrane (Addadi *et al.* 2003). Les cystholites (masse de cristaux inorganiques) de la plante *Ficus microcarpa* sont également composés en majorité d'ACC stable (Gal *et al.* 2012). Une fois extraits des feuilles, les cystholites se transforment rapidement en calcite en milieu aqueux (Addadi *et al.* 2003).

Des analyses de spectrométrie d'absorption des rayons-X (EXAFS) ont démontré des variations structurales entre des phases d'ACC provenant d'organismes différents (Addadi *et al.* 2003). En effet, il n'y aurait pas une phase minérale d'ACC mais une famille de phases, très proches en terme de structure, qui varient en fonction des organismes (Addadi *et al.* 2003). Ainsi, selon l'organisme minéralisant, l'ACC affiche une composition, une stabilité et une structure différente (Addadi *et al.* 2003, Meic *et al.* 2018). Il est à noter que les formes stables d'ACC qui ont été rapportées sont des formes hydratées de formule $CaCO_3.H_2O$ (Levi-Kalisman *et al.* 2002, Weiss *et al.* 2002, Addadi *et al.* 2003).

- Une **forme d'ACC transitoire** qui est précurseur du polymorphe cristallin stable. L'ACC est plus soluble et plus réactif que ses homologues cristallins (Addadi et Weiner 1992, Addadi *et al.* 2003). Il peut servir de réserve temporaire de calcium lors de la minéralisation

rapide (Ziegler 1994, Levi-Kalisman *et al.* 2002, Luquet 2012). L'avantage conséquent de cette phase amorphe, par comparaison aux formes cristallines, est sa capacité à s'adapter aux formes complexes retrouvées dans les structures minéralisées (Rodriguez-Navarro *et al.* 2015). Cette capacité facilite ainsi la synthèse de la structure minéralisée. Cette forme d'ACC transitoire est non hydratée, par opposition à la forme d'ACC stable (Addadi *et al.* 2003, Raz *et al.* 2003).

Chez l'oursin *Paracentrotus lividus*, l'ACC a été reporté comme une phase transitoire précurseur de la calcite stable des spicules matures (Beniash *et al.* 1997, Albéric *et al.* 2019). Un mécanisme semblable a ensuite été démontré lors de la formation de la coquille larvaire du mollusque bivalve *Merceneria merceneria* (Weiss *et al.* 2002). En effet, le minéral déposé est principalement de l'ACC qui se transforme ensuite en aragonite stable. Depuis, plusieurs études ont mis en évidence le rôle de l'ACC au cours de la formation de minéraux biogéniques de différents organismes de taxons éloignés. C'est le cas des escargots aquatiques *Biomphalaria glabrata* et *Phorcus turbinatus* (Hasse *et al.* 2000, Marxen *et al.* 2003, Macias-Sanchez *et al.* 2017), du crabe *Callinectes sapidus* (Dillaman *et al.* 2005), de l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* (Gong *et al.* 2012b), du corail *Stylophora pistillata* (Mass *et al.* 2017a) ou encore de la poule *Gallus gallus* (Rodriguez-Navarro *et al.* 2015). Une récente étude a également rapporté le rôle de l'ACC au niveau de sites infectieux des coquilles d'huîtres atteintes d'une pathologie (Huang *et al.* 2018). Dans ce contexte pathologique, une grande quantité d'ACC est déposée rapidement sur le site avant de se transformer en aragonite stable pour régénérer la coquille d'huître.

Les formes d'ACC transitoires présenteraient des pré-structures différentes selon les types polymorphiques stables dont ils sont les précurseurs (Marxen *et al.* 2003, Politi *et al.* 2004). Il existerait donc une prédétermination cristalline de l'ACC pour orienter le type cristallin qui sera formé. Cependant, une étude récente a montré qu'une même forme d'ACC pouvait aboutir à différents polymorphes cristallins (Konrad *et al.* 2018).

3.4.2. La stabilisation du carbonate de calcium amorphe

L'objectif actuel majeur concernant l'ACC est la compréhension des mécanismes qui le stabilisent. Cette connaissance permettrait l'amélioration du biomimétisme dans le processus de fabrication de matériaux synthétiques, d'une part, et une meilleure compréhension des processus de minéralisation biogéniques, d'autre part. Ainsi, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* rapportent des données sur la stabilisation de l'ACC. Cette stabilisation est basée sur plusieurs paramètres. La présence de composés inorganiques ou organiques et de molécules

d'eau constitutives est corrélée à la stabilisation de l'ACC (Gal *et al.* 2012, Meic *et al.* 2018).

Des études ***in vitro*** ont montré que les composés inorganiques Mg^{2+} et PO_4^{3-} retardent la cristallisation de l'ACC alors que l'augmentation du nombre de molécules d'eau accélère sa transformation (Rodriguez-Blanco *et al.* 2012, Alberic *et al.* 2018). Une autre étude a montré que l'ACC en présence d'eau pure se transforme instantanément en vatérite ou en calcite, alors qu'il est stabilisé durant plusieurs heures en présence de concentrations élevées de Mg^{2+} (Konrad *et al.* 2018). D'autre part, l'encapsulation de l'ACC dans une membrane de phospholipides ou une structure de silice stabilise également cette forme transitoire (Tester *et al.* 2011, Ihli *et al.* 2014). L'encapsulation permettrait d'isoler l'ACC de l'environnement aqueux, évitant ainsi sa cristallisation (Loste *et al.* 2004, Addadi *et al.* 2006, Ihli *et al.* 2014). En effet, dans ces conditions, l'ACC se transformerait en une phase déshydratée stabilisée (Ihli *et al.* 2014, Alberic *et al.* 2018, Konrad *et al.* 2018). L'ACC encapsulé resterait stable durant plus de 20 h (Tester *et al.* 2011).

Chez les invertébrés, certains composants des matrices organiques pourraient stabiliser la forme amorphe de carbonate de calcium (Ma *et al.* 2007, Politi *et al.* 2007, Gong *et al.* 2012a, Rao *et al.* 2013). Deux études rapportent que les matrices organiques extraites du squelette du corail auraient la capacité de stabiliser l'ACC *in vitro* en absence de cellule (Reggi *et al.* 2014, Falini *et al.* 2015). Cette capacité de stabilisation a également été décrite pour des protéines de la matrice des spicules d'oursins. En effet, la protéine SM50 des spicules de la larve d'oursin serait impliquée dans la stabilisation de cette phase amorphe (Gong *et al.* 2012a). Cette activité serait assurée par le domaine SUMO riche en glycine de la protéine SM50 (Rao *et al.* 2013). De plus, une étude a démontré, *via* des analyses *in vitro*, que la protéine Asprich de la coquille des mollusques stabilise l'ACC (Politi *et al.* 2007). Cette capacité de stabilisation a également été suggérée pour la protéine ovocleidin-17 (OC-17) de la coquille d'œuf (Freeman *et al.* 2010). Cette étude de modélisation propose un cycle catalytique dans lequel la protéine OC-17 se lierait à l'ACC pour le stabiliser, avant de déclencher sa cristallisation. Une autre étude a démontré que l'augmentation de la concentration en acide aspartique et glycine améliore la stabilité de l'ACC (Tobler *et al.* 2014).

Des études *in vivo* sur la stabilisation de l'ACC ont également été réalisées**.** Ainsi, chez l'oursin, l'association de macromolécules de matrice organique et de magnésium est responsable de la formation et de la stabilisation de la forme transitoire d'ACC (Raz *et al.* 2003). Les effets synergiques de certaines protéines et du magnésium assureraient cette stabilisation

(Weiner et Dove 2003). De plus, des études rapportent que les protéines composantes des macromolécules de spicules d'ascidie (*Pyura pachydermatina*) et d'éponge (du genre *Clathrina*), qui participeraient à la stabilisation d'ACC, sont riches en acide glutamique et en glutamine (Aizenberg *et al.* 1996, Raz *et al.* 2003).

La plante *Ficus microcarpa* utiliserait une phase de silice permettant de confiner le microenvironnement de l'ACC et ainsi contrôler sa stabilité (Gal *et al.* 2012). Au niveau des spicules d'oursin, l'ACC déposé est séquestré dans des vésicules (Beniash *et al.* 1999). En effet, les spicules croissent par dépôt d'ACC transitoire qui se transforme ensuite en calcite par nucléation secondaire (Politi *et al.* 2008, Weiner et Addadi 2011, Vidavsky *et al.* 2014). Chez les mollusques bivalves, le modèle proposé pour la formation de la nacre implique également des vésicules qui stabiliseraient l'ACC (Addadi *et al.* 2006). Ces vésicules formées par les cellules délivreraient le minéral sur le site de la minéralisation. De la même façon, un mécanisme basé sur le dépôt de l'ACC directement à la surface de croissance du minéral a été proposé pour le squelette du corail (Mass *et al.* 2017b). Ce mécanisme comporterait des vésicules qui traverseraient les membranes des cellules et qui expulseraient l'ACC par exocytose au niveau du minéral en formation.

En résumé, la nature semble employer un mécanisme d'encapsulation, ainsi que différents composants organiques (protéines, macromolécules…) et/ou inorganiques (magnésium, phosphate, silice) pour stabiliser l'ACC. L'utilisation de vésicules pour transférer le minéral instable semble être partagé par divers organismes minéralisants plus ou moins éloignés. Ainsi, le nombre de travaux de recherches sur des éventuels transports vésiculaires de l'ACC est en pleine croissance.

3.5. Rôle des matrices organiques en biominéralisation

Les matrices organiques jouent un rôle central dans le phénomène de biominéralisation contrôlée. De par des interactions avec les phases minérales, les matrices organiques modulent la croissance et l'organisation des biominéraux. Les constituants de ces matrices organiques sont retrouvés dans le biominéral formé. L'identification et la caractérisation fonctionnelle des protéines composant les matrices organiques a été d'un intérêt majeur pour élucider le phénomène de biominéralisation.

3.5.1. Les différents constituants des matrices organiques

Les matrices organiques sont principalement composées de protéines, de polysaccharides et de glycoprotéines. Le rôle prédominant de ces matrices organiques est d'offrir un support tridimensionnel à la formation du minéral et d'organiser sa croissance. Ces matrices organiques constituent des **assemblages** de **macromolécules de structures** hydrophobes, en association ou non avec des **macromolécules acides** (Mann 1983).

Les macromolécules de structure :

Comme leur nom l'indique, ces macromolécules offrent un support structural au minéral lors de la biominéralisation. Elles correspondent à des protéines hydrophobes et des polysaccharides.

Les protéines de structure les plus étudiées sont le collagène de type I de l'os et de la dentine, l'α-chitine des crustacés ou encore la β-chitine des coquilles de mollusques (Mann 1983, Weiner et Addadi 1997). Le cas de la protéine de structure de l'émail dentaire est particulier. En effet, l'amélogénine est dégradée lors de la minéralisation pour permettre la maturation de l'émail. Chez les vertébrés, cette dégradation est réalisée par une protéase appelée kallikréine 4 (Bartlett 2013, Gasse 2015).

Les macromolécules acides :

Les macromolécules acides fournissent une surface de nucléation pour la biominéralisation. Elles assurent également diverses autres fonctions comme le contrôle de la croissance du minéral (par adsorption sur certaines faces des cristaux), le transport d'ions ou encore une activé enzymatique. Ces macromolécules contiennent de nombreux acides aminés acides (acide aspartique et acide glutamique). Les résidus sérines et thréonines avec des groupements phosphates sont également majoritairement retrouvés dans ces macromolécules (Mann 1983, Weiner et Dove 2003). Ainsi, une grande partie des macromolécules acides correspond à des phosphoprotéines. Ces macromolécules solubles sont, le plus souvent, directement associées à la phase cristalline (Weiner et Addadi 1997). Certaines interagissent directement avec des macromolécules plus hydrophobes. Pif 80 (Mann 1983, Suzuki *et al.* 2009, Bahn *et al.* 2017) et la nacréine (Mann 1983, Miyamoto *et al.* 1996), sont des exemples de glycoprotéines acides de la coquille des mollusques. Une synthèse détaillée des différentes fonctions des protéines de la matrice organique d'invertébrés minéralisants sera présentée dans le paragraphe (**3.5.2**).

Chez les vertébrés, les formations de l'os et de la dentine impliquent des macromolécules acides telles que des glycoprotéines ou des protéoglycanes. Parmi les glycoprotéines connues, on retrouve l'ostéocalcine, l'ostéopontine (OPN), la bone sialoprotéine (BSP), la sialophosphoproteine de dentine (DSPP), la fibronectine, la fibrilline ou encore la protéine de la matrice de dentine-1 (DMP1) (Mann 1988, Fujisawa et Tamura 2012, Alvares 2014). Les protéoglycanes (de kératanes sulfates, de chondroïtines sulfates ou de dermatanes sulfates) identifiés dans les biomatériaux correspondent à des glycosaminoglycanes liés de manière covalente à des noyaux protéiques. Versicane et aggrécane sont des exemples de protéoglycanes à chondroitine sulfate (Robey 2002). Les protéoglycanes s'assemblent à leur tour à des filaments d'acide hyaluronique pour former des agrégats de quelques micromètres (Mann 1983).

Au niveau de l'émail dentaire, on retrouve une glycoprotéine acide appelée énaméline (Mann 1983). Son gène est exprimé dans les améloblastes durant la majeure partie du processus de formation de l'émail (Hu *et al.* 2000).

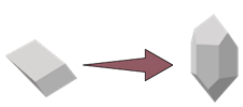
3.5.2. Les différentes fonctions des protéines identifiées dans les matrices organiques des invertébrés minéralisants

De nombreuses études de protéomiques et transcriptomiques ont permis d'identifier les protéines composant les matrices organiques des biominéraux chez les invertébrés. Ces études ont majoritairement été menées chez les mollusques, les coraux et les oursins (Bedouet *et al.* 2007, Joubert *et al.* 2010, Mann *et al.* 2010, Marie *et al.* 2010, Kinoshita *et al.* 2011, Marie *et al.* 2011a, Marie *et al.* 2011b, Marie *et al.* 2011c, Marie *et al.* 2012, Drake *et al.* 2013, Ramos-Silva *et al.* 2013). Parmi les protéines identifiées, certaines ont pu être isolées afin de déterminer leurs fonctions. Les **tableaux 2** et **3** ci-après répertorient les différentes protéines des matrices organiques d'invertébrés, dont les fonctions associées à la biominéralisation ont été étudiées ou prédites. Ces figures ont été réalisées à partir du travail de synthèse sur les protéines de matrices organiques des invertébrés minéralisants, réalisé dans le manuscrit de thèse de Pauline Marie (Marie 2015).

Les protéines d'invertébrés associées à la minéralisation peuvent se diviser en deux groupes principaux :

- Les **protéines interagissant directement avec la phase minérale** (**Tableau 2**). Parmi celles-ci, on retrouve les protéines connues pour modifier la croissance des cristaux de carbonate de calcium, les protéines connues pour se lier au calcium, les protéines possédant des domaines de liaison qui pourraient leur permettre de se lier au calcium et les protéines stabilisant le carbonate de calcium amorphe.

Tableau 2. Les protéines des matrices organiques d'invertébrés interagissant avec la phase minérale. Réalisé à partir de la synthèse du manuscrit de thèse de (Marie 2015).

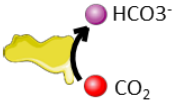


Protéines modifiant les cristaux de $CaCO_3$		Protéines liant le calcium		Protéines ayant des domaines pouvant lier le calcium		Protéines stabilisant l'ACC	
Nom de la protéine	**Espèce**	**Nom de la protéine**	**Espèce**	**Nom de la protéine**	**Espèce**	**Nom de la protéine**	**Espèce**
caspartine	*Pinna nobilis* (mollusque bivalve)	perline	*Pinctada fucata* (mollusque bivalve)	calconectine	*Pinctada margaritifera* (mollusque bivalve)	asprich	*Atrina rigida* (mollusque bivalve)
prisilkine -39	*Pinctada fucata* (mollusque bivalve)	aspeine		EFCBP	*Pinctada fucata* (mollusque bivalve)	ACCBP	*Pinctada fucata* (mollusque bivalve)
PFMG1		MSI-31		calmoduline		SM50	*Strongylocentrotus purpuratus* (mollusque bivalve)
MSI-7		MSI60		calmoduline-like			
aspéine		N14	*Pinctada maxima* (mollusque bivalve)	IMSP5	*Venerupis philippinarum (mollusque bivalve)*		
nacréine		homologue de MSI-31	*Pinctada margaritifera (mollusque bivalve)*	calmoduline	*Hyriopsis schelegelii* (mollusque bivalve)		
pif 80 et pif 97		homologue de MSI-60		IMSP2	*Crassostrea gigas* (mollusque bivalve)		
KRMP 1 à 3		homologue de N14					
perlinhibine	*Haliotis laevigata* (mollusque gastéropode)	protéine EP	*Mytilus edulis* (mollusque bivalve)				
		homologue de MSI-60	*Mytilus californianus* (mollusque bivalve)				
perlucine	*Haliotis laevigata, Haliotis dicus dicus* (mollusques gastéropodes)	MSP-1/MSP-2	*Patinopecten yessioensis* (mollusque bivalve)				
		lustrine A	*Haliotis rufescens* (mollusque gastéropode)				
AP7 et AP24	*Haliotis rufences* (mollusques gastéropodes)						
		crustocalcine	*Penaeus japonicus* (crustacé décapode)				
		CAP1/CAP2	*Procambarus clarkii* (crustacé décapode)				

- Les **protéines n'interagissant pas directement avec la phase minérale** (**Tableau 3**). Parmi celles-ci, on retrouve les protéines inhibitrices de protéases qui assurent une régulation de l'activité protéique dans le milieu minéralisant, et les protéines présentant une activité anhydrase carbonique. Ces dernières transforment le CO_2, par hydratation, en ions HCO_3^- nécessaires à la formation du $CaCO_3$.

Tableau 3. Les protéines des matrices d'invertébrés n'interagissant pas directement avec la phase minérale. Réalisé à partir de la synthèse du manuscrit de thèse de (Marie 2015).

Protéines n'interagissant pas directement avec la phase minérale



Protéines inhibitrices de protéases		Protéines présentant une activité anhydrase carbonique	
Nom de la protéine	**Espèce**	**Nom de la protéine**	**Espèce**
P12	*Unio pictorium* (mollusque bivalve)	nacréine	*Pinctada fucata* (mollusque bivalve)
P16		P50	*Unio pictorum* (mollusque bivalve)
IMSP4 IMSP6	*Venerupis philippinarum* (mollusque bivalve)	N66	*Pinctada maxima* (mollusque bivalve)
PFMG10	*Pinctada fucata* (mollusque bivalve)	homologue de nacréine/N66	*Pinctada margaritifera* (mollusque bivalve)
PFMG12	*Pinctada fucata* (mollusque bivalve)	nacréine-like	*Mytilus californianus* (mollusque bivalve)
perlawapin	*Haliotis laevigata* (mollusque gastéropode)	htCA1 et htCA2	*Haliotis tuberculata* (mollusque gastéropode)
perlawapin-like	*Mytilus edulis* (mollusque bivalve)	carbonic anhydrase	*Tubastrea aurea* (cnidaire)
		STPCA	*Stylophora pistillata* (cnidaire)

Au cours de cette thèse de nouvelles protéines impliquées dans la biominéralisation d'organismes invertébrés ont été identifiées. Chez le mollusque bivalve *Chlamys farreri*, la calponine est une protéine qui influencerait la croissance du minéral en modulant l'expression d'autres protéines de la matrice organique ou de certaines protéines qui régulent la minéralisation (Wang *et al.* 2016a). Une étude a également proposé que la protéine *Pf*-Sp8/9 de l'huître *Pinctada fucata* participerait à sa minéralisation en régulant la transcription de plusieurs gènes encodant des protéines de la matrice organique (Zheng *et al.* 2016). Dans ce même organisme invertébré, une nouvelle protéine de la matrice organique nommée PfY2 a été identifiée (Yan *et al.* 2017). Les tests *in vitro* de l'étude indiquent que cette protéine participerait au processus de nucléation du cristal, modifierait la morphologie du cristal et inhiberait la transformation de l'ACC en calcite et en aragonite stabilisée (Yan *et al.* 2017). De plus, la protéine kinase *fam*20C participerait également à la minéralisation de la coquille de l'huître *Pinctada fucata* (Du *et al.* 2018a). En effet, Du et collaborateurs ont détecté une anomalie de la croissance des cristaux de carbonate de calcium en inhibant *in situ* l'expression du gène *fam20C* (Du *et al.* 2018a). Chez les vertébrés, cette protéine kinase était déjà connue pour phosphoryler des protéines de la matrice organique impliquées dans la biominéralisation. Dans la matrice organique de la coquille de l'espèce *Hyriopsis cumingii*, une nouvelle protéine, hic24, a également été rapportée (Liu *et al.* 2019). Son rôle dans la nucléation du carbonate de calcium a été démontré *in situ* à travers l'inhibition du gène *hic24 via* l'utilisation d'ARNs interférents (Liu *et al.* 2019). Enfin, une nouvelle fonction a été proposée pour la protéine SIPC du crustacé cirripède *Amphibalanus amphitrite* (Zhang *et al.* 2016). Celle-ci inhiberait la formation de vatérite et régulerait la morphologie des cristaux de calcite in vitro (Zhang *et al.* 2016).

Les fonctions des protéines de la matrice organique de la coquille d'œuf seront détaillées dans la partie **4.3.3** de cette revue bibliographique. Les groupes de protéines retrouvées sont les mêmes que chez les invertébrés, ce qui démontre des mécanismes de contrôle conservés entre espèces.

3.6. Le transport vésiculaire en biominéralisation

Les vésicules sont de petits organites délimités par une membrane phospholipidique qui assurent des fonctions de stockage, de transport ou de dégradation, en séquestrant du matériel de nature variée. D'origine cellulaire, elles ont la capacité de transporter le matériel séquestré, à l'intérieur des cellules, mais également dans le milieu extracellulaire.

Au cours de l'évolution, la nature a recruté les fonctions du transport vésiculaire au niveau du phénomène de biominéralisation. Les vésicules offrent aux organismes un espace délimité pour la formation du minéral. Les études rapportant l'implication d'un transport vésiculaire associé à la minéralisation biogénique concernent à la fois les invertébrés et les vertébrés. Aujourd'hui, de plus en plus de travaux de recherches concernent l'étude du transport vésiculaire en biominéralisation.

3.6.1. Les vésicules impliquées dans le transfert du minéral chez les invertébrés

Chez les invertébrés, plusieurs organismes réalisant de la biominéralisation intracellulaire ont recours au transport vésiculaire. C'est le cas des bactéries magnétotactiques (magnetite), des radiolaires (silice des spicules), des foraminifères (coquille), de certaines plantes (cristaux d'oxalate) ou encore des algues marines « coccolithophores » (coccolithe) et des mollusques (coquille) (Neff 1972, Addadi et Weiner 1992, Weiner et Dove 2003, Weiner et Addadi 2011). Dans ces vésicules, le minéral peut se trouver sous forme amorphe ou cristalline. Les vésicules pourraient permettre de stabiliser la forme de minéral amorphe, comme annoncé dans le paragraphe **3.4.2** (Weiner et Addadi 2011).

La biominéralisation de la calcite des spicules par l'embryon d'oursin est l'exemple le plus documenté. La formation du carbonate de calcium amorphe, nécessaire à la minéralisation des spicules, se déroule dans des vésicules intracellulaires (Beniash *et al.* 1997, Beniash *et al.* 1999, Gong *et al.* 2012a). Les vésicules contenant le minéral amorphe fusionnent avec la membrane d'une vésicule multicellulaire appelée le syncytium, situé à l'interface des milieux intra et extracellulaire (Weiner et Addadi 2011). Les premiers évènements de nucléation et la minéralisation progressive des spicules ont lieu dans le syncytium (Addadi *et al.* 2003, Weiner et Addadi 2011). Les vésicules contenant des nanosphères de carbonate de calcium amorphe, ont été visualisées dans les cellules épithéliales et les cellules primaires mésenchymateuses (responsables de la mise en place du syncytium) en cryo-microscopie à balayage (Vidavsky *et al.* 2014, Vidavsky *et al.* 2015). La phase minérale de l'embryon d'oursin a été observée en microscopie à fluorescence *via* l'utilisation d'un marquage à la calcéine, une molécule fluorescente qui permet le marquage des ions calcium (Vidavsky *et al.* 2014, Vidavsky *et al.* 2015). Dans ce système, le transport des vésicules serait assuré par un réseau de filopodes permettant les échanges entre les cellules (Vidavsky *et al.* 2015).

L'implication de vésicules a également été proposée pour la formation de la coquille des mollusques comme par exemple chez la palourde *Merceneria merceneria*, l'huître *Pinctada fucata* ou chez certains gastéropodes (Neff 1972, Addadi *et al.* 2006, Macias-Sanchez *et al.*

2015). Dans ce modèle, les vésicules contenant du minéral seraient formées dans les cellules et délivrées sur le site de la minéralisation (Addadi *et al.* 2006). Cela permettraient de stabiliser le carbonate de calcium amorphe en l'isolant de l'environnement aqueux (Addadi *et al.* 2006). Une récente étude sur l'huître (*Pinctada fucata*) a suggéré la participation de la protéine matricielle pif80 dans la stabilisation du minéral amorphe et son transport vésiculaire (Bahn *et al.* 2017).

Un modèle similaire a récemment été proposé pour la minéralisation du squelette des coraux (Mass *et al.* 2017b). Des travaux antérieurs avaient mis en évidence de nombreuses vésicules de 400 nm dans les cellules adjacentes au squelette en formation (Clode et Marshall 2002). Dans ce modèle, des vésicules permettraient la formation de particules de carbonate de calcium amorphe. Les vésicules assureraient le transport et la libération de l'ACC à la surface du minéral en croissance, en contact direct avec les cellules (Mass *et al.* 2017a).

Une récente étude de cryo-microscopie sur des cyanobactéries a souligné la présence de carbonate de calcium amorphe intracellulaire séquestré dans une enveloppe de nature lipidique ou protéique (Blondeau *et al.* 2018).

Plusieurs études ont rapporté l'implication de vésicules au niveau de la biominéralisation des invertébrés, toutefois, malgré les modèles suggérés, les mécanismes de ces transports vésiculaires restent énigmatiques.

3.6.2. Les vésicules impliquées dans le transfert du minéral chez les vertébrés

En 1967, deux études de microscopies électroniques ont mis en évidence pour la première fois des vésicules au niveau du cartilage (Anderson 1967, Bonucci 1967). En 1969, Anderson a associé la présence des vésicules du cartilage épiphysaire avec le phénomène de calcification (Anderson 1969). Depuis, de nombreux travaux ont été réalisés sur les vésicules impliquées dans le phénomène de biominéralisation des vertébrés.

Description des vésicules impliquées dans la minéralisation :

Les vésicules extracellulaires sont impliquées dans de nombreux mécanismes physiologiques ou pathologiques (Kim *et al.* 2002, Basso et Bonetto 2016, Barreiro et Holthofer 2017, Gho et Lee 2017, Pomatto *et al.* 2017, Gho et Lee 2019). La biologie des vésicules extracellulaires étant un domaine d'étude récent et en plein développement, la nomenclature précise des vésicules impliquées dans le phénomène de biominéralisation reste partiellement définie. Toutefois, trois catégories majoritaires de vésicules extracellulaires sont connues : les exosomes (30-150 nm), les corps apoptotiques (50-5000 nm) et les microvésicules ou

ectosomes (100-1000 nm) (Kalra *et al.* 2016). Les vésicules extracellulaires biominéralisantes semblent être un mélange d'exosomes (30-150 nm) et de microvésicules (50-1000 nm). Elles sont composées de phospholipides et protéines spécifiques, impliqués dans l'activité minéralisante (Azoidis *et al.* 2018). Ces vésicules permettraient ainsi la formation d'un précurseur minéral pré-orienté nécessaire à la formation du minéral stable (Anderson *et al.* 2005). Chez les vertébrés, des vésicules extracellulaires sont impliquées dans la minéralisation du cartilage calcifié, de l'os et de la dentine (Golub 2009, Bottini *et al.* 2018). Ces vésicules proviennent du bourgeonnement de la membrane plasmique des cellules qui forment le minéral (chondrocytes, osteoblastes, odontoblastes). Elles correspondent à des corps sphériques extracellulaires, de 30 à 1000 nm de diamètre, délimités par une membrane (**Figure 13**) (Hasegawa *et al.* 2017).

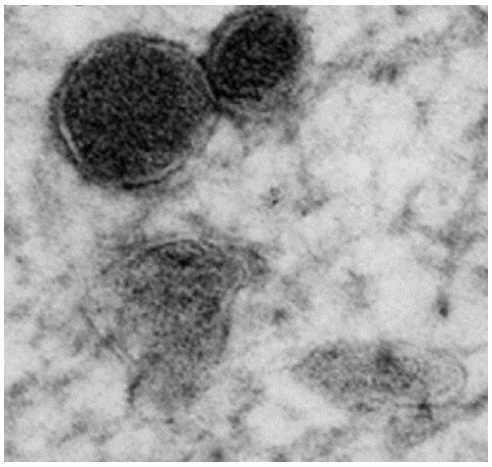


Figure 13. Image de microscopie électronique à transmission de vésicules extracellulaires sécrétées par les ostéoblastes lors de la formation osseuse. (Hasegawa *et al.* 2017).

Plusieurs études de microscopie électronique ont rapporté des observations de vésicules séquestrant du minéral dans différents systèmes de minéralisation. Chez les mammifères, elles ont été décrites comme des corps denses aux électrons qui s'incorporent dans la matrice extracellulaire (Azoidis *et al.* 2018). Ces vésicules ont été observées dans la dentine de molaire de souris (Foster *et al.* 2013), au niveau de la matrice cartilagineuse du rat (Anderson *et al.* 2005), du cartilage du poulet (Bottini *et al.* 2018), du cartilage de la thyroïde de l'homme (Kirsch et Claassen 2000) et dans le tissu osseux du poisson zèbre (Yang *et al*. 2007a). Chez la souris, des analyses de cryo-TEM et cryo-MEB ont montré la présence de vésicules intracellulaires transportant une phase de minéral amorphe au niveau des os (crâniens et longs) en développement (Mahamid *et al.* 2011). Du minéral amorphe, séquestré dans des vésicules, avait déjà été identifié au niveau du fémur d'embryon de poulet (Gay *et al.* 1978). Chez le poisson zèbre, des vésicules intracellulaires contenant du phosphate de calcium ont été

observées dans la nageoire dorsale par une analyse de cryo-microscopie électronique (Mahamid *et al.* 2010). Une récente étude de cryo-microscopie a également repéré des vésicules contenant du minéral dans les ostéoblastes mais aussi dans le milieu extracellulaire, entre les vaisseaux sanguins et la surface de formation des os longs d'embryon de poulet (Kerschnitzki *et al.* 2016a). Dans une autre étude sur les os d'embryon de poulet, ces vésicules ont aussi été retrouvées à l'intérieur des vaisseaux sanguins (Kerschnitzki *et al.* 2016b). Une analyse *in vitro* examinant les ostéoblastes confirme la présence de vésicules intracellulaires transportant le minéral au niveau de la matrice extracellulaire (Boonrungsiman *et al.* 2012).

Ce mécanisme de pré-formation du minéral *via* des vésicules pourrait également être impliqué dans des pathologies associées à la calcification cardiovasculaire (New et Aikawa 2013).

Les connaissances actuelles sur le rôle des vésicules et leurs acteurs moléculaires clefs dans le transport du minéral au niveau des tissus dentaires ou osseux :

Dans ce système, les ions calcium (Ca^{2+}) et phosphate (PO_4^{3-}) s'accumulent à l'intérieur des vésicules jusqu'à leur transformation en phosphate de calcium amorphe (ACP) (Wu *et al.* 1996, Anderson *et al.* 2005). Les premiers évènements de cristallisation ont alors lieu à l'intérieur des vésicules (Hasegawa *et al.* 2017). Les cristaux d'hydroxyapatites seront ensuite libérés par les vésicules au niveau de la matrice extracellulaire.

De nombreuses études se sont intéressées au mécanisme de formation du minéral intravésiculaire. Les vésicules extracellulaires contiennent plusieurs protéines et enzymes, situées dans la lumière ou au niveau de la membrane. Ces molécules fournissent un environnement adapté à la formation du minéral. Les acteurs moléculaires majeurs qui ont été reportés sont TNAP (tissue non specific alkaline phosphatase), NPP1 (nucleotide pyrophosphate phosphodiesterase), PHOSPHO1 (orphan phosphatase 1), PIT1 (phosphate transporter 1), SMPD3 (phosphodiesterase 3), ANX (annexines), et des phospholipides membranaires (sphingomyéline et cholestérol) et acides (phosphatidylsérines, PS) (Balcerzak *et al.* 2003, Anderson *et al.* 2005, Golub 2009, Cui *et al.* 2016, Hasegawa *et al.* 2017, Bottini *et al.* 2018). Ces acteurs moléculaires agissent en association pour incorporer les précurseurs et former le minéral au sein de la vésicule. Les trois phosphatases PHOSPHO1, NPP1 et TNAP contrôlent le ratio Ppi (pyrophosphate inorganique)/Pi (phosphate inorganique) afin de réguler la formation du minéral. En condition physiologique, Ppi inhibe la minéralisation alors que Pi favorise cette dernière. PHOSPHO1 est présent dans la lumière des vésicules et permet la

libération du Pi à partir de la phosphocholine dérivée de la sphingomyéline sous l'action de SMPD3, également située sur la membrane vésiculaire interne. NPP1 et TNAP sont localisées sur la membrane externe des vésicules et régulent le ratio Ppi/Pi à l'extérieur des vésicules. NPP1 fournit le Pi et le Ppi à partir d'ATP et TNAP hydrolyse l'ATP et le Ppi pour former le Pi. PIT1 incorpore ensuite le Pi dans les vésicules (Bottini *et al.* 2018). Les phospholipides, telles que les PS, collaborent avec les protéines annexines, au niveau de la membrane, pour introduire le Ca^{2+} et le PO_4^{3-} dans la vésicule. En effet, les annexines sont retrouvées dans la lumière vésiculaire ou sur leur membrane où elles forment des canaux calciques en présence de PS (Rojas *et al.* 1992, Kirsch *et al.* 2000, Anderson *et al.* 2005, Golub 2009, Hasegawa *et al.* 2017). Les PS possèdent également des propriétés de liaison au calcium qui permettrait d'attirer ces derniers (Golub 2009, Wuthier et Lipscomb 2011, Cui *et al.* 2016). Ainsi, les concentrations élevées de Ca^{2+} et Pi dans la vésicule (Balcerzak *et al.* 2003), permettent la formation d'une forme de phosphate de calcium amorphe (ACP) (Anderson *et al.* 2005). L'association entre le Ca^{2+}, le PS et l'ACP forme un complexe de nucléation intravésiculaire (Merolli et Santin 2009, Wu *et al.* 2009, Azoidis *et al.* 2018). Ce complexe a été retrouvé aux stades précoces de la minéralisation osseuse, cartilagineuse et de la dent (Boskey et Posner 1976, Cui *et al.* 2016). Il a également été exploré dans des modèles de vésicules *in vitro* (Wu *et al.* 1996, Genge *et al.* 2007). Le minéral amorphe se transforme alors en une phase cristalline *via* ce complexe (Anderson *et al.* 2005). Les membranes vésiculaires seraient ensuite déstructurées par la croissance cristalline et l'action de phospholipases, ce qui permettrait la libération du matériel séquestré (Wuthier et Lipscomb 2011, Cui *et al.* 2016, Azoidis *et al.* 2018). Ces vésicules contenant du minéral se lieraient à la matrice extracellulaire collagénique (site de formation du biominéral) *via* des protéines de liaison aux fibrilles de collagènes comme les annexines ou TNAP afin de permettre la croissance du biominéral (Bottini *et al.* 2018). La **figure 14** représente un schéma illustrant ce mécanisme vésiculaire.

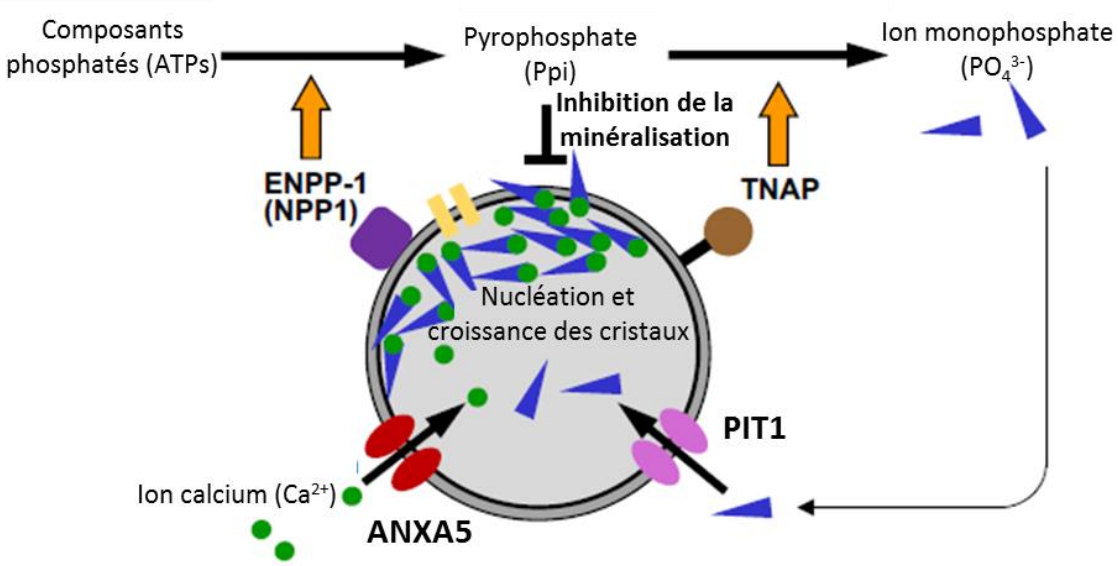


Figure 14. Schéma illustrant le mécanisme de la minéralisation osseuse médiée par les vésicules extracellulaires. (Hasegawa *et al.* 2017).

Des protéines complémentaires ont été associées à ce mécanisme de transport vésiculaire. C'est le cas des MMPs (matrix metalloprotéinases), des intégrines, de la BSP (bone sialoprotein), de l'OPN (ostéopontine) et de la CA2 (anhydrase carbonique 2) (Anderson *et al.* 2005, Golub 2009, Bottini *et al.* 2018). Cette dernière maintiendrait le pH vésiculaire (Stechschulte *et al.* 1992, Anderson 2003).

Même si la biogénèse de ces vésicules reste à éclaircir, des études ont identifié de potentiels acteurs clefs de ce phénomène. Les protéines Rabs, Vamps, VPSs, SNAPs ou encore PDCD6IP, TSG101, et Syntenin-1 (*Sdcbp*) en sont des exemples (Anderson *et al.* 2005, Shapiro *et al.* 2015).

Analyses protéomiques des vésicules extracellulaires minéralisantes :

Plusieurs analyses protéomiques ont été effectuées sur des vésicules extracellulaires impliquées dans différents systèmes de biominéralisation.

Balcerzak et collaborateurs ont réalisé un protéome de vésicules extracellulaires isolées à partir de fémurs d'embryon de poulet (Balcerzak *et al.* 2008). Ils ont ainsi identifié 126 protéines impliquant des protéines de la matrice extracellulaire (Collagen type VI, proteoglycan link protein 1) et du cystosquelette (β-actin), des annexines (ANXA5, -6, -2), des protéines associées aux transports ioniques (Na^+/K^+ ATPase, TRPV4), des enzymes (alkaline phosphatase, NPP1) et des protéines de régulation (Syntenin-1).

En 2007, une analyse protéomique sur des vésicules extracellulaires provenant d'ostéoblastes minéralisants en culture a été conduite (Xiao *et al.* 2007). Un total de 133 protéines a été identifié et les protéines majoritaires ont été classées en 11 groupes : les protéines de la matrice extracellulaire (Emilin 1, MMP-2), les enzymes extracellulaires (Aminopeptidase A and N), les protéines de la membrane extracellulaire (Integrine-α5 and -β3), les récepteurs/transporteurs (Voltage dep. Anion channel-2), les protéines du cytosquelette (α-actinin 1 and 4), les protéines micellaires (Filamin A, Ceruloplasmin), les protéines de signal (Ras-GTPase), les protéines Rabs (Rab 7 and 14), les protéines vésiculaires (Synaptomenal complex pro.1), les régulateurs de calcium (ANX 1, -2, -5) et les enzymes intracellulaires (Peroxiredoxin 1 and 2).

Une étude de 2015 a comparé les protéomes de vésicules provenant d'ostéoblastes humains minéralisants ou non dans un contexte tumoral (Morhayim *et al.* 2015). Ils ont ainsi repéré 26 protéines spécifiques des vésicules extracellulaires d'ostéoblastes minéralisants et 4 protéines spécifiques des vésicules extracellulaires d'ostéoblastes non minéralisants. En outre, les estimations d'abondances protéiques ont révélé que les protéines vésiculaires connues ANXA2, GAPDH, CD9, ENO1, and PDCD6IP étaient les plus abondantes dans les deux types vésiculaires.

Une analyse de protéomique sur des ostéoblastes en culture a révélé que 19 protéines de liaison au calcium, incluant Grp94, calnexin, calreticulin, calmodulin, et S100A4/A10, étaient surabondantes dans les vésicules extracellulaires lors de stimulation de minéralisation (Zhou *et al.* 2013).

Rosenthal et collaborateurs ont exécuté une analyse protéomique de vésicules extracellulaires issues de cartilage sain ou dans un contexte d'ostéoarthrite (Rosenthal *et al.* 2011). Un ensemble de 170 protéines a été identifié. Ces dernières incluaient des composants de la matrice extracellulaire ou du cytosquelette, des enzymes et des protéines de liaison aux phospholipides. Parmi celles-ci, quelques protéines étaient spécifiques d'un type cartilagineux et d'autres affichaient des variations d'abondance.

En 2015, une revue de synthèse a dressé un état des connaissances des protéines des vésicules extracellulaires impliquées en biominéralisation (Shapiro *et al.* 2015). Au total, ils ont recensé 280 protéines identifiées à travers les différentes études de protéomique. Les auteurs ont également établi une liste des protéines fréquemment retrouvées dans ce type de vésicules extracellulaires. Cette liste a été ordonnée en 11 groupes selon la fonction des protéines.

4. Le processus de biominéralisation de la coquille d'œuf de poule

La coquille d'œuf résulte d'un phénomène de biominéralisation contrôlée extracellulaire carbonatée. Ce processus de biominéralisation, considéré comme le plus rapide des vertébrés, se déroule dans la partie distale de l'oviducte, qui constitue l'espace biologiquement compartimenté nécessaire à la biominéralisation de l'œuf. Les premiers évènements de nucléation ont lieu dans l'isthme et la majeure partie du processus se produit dans l'utérus (Nys *et al.* 2001, Nys et Gautron 2007). Tout au long de la formation de la coquille, le fluide utérin baigne l'œuf. Ce fluide acellulaire contient tous les précurseurs minéraux et organiques nécessaires à la calcification de la coquille (Nys *et al.* 1991, Gautron *et al.* 1997, Nys et Gautron 2007).

4.1. Apport des précurseurs minéraux sur le site de minéralisation

La formation de 6 g de coquille en 19 h représente un effort métabolique remarquable pour un animal pesant moins de 2 kg. Cette formation nécessite un apport conséquent d'ions calcium et bicarbonates, précurseurs du carbonate de calcium. Dans le fluide utérin, les concentrations respectives en ions calcium et bicarbonates sont environ de 6 à 10 mM et de 70 mM (Nys *et al.* 1991, Nys *et al.* 2010). Ainsi, le produit de solubilité de la calcite, polymorphe cristallin de la coquille, est dépassé de 80 à 100 fois durant toute la minéralisation (Nys *et al.* 1991).

Les précurseurs minéraux ne sont pas stockés dans l'utérus avant la calcification de la coquille. Seuls les modèles de transferts transcellulaires des ions ont été décrits dans l'utérus de poule. Dans ces modèles, les ions calcium et bicarbonates, qui proviennent du sang, sont transférés dans le fluide *via* les cellules utérines (Sauveur et De revier 1988, Nys *et al.* 1999, Nys *et al.* 2010, Nys et Le Roy 2018). Des schémas globaux et cohérents des transports et échanges ioniques à travers la cellule utérine glandulaire ont été établis (**Figure 15**) (Jonchere *et al.* 2012, Brionne *et al.* 2014).

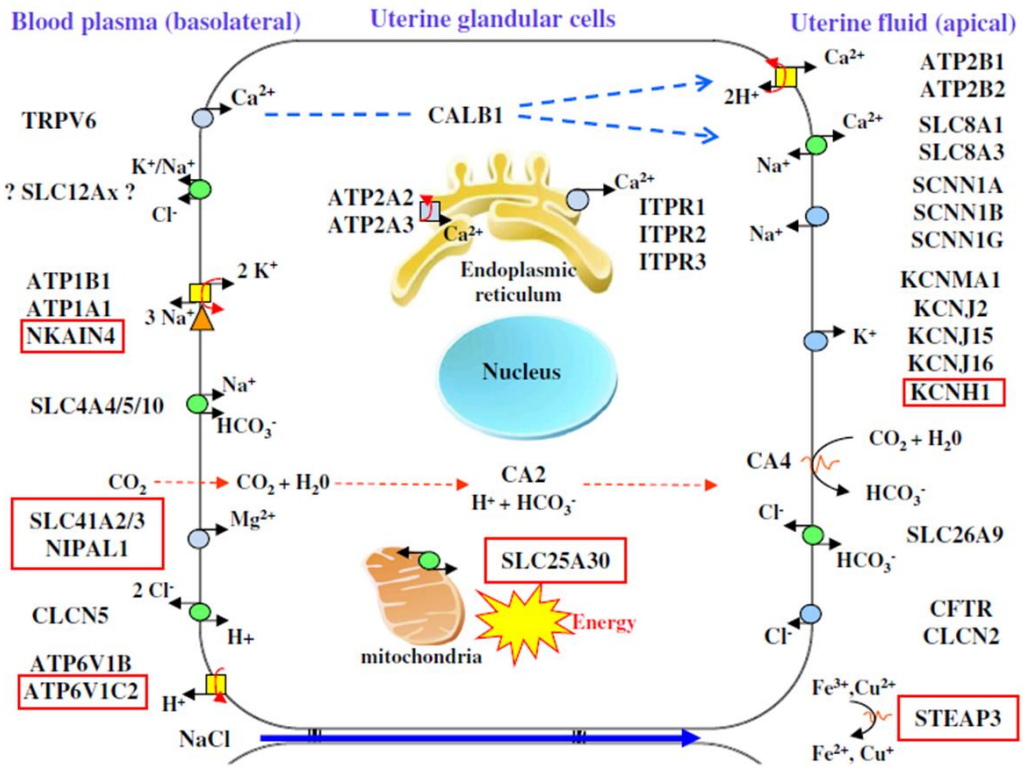


Figure 15. Schéma global décrivant les transporteurs ioniques utérins impliqués dans la biominéralisation de la coquille d'œuf de poule. Dans ce modèle transcellulaire, les ions précurseurs du minéral proviennent du sang et transitent dans les cellules utérines glandulaires afin de rejoindre le fluide utérin. (Brionne *et al.* 2014).

Apport des ions calcium (Ca^{2+})

La source de calcium est toujours d'origine alimentaire. Toutefois, du fait d'une désynchronisation entre l'apport alimentaire diurne et la formation de la coquille nocturne, une part importante des ions calcium qui composent la coquille (30-40%) provient des os (Nys et Guyot, 2011). Les oiseaux possèdent un os médullaire, situé le long des os longs, qui facilite la solubilisation du calcium. Au cours de la calcification, la surface de résorption de cet os est ainsi multipliée par 9. L'os labile est ensuite reconstitué par une activité ostéoblastique, durant la journée, entre deux processus de formation de la coquille. Le reste du calcium qui compose la coquille (60 %) est directement fourni par la voie intestinale, sans stockage osseux. Cela explique le développement d'un appétit calcique spécifique chez la poule.

Les ions calcium sont prélevés dans le plasma sanguin *via* des canaux calciques de type TRPV. Les premières études avaient identifié le canal calcique TRPV6 comme étant le candidat majeur pour assurer ce rôle (Jonchere *et al.* 2012, Yang *et al.* 2013). Toutefois, une analyse RNA-Seq, récemment effectuée dans notre laboratoire, ne permet pas de confirmer l'expression

du gène encodant TRPV6 dans l'utérus de la poule (Gautron 2017a). TRPV2 et TRPV3 sont deux autres candidats potentiels qui pourraient assurer l'entrée du calcium dans les cellules utérines (Nys et Le Roy 2018). Des analyses complémentaires sont nécessaires afin d'identifier de manière certaine, l'acteur moléculaire responsable de l'apport en calcium dans les cellules utérines. A l'intérieur des cellules utérines, le calcium est ensuite transporté par la calbindine-1 (CALB1) et peut aussi être stocké dans le réticulum endoplasmique *via* les pompes à calcium sarcoplasmiques ATP2A2 et ATP2A3 (Nys et Guyot 2011, Nys et Le Roy 2018). Le calcium du réticulum endoplasmique est ensuite libéré par les récepteurs inositol triphosphates ITPR1, ITPR2 et ITPR3 (Nys et Le Roy 2018). Les ions calcium sont finalement exportés dans le fluide utérin par des pompes à calcium de la membrane plasmique (ATP2B1 et ATP2B2) et des échangeurs Ca^{2+}/Na^{+} (Nys et Guyot 2011, Nys et Le Roy 2018).

Apport des ions bicarbonates (HCO_3^-)

Le gaz carbonique sanguin (CO_2) constitue la source des ions bicarbonates nécessaires à la minéralisation de la coquille. Les ions bicarbonates peuvent être directement transférés du plasma sanguin vers les cellules utérines par une famille de co-transporteurs HCO_3^-/NA^+ (SLC4A4, SLC4A5 et SLC4A10) (Nys et Guyot 2011, Nys et Le Roy 2018). De manière alternative, le CO_2 peut pénétrer dans les cellules glandulaires utérines par simple diffusion (Hodges et Lörcher 1967). Le CO_2 se retrouvant ainsi dans les cellules est alors hydraté en ions HCO_3^-, sous l'action de l'anhydrase carbonique 2 (CA2), qui catalyse cette réaction (Nys et Guyot 2011, Nys et Le Roy 2018). Les ions bicarbonate générés sont finalement libérés dans le fluide utérin *via* un échangeur $Cl^-/HCO3^-$ (SLC26A9). La réaction $CO_2 + H_2O = HCO_3^- + H^+$ peut également avoir lieu directement dans le fluide utérin *via* l'action d'une autre enzyme de la famille des anhydrases carbonique, l'anhydrase carbonique 4 (CA4) (Nys et Guyot 2011, Nys et Le Roy 2018). En effet, cette enzyme possède son site actif dans le milieu extracellulaire (Zhu et Sly 1990).

Maintien de l'homéostasie cellulaire et apport des autres minéraux (Mg, Fe, Cu)

Les faibles quantités de magnésium, fer et cuivre sont également importées dans la cellule *via* des transporteurs ou des catalyseurs (**Figure 15**). Parmi les acteurs moléculaires ou leurs sous-unités identifiés, on retrouve STEAP3, NIPAL1 et SLC41A2-3 (Brionne *et al.* 2014).

Afin de maintenir l'homéostasie cellulaire durant l'apport des précurseurs ioniques, des transferts additionnels d'ions Na^+, K^+, Cl^- sont réalisés par les cellules utérines. Cette maintenance physiologique de la concentration ionique dans les cellules implique des

échangeurs Na^+/Ca^{2+}, des canaux Na^+, des pompes Na^+/K^+-ATPase et une pompe à protons (**Figure 15**) (Brionne *et al.* 2014, Nys et Le Roy 2018). Parmi eux, on retrouve les acteurs moléculaires ou les sous-unités NKAIN4, ATP6V1C2, KCNH1, KCNJ2 et KCNJ16 (Brionne *et al.* 2014).

4.2. Principales phases de la biominéralisation de la coquille d'œuf de poule

La biominéralisation de la coquille se décompose en 3 phases majeures (**Figures 16** et **17**).

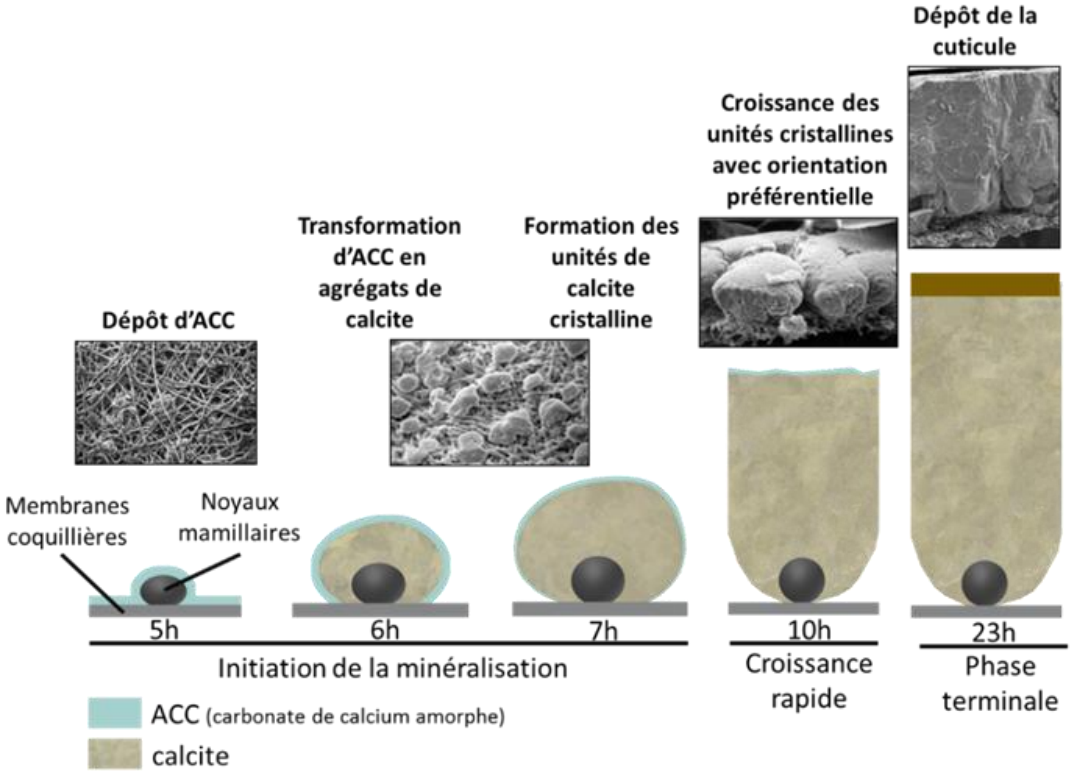


Figure 16. Les évènements clefs de la minéralisation de la coquille d'œuf de poule. Adapté de (Marie *et al.* 2015b, Gautron 2017b).

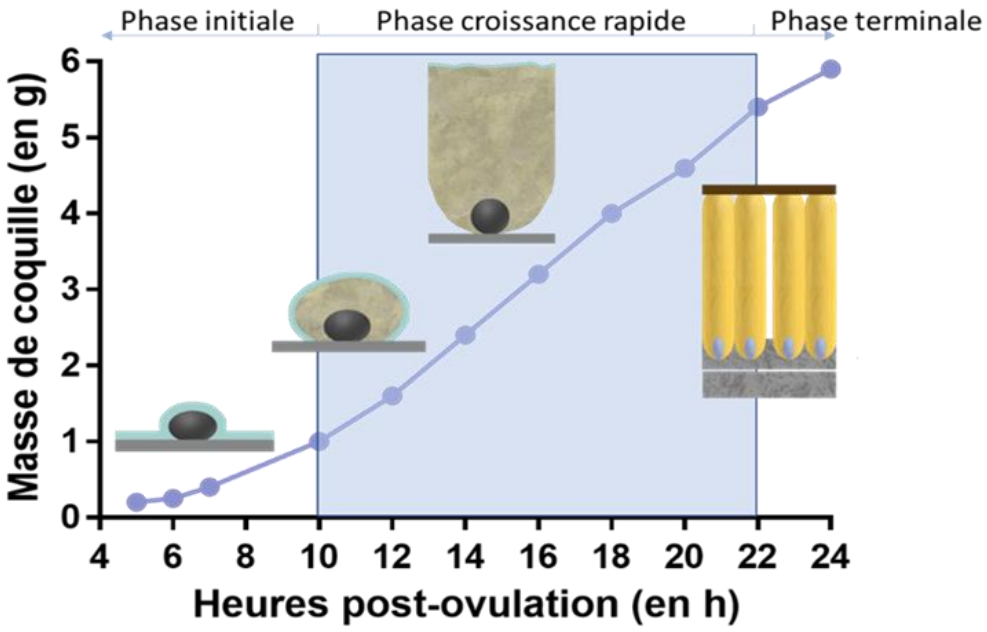


Figure 17. Cinétique de dépôt du minéral lors de la minéralisation de la coquille d'œuf de poule. Adapté de (Nys *et al.* 2010, Gautron 2017b).

L'initiation de la minéralisation de 5 à 10 heures après l'ovulation, correspond à deux évènements majeurs : le dépôt des noyaux mamillaires sur les membranes coquillières et le dépôt simultané du carbonate de calcium. Cette phase débute dans l'isthme rouge à 5 h post-ovulation (p.o.) et se poursuit dans l'utérus. La vitesse de dépôt du minéral est faible (≈ 0,1 g/h) (**Figure 17**). Au sein de cette phase, l'apparition des premiers cristaux peut se diviser en 3 évènements clefs :

- Le dépôt massif de carbonate de calcium amorphe sur la totalité de la surface des membranes coquillières, y compris au niveau des noyaux mammillaires (**Figure 18**).

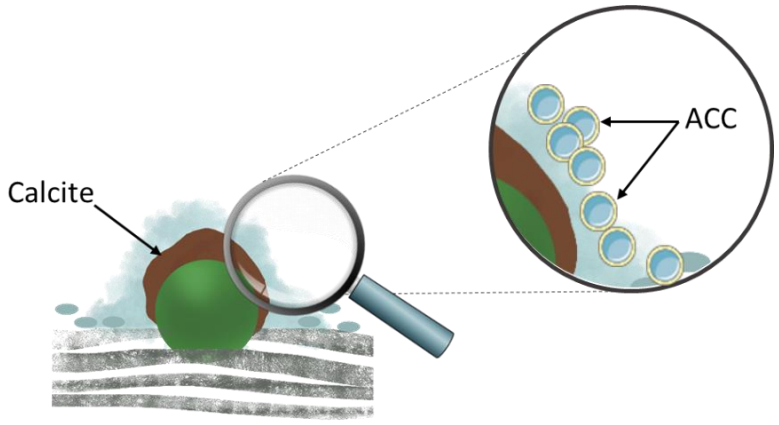


Figure 18. Dépôt du carbonate de calcium sur les noyaux mamillaires. Adapté de (Rodriguez-Navarro *et al.* 2015).

- La transformation du carbonate de calcium amorphe en agrégats de calcite sur les noyaux mammillaires (**Figure 18**). Lors de cette étape, les cristaux croissent de façon sphérulitique, sans orientation privilégiée (étape 1 sur la **Figure 19**) (Rodriguez-Navarro et Garcia-Ruiz 2000). La croissance est inhibée vers l'intérieur par les membranes coquillières.

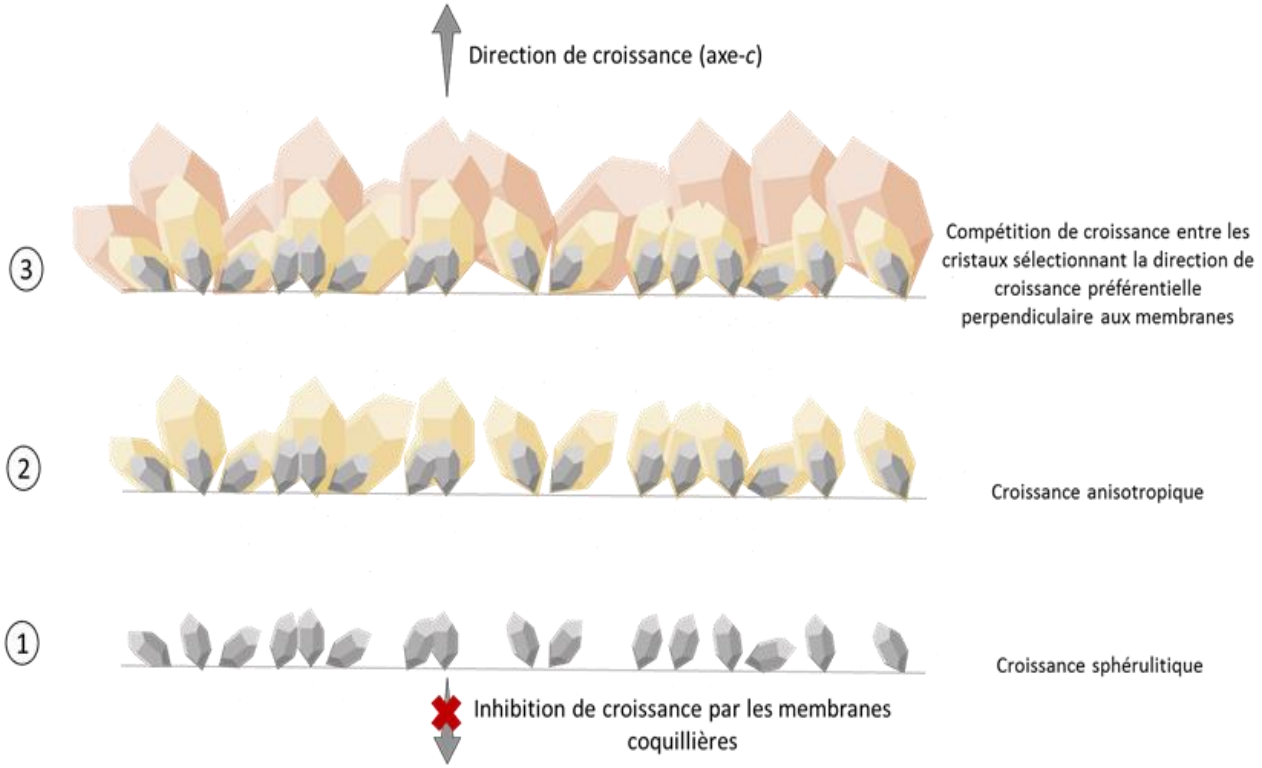


Figure 19. Modélisation de la croissance des cristaux de carbonate de calcium au cours de la biominéralisation de la coquille d'œuf de poule. Adapté de (Rodriguez-Navarro et Garcia-Ruiz 2000).(Nys *et al.* 2010, Gautron 2017b).

- La formation des unités de calcite cristalline. Lors de cette étape, la croissance des cristaux est anisotropique. Elle est donc différente selon les directions de l'espace (étape 2 sur la **Figure 19**). Cette croissance est induite par l'adsorption hydrostatique ou hydrophobe de protéines de la matrice organique sur les faces cristallines parallèle à l'axe-*c*, inhibant ainsi la croissance cristalline dans les directions perpendiculaires à ce dernier (Rodriguez-Navarro et Garcia-Ruiz 2000, Hernandez-Hernandez *et al.* 2008a, Hernandez-Hernandez *et al.* 2008c, Nys *et al.* 2010). Le cristal formé possède alors une forme allongée (**Figure 20**).

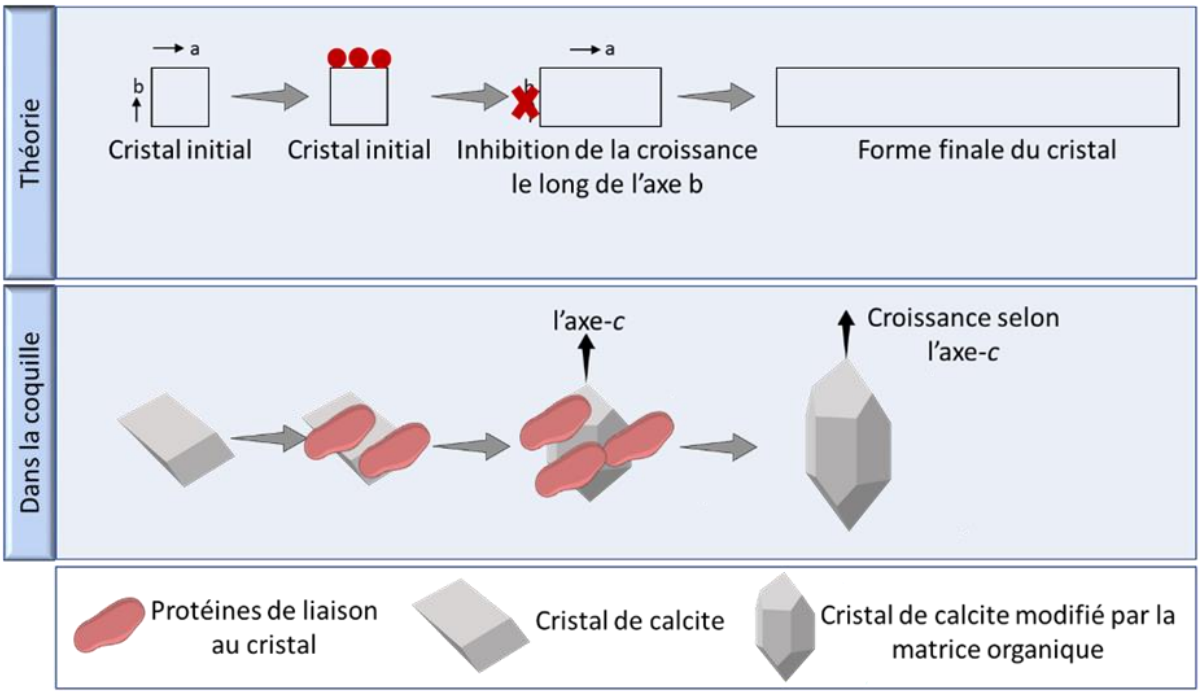


Figure 20. Inhibition de la croissance cristalline *via* l'adsorption de protéines (Addadi et Weiner 1985, Gautron 2017b).

La **phase de croissance rapide** s'étale de 10 h à 22 h post-ovulation. Cette phase se caractérise par un dépôt rapide du minéral (≈ 0,33 g/h) qui conduit à la fusion des cônes adjacents pour former la couche compacte de minéraux (couche palissadique). Lors de cette mise en place cristalline, il y a une compétition entre les cristaux adjacents (étapes 2 et 3 sur la **Figure 19**). En effet, lorsque deux cristaux adjacents se rejoignent, leur croissance est inhibée. Ainsi, seuls les cristaux dont la croissance suit un axe perpendiculaire à la surface de l'œuf pourront se développer sur la totalité de l'épaisseur de la coquille. C'est ce phénomène qui entraine progressivement une orientation privilégiée des cristaux avec un axe-c perpendiculaire à la surface de l'œuf.

La **phase terminale** se produit 2 h avant l'expulsion de l'œuf. Elle débute par le dépôt d'une fine couche de cristaux verticaux à la surface de la couche palissadique (couche des cristaux verticaux). Elle se poursuit par l'arrêt de la minéralisation et le dépôt de la cuticule sur toute la surface de la coquille. En fin de minéralisation, le fluide utérin reste sursaturé en ions. L'arrêt de la calcification semble être d'avantage lié à une inhibition de la minéralisation, par un constituant phosphoré qui proviendrait des phosphoprotéines (Gautron *et al.* 1997, Nys *et al.* 2010). En effet, le phosphore est un inhibiteur connu de la cristallisation carbonatée (Lin et

Singer 2005, Nys *et al.* 2010). Cela expliquerait la présence du phosphore essentiellement au niveau de la couche superficielle de la coquille (Quintana *et al.* 1978, Cusack *et al.* 2003).

4.3. La matrice organique de la coquille d'œuf

La matrice organique de la coquille d'œuf est composée de protéines, protéoglycanes et polysaccharides (Tullet 1987, Nys *et al.* 1999, Gautron et Nys 2007a, Gautron et Nys 2007b). Elle joue un rôle clef dans le processus de formation de la coquille et participe aux défenses naturelles de l'œuf *via* des protéines à propriétés antimicrobiennes (Nys *et al.* 2001, Gautron et Nys 2007b, Gautron *et al.* 2019).

4.3.1. Mise en évidence du rôle de la matrice organique dans la minéralisation

Plusieurs arguments supportent le rôle fonctionnel des protéines de la matrice organique dans la formation de la coquille.

Le premier argument est **l'évolution du profil protéique du fluide utérin** au cours des différentes étapes de la minéralisation (**Figure 21**). En effet, le profil électrophorétique du fluide utérin est spécifique de chaque stade de la minéralisation, ce qui suggère une adaptation de la composition protéique au cours du processus (Gautron *et al.* 1997). Les différentes étapes du processus seraient ainsi contrôlées par des protéines différentes.

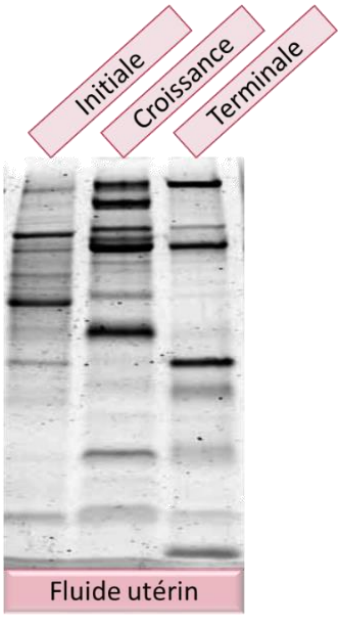


Figure 21. Evolution du profil protéique du fluide utérin au cours des 3 phases principales de la minéralisation de la coquille. Adapté de (Gautron *et al.* 1997).

La présence de macromolécules ayant des propriétés de liaison au calcium, dans des fractions protéiques de la matrice organique (Abatangelo *et al.* 1978, Hincke *et al.* 1992), du fluide utérin (Gautron *et al.* 1997) et de fractions riches en protéoglycanes à kératanes et dermatanes sulfates de la coquille (Arias *et al.* 1993), démontre une interaction entre la phase minérale et la phase organique durant la calcification de la coquille. Ce rôle de la matrice organique dans la minéralisation de la coquille d'œuf, a depuis été confirmée, *via* des études *in vitro*, *in vivo* et des approches génétiques.

La mesure de la vitesse de précipitation du carbonate de calcium ***in vitro***, en présence de protéines extraites de la coquille d'œuf, a un effet inhibiteur sur cette précipitation, d'une manière dose-dépendante (Wheeler *et al.* 1981, Arias *et al.* 1993, Gautron *et al.* 1996). De plus, la cristallisation du carbonate de calcium *in vitro* est fortement modifiée en présence de fluide utérin (Gautron *et al.* 1997). En effet, les constituants du fluide utérin sélectionnent la calcite comme type polymorphique, diminuent le temps de formation des cristaux, augmentent le nombre de cristaux formés ainsi que leur taille et modifient leur morphologie (**Figure 22**) (Dominguez-Vera *et al.* 2000, Hernandez-Hernandez *et al.* 2008a, Hernandez-Hernandez *et al.* 2008b, Hernandez-Hernandez *et al.* 2008c). Ces observations sont valables quel que soit le stade de prélèvement du fluide utérin (initial, croissance, terminal). Des tests de cristallisation *in vitro* de carbonate de calcium en présence de fraction de matrice soluble extraite de la coquille ont également été réalisés. Les résultats indiquent des changements significatifs de la cinétique de formation des cristaux, de leur taille et de leur morphologie (Gautron *et al.* 1996, Hernandez-Hernandez *et al.* 2008b, Hernandez-Hernandez *et al.* 2008c).

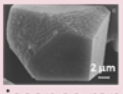
Influence du fluide utérin sur la minéralisation de la coquille					
	Concentration protéique (µg/mL)	Temps de latence (min)	Nombre de cristaux	Type polymorphique	Taille des cristaux (µm)
Contrôle	0	≈900	40	calcite 55%, aragonite 23%, vatérité 22%	100-200
Fluide utérin stade initial	92	<0,2	>10 000	Calcite 100%	6-20
Fluide utérin stade croissance rapide	455	<0,2	>10 000	Calcite 100%	5-52
Fluide utérin stade terminal	163	<0,2	>10 000	Calcite 100%	5-22
Morphologie des cristaux de calcite	Témoin	Initiale	 Croissance rapide	Terminale	

Figure 22. Influence du fluide utérin sur la minéralisation de la coquille d'œuf de poule. Adapté de (Dominguez-Vera *et al.* 2000, Hernandez-Hernandez *et al.* 2008a, Hernandez-Hernandez *et al.* 2008b).

Des **relations entre la matrice organique de la coquille et ses propriétés mécaniques** ont également été montrées *in vivo*. De nombreux facteurs de variations nutritionnels, génétiques ou physiologiques affectent la solidité de la coquille (Nys *et al.* 2010). Ainsi, les poules en fin de production pondent des œufs ayant des capacités de résistance à la rupture diminuées. Une première étude a montré que la diminution de la proportion de coquille n'explique qu'une part de cette réduction de solidité (Panheleux *et al.* 2000). Cette dernière coïncide avec une modification des proportions de certaines protéines de la matrice organique de coquille qui affecte sa texture cristallographique (Panheleux *et al.* 1999a, Rodriguez-Navarro et Romanek 2002). Une seconde étude a utilisé le modèle de la mue pour faire varier la solidité de la coquille. Dans cette étude, des œufs pondus par les mêmes poules avant et après leur mue ont été comparés. Les œufs collectés après la mue présentent une augmentation de solidité de leur coquille. De plus, cette amélioration des propriétés mécaniques entraine une augmentation de la quantité relative de protéines spécifiques de la matrice organique et une diminution de la quantité relative de protéines non spécifiques (Ahmed *et al.* 2005).

Par ailleurs, le lien entre matrice organique et solidité de la coquille est renforcé par des **analyses génomiques des gènes codants pour des protéines de la matrice organique**. Une étude a établi des liens entre des polymorphismes de gènes codant pour des protéines de la matrice et les mesures phénotypiques de la coquille. La protéine ostéopontine a ainsi été associée à la dureté de la coquille, l'ovocléidine-116 à l'élasticité et l'épaisseur de la coquille et l'ovocalyxine-32 à l'épaisseur de la couche mamillaire (Dunn *et al.* 2009a, Rome et Le Roy 2016). Des QTLs (un Quantitative Trait Locus est une région du génome qui contient ou non des gènes ayant un effet sur un caractère quantitatif) associés à des paramètres morphologiques de la coquille ont également été identifiés sur les chromosomes 9 et Z de la poule (Tuiskula-Haavisto *et al.* 2002, Ankra-Badu et Aggrey 2005, Takahashi *et al.* 2009). Une récente étude a comptabilisé un total de 118 QTLs associés à la solidité de la coquille (Rome et Le Roy 2016). Parmi eux, 24 sont impliqués dans la résistance à la rupture (Sasaki *et al.* 2004, Dunn *et al.* 2009a, Jiang *et al.* 2010, Yao *et al.* 2010, Liu *et al.* 2011, Tuiskula-Haavisto *et al.* 2011) et 33 dans la rigidité des coquilles (Dunn *et al.* 2009a, Takahashi *et al.* 2010, Tuiskula-Haavisto *et al.* 2011, Wolc *et al.* 2014). En outre, un QTL commun aux caractères « résistance à la rupture » et « rigidité » des coquilles a été retrouvé sur le chromosome 2 (Tuiskula-Haavisto *et al.* 2011). D'autres QTLs communs à plusieurs paramètres de qualité de coquille (poids de coquille, pourcentage de coquille, épaisseur de coquille, force de fracture, et rigidité) ont été identifiés (Rome et Le Roy 2016). De manière plus précise, différents gènes ont été associés à la qualité de coquille. *Esr1* (chromosome 3) (Dunn *et al.* 2009a) est un gène qui affecterait la rigidité de la coquille alors que les gènes *Pth* (chromosome 5) (Jiang *et al.* 2010), 2010), *Lrp8* (chromosome 8) (Yao *et al.* 2010) et *Rarres1* (*OCX-32*, chromosome 9), seraient des gènes impliqués dans la résistance à la rupture. Dans la filière œuf, ces travaux contribuent à l'amélioration génétique conjointe des caractères de production et de qualité de coquille des poules pondeuses.

4.3.2. Composition protéique de la matrice organique de la coquille

De nombreuses études ont été établies pour identifier et caractériser les protéines de la matrice organique et ainsi, établir leurs rôles dans le processus de minéralisation. Les premières identifications et caractérisations des protéines de la matrice organique de la coquille ont été réalisées *via* des méthodes biochimiques et moléculaires (avant 2006) (Gautron *et al.* 2007b). Seules 11 protéines de la coquille avaient pu être identifiées par ces méthodes classiques. Depuis, le développement des méthodes dites « Omiques » (protéomique et transcriptomique adossées au développement d'outils bioinformatiques), a permis d'accroître considérablement

l'identification des protéines de la matrice organique qui en quelques années est passée d'une dizaine à plusieurs centaines (Gautron *et al.* 2010).

Identification par des méthodes biochimiques et moléculaires :

Une combinaison de techniques séparatives, biochimiques et immunologiques (Western blotting, immunohistochimie, immunofluorescence, et immunocytochimie) renforcées dès les années 90 par des analyses moléculaires (clonage, séquençage, criblage d'expression, Northern et Southern blotting, qRT-PCR), a permis d'identifier 11 des protéines les plus abondantes de la coquille et du fluide utérin (Gautron *et al.* 2007b, Gautron et Nys 2007a, Gautron et Nys 2007b, Rose et Hincke 2009).

Ces protéines peuvent être classées en 3 groupes (Gautron *et al.* 1997, Nys *et al.* 2004, Nys *et al.* 2010) :

Les **protéines initialement identifiées dans le blanc d'œuf**. Ce groupe comprend l'ovalbumine (Hincke 1995), le lysozyme (Hincke *et al.* 2000) et l'ovotransferrine (Gautron *et al.* 2001b). Le lysozyme et l'ovotransferrine sont présents en majorité au niveau des membranes coquillières et de la couche mamillaire, bien que le lysozyme soit également retrouvé dans la partie basale de la couche palissadique. L'ovalbumine est principalement retrouvée au niveau des noyaux mamillaires. Dans le fluide utérin, la concentration en ovotransferrine et en ovalbumine est plus élevée durant la phase initiale alors que la concentration en lysozyme est plus importante au moment de la croissance rapide. Le lysozyme et l'ovotransferrine sont bien connus pour leurs propriétés antibactériennes. Ces 3 protéines modifient également la morphologie des cristaux de calcite obtenus *in vitro* (Hincke *et al.* 2000, Gautron *et al.* 2001b, Dombre *et al.* 2017).

Les **protéines** ostéopontine et clusterine qui sont **ubiquitaires**. L'ostéopontine est une glycoprotéine phosphorylée qui est présente dans plusieurs tissus durs des oiseaux et des mammifères (Pines *et al.* 1995, Guérin-Dubiard *et al.* 2010). Cette protéine est retrouvée dans les membranes coquillières, les noyaux mamillaires, et la couche palissadique de la coquille d'œuf (Fernandez *et al.* 2003, Hincke *et al.* 2008, Chien *et al.* 2009). La clusterine est une glycoprotéine extracellulaire retrouvée dans divers tissus. Elle est repérée à travers toute la coquille avec une surabondance au niveau de la partie supérieure de la couche palissadique, de la couche de cristaux verticaux et de la couche mamillaire (Mann *et al.* 2003).

Les **protéines spécifiques** de la coquille d'œuf de poule et uniquement sécrétées par les segments de l'oviducte responsables de la formation de la coquille (isthme rouge et utérus).

Ces protéines ont été renommées ovocléidine ou ovocalyxine et sont suivies de leur masse moléculaire apparente (Gautron *et al.* 2001a, Nys *et al.* 2001, Gautron et Nys 2007b, Gautron et Nys 2007a). La première protéine de la coquille à avoir été purifiée est l'ovocléidine-17 (Hincke *et al*. 1995). Elle est synthétisée par les cellules tubulaires de l'utérus et sécrétée dans le fluide utérin où elle est incorporée dans la coquille. On la retrouve à travers toute la coquille et plus abondamment au niveau des noyaux mamillaires (Hincke *et al.* 1995). L'ovocléidine-116 est le premier gène codant pour une protéine de la coquille à avoir été cloné (Hincke *et al.* 1999). La protéine codée est sécrétée spécifiquement par les cellules épithéliales de l'utérus (Hincke *et al.* 1999). Il s'agit du cœur protéique d'un protéoglycane riche en dermatane sulfate (Carrino *et al.* 1997). L'ovocléidine-116 est localisée dans la couche palissadique et la région mamillaire de la coquille (Hincke *et al.* 1999). L'ovocalyxine-32 est synthétisée par les cellules épithéliales de l'utérus au stade terminal de la minéralisation. Sa présence majoritaire en surface de la coquille suggère une implication dans l'arrêt de la calcification (Gautron *et al.* 2001a). L'ovocalyxine-36 est synthétisée par les cellules des glandes tubulaires de l'utérus (Gautron *et al.* 2007a). Elle est présente dans la totalité de la coquille avec une surabondance repérée dans la région entre les membranes coquillières et la couche mamillaire (Gautron et Nys 2007a). C'est une protéine appartenant à la famille des protéines de liaison aux lipopolysaccharides qui est apparentée aux Plunc, des protéines capables de se lier aux lipopolysaccharides des bactéries et exerçant une activité antimicrobienne (Gautron *et al.* 2007a, Gautron et Nys 2007a, Gautron et Nys 2007b, Gautron *et al.* 2011). Cette protéine correspond à une bande de 36 kDa qui lie le calcium dans le fluide utérin, au stade de croissance rapide de la formation de la coquille (Gautron *et al.* 2007a, Gautron et Nys 2007a). L'ovocalyxine-25 a été identifiée à travers un criblage d'expression d'une banque d'ADNc de l'utérus de poule (Gautron et Nys 2007a, Gautron et Nys 2007b). Cette protéine possède deux domaines inhibiteurs de protéases à sérine (Kunitz et WAP). Elle est fortement retrouvée au niveau de la cuticule et plus faiblement au niveau de la couche mamillaire. L'ovocalyxine-21 est une protéine présente dans le fluide utérin aux stades de croissance rapide et terminal de la calcification (Gautron et Nys 2007a).

Des anticorps dirigés contre des protéines de la coquille d'œuf de poule ont permis d'identifier des homologues chez d'autres espèces aviaires (caille, dinde, oie …) (Panheleux *et al.* 1999a, Panheleux *et al.* 1999b).

Identification par des méthodes à haut-débit :

Le développement de la génomique fonctionnelle a considérablement modifié l'étude de la biologie et les biotechnologies. Ces avancées ont permis l'essor des technologies d'analyses à haut-débit. Ces dernières ont eu un impact conséquent sur l'identification et la caractérisation des protéines de l'œuf et de sa coquille (Gautron *et al.* 2007b, Gautron *et al.* 2010). Ainsi, le nombre de protéines identifiées dans la coquille est passé de 11 à plus de 900 entre 2006 et 2019 (Gautron 2019, Gautron *et al.* 2019). Même si la majorité de ces protéines sont minoritaires en quantité, elles peuvent présenter des propriétés biologiques qui leur permettent d'être actives au cours de la biominéralisation.

L'identification des constituants de la matrice organique de la coquille a été possible *via* l'utilisation des outils d'analyse de la protéomique et de la transcriptomique :

Les analyses protéomiques : Afin d'identifier les protéines de la matrice organique de la coquille, différentes études de protéomique ont été réalisées durant ces 15 dernières années. Ces études concernent à la fois la matrice organique extraite de la coquille (Miksik *et al.* 2003, Mann *et al.* 2006, Mann *et al.* 2007, Miksik *et al.* 2010, Rose-Martel *et al.* 2012, Kaweewong *et al.* 2013, Sun *et al.* 2013, Miksik *et al.* 2014, Marie *et al.* 2015b, Rose-Martel *et al.* 2015, Cordeiro et Hincke 2016, Rath *et al.* 2016, Ahmed *et al.* 2017) et le fluide utérin (Sun *et al.* 2013, Marie *et al.* 2015a). Ces études sont présentées ici par ordre chronologique.

En 2006, la fraction soluble de la matrice organique a été analysée après extraction à partir de coquille décalcifiée (Mann *et al.* 2006). Dans cette première étude, 528 protéines différentes ont été identifiées. Celles-ci ont pu être classées en fonction de leur abondance calculée dans la coquille, *via* l'utilisation d'un index d'abondance relative (emPAI).

La fraction insoluble de la matrice organique a également été analysée (Miksik *et al.* 2003, Miksik *et al.* 2007, Miksik *et al.* 2010). Au total, 31 protéines ont été identifiées et parmi celles-ci, 7 n'étaient pas encore décrites dont 5 étaient des protéines collagéniques.

Une analyse protéomique de la cuticule a permis d'identifier 47 protéines (Rose-Martel *et al.* 2012). Parmi celles-ci, 5 protéines étaient reportées pour la première fois dans la coquille. Cette étude a permis de poser les bases moléculaires des propriétés antimicrobiennes de la couche la plus externe de la coquille.

Une étude de 2013 rapporte l'identification de 577 protéines dans le fluide utérin et 466 dans la matrice organique de la coquille au stade de croissance rapide (Sun *et al.* 2013). Au total, 244 protéines étaient communes entre les protéines de la matrice organique et celles du fluide utérin. Des protéomes de la matrice organique et du fluide utérin provenant d'œufs à coquille solide ou fragile ont également été comparés. Les auteurs ont ainsi mis en évidence 15 protéines qui semblent être associées à la formation de coquilles solides (Sun *et al.* 2013). La même année, Kaweewong et collaborateurs ont retrouvé 62 protéines dans les membranes coquillières d'œufs embryonnés (Kaweewong *et al.* 2013).

En 2014, Miksik et collaborateurs ont analysé la fraction insoluble de la cuticule (Miksik *et al.* 2014). Ils ont identifié 29 protéines qui avaient toutes préalablement été mises en évidence dans la coquille.

En 2015, Rose-Martel et ses collaborateurs se sont intéressés à la composition protéique des noyaux mamillaires (Rose-Martel *et al.* 2015). Pour cela, ils ont comparé les protéomes des membranes coquillières sur lesquelles sont ancrés ou non les noyaux mamillaires dans deux modèles (œufs fertilisés et œufs non fertilisés). Les œufs fertilisés ont été prélevés aux jours 15 et 19 du développement. Par comparaison entre les deux stades de développement, ils ont repéré 57 protéines spécifiques du stades 19 qui correspondraient alors aux protéines des noyaux mamillaires. Dans le second modèle, ils ont comparé les protéomes de membranes coquillières traitées ou non à l'acide chlorhydrique et ainsi repéré 70 protéines spécifiques des noyaux mamillaires. En confrontant les protéines identifiées pour chaque modèle, ils ont déterminé les protéines spécifiques des noyaux mamillaires, qui étaient celles communes aux deux modèles.

Marie et collaborateurs ont quantifié pour la première fois, les protéines de la coquille et du fluide utérin en fonction des stades clefs du processus de minéralisation (Marie *et al.* 2015a, Marie *et al.* 2015b). Ils ont ainsi mesuré la distribution d'abondance de 216 protéines au cours de la minéralisation (Marie *et al.* 2015b) et rapporté l'identification de 308 protéines dans le fluide utérin de la poule au cours de la formation de la coquille (Marie *et al.* 2015a). Les protéines issues de ces études ont été analysées *in silico* et ont pu être classées en 3 groupes selon leurs fonctions potentielles.

Rath et collaborateurs ont réalisé un profil protéique des membranes coquillières de l'œuf après éclosion (Rath *et al.* 2016). Ils indiquent que les membranes coquillières des œufs éclos pourraient permettre d'augmenter l'immunité des poules après l'éclosion via des applications nutritionnelles et biologiques.

Une autre étude de 2016 a permis l'analyse des membranes coquillières durant le développement embryonnaire du poussin (Cordeiro et Hincke 2016). Les auteurs ont indiqué que les membranes coquillières correspondent à un assemblage fibreux composé de collagènes (type I, V et X), de glycoprotéines et de protéines CREMPs (cysteine-rich eggshell membrane proteins) (Kodali *et al.* 2011, Cordeiro et Hincke 2016). Une comparaison des protéomes d'œufs fertilisés et non fertilisés a également montré des changements d'abondance protéique qui varient au cours du développement embryonnaire.

La dernière étude protéomique rapportant des données sur la coquille date de 2017 (Ahmed *et al.* 2017). Elle rapporte l'identification de 472 protéines dans les membranes coquillières de l'œuf non fertilisé. Parmi celles-ci, plus de 150 protéines ont été qualifiées de protéines spécifiques des membranes coquillières.

Les études protéomiques présentées ci-avant ont permis l'identification de centaines de protéines. Une difficulté de cette méthode est la présence de nombreuses redondances entre ces études qui ont utilisé des identifiants différents (IPI, Genebank, ENSEMBL, UniProt) selon les études (Gautron *et al.*, 2019). Au final, ces études protéomiques décrivent des milliers d'identifiants différents, sans que la redondance entre eux soit analysée. C'est pourquoi, la totalité des séquences a été chargée et celles-ci ont été alignées en utilisant un algorithme de Blast pour éliminer les redondances. Ainsi, l'ensemble des protéines de la coquille a été regroupé dans un protéome non redondant contenant 904 protéines différentes (Gautron 2019, Gautron *et al.* 2019).

Des analyses de protéomes ont également été réalisées sur les coquilles d'œufs de caille, dinde, diamant mandarin et pintade (Mann et Mann 2013, Mann 2015, Mann et Mann 2015, Le Roy *et al.* 2019). Au total, 622, 697, 475 et 149 protéines ont respectivement été identifiées dans les coquilles d'œufs de ces quatre espèces (Mann et Mann 2013, Mann 2015, Mann et Mann 2015, Le Roy *et al.* 2019). De plus, une récente étude décrit le protéome de la coquille d'œuf de canard (484 protéines) et confronte les données de cette espèce avec les protéomes des coquilles de la poule, du canard, de la dinde et de la caille (Zhu *et al.* 2019). Au total, 64 protéines sont communes aux quatre espèces d'oiseaux comparés et pourraient avoir un rôle central dans la minéralisation de la coquille.

Les analyses transcriptomiques : L'utérus de poule mature est le siège de la minéralisation de la coquille d'œuf de poule. L'analyse de l'expression des gènes *via* des études de transcriptomique permet donc d'identifier l'ensemble des gènes impliqués dans ce

processus. Au total, huit analyses à haut-débit des transcrits du tissu utérin ont été réalisées (Yang *et al.* 2007b, Dunn *et al.* 2009b, Jonchere *et al.* 2010, Jonchere *et al.* 2012, Liu *et al.* 2013b, Brionne *et al.* 2014, Zhang *et al.* 2015, Sah *et al.* 2018, Yin *et al.* 2019).

Yang et collaborateurs ont comparé l'expression des gènes de l'utérus entre deux souches de poules pondeuses produisant peu ou beaucoup d'œufs (Yang *et al.* 2007b). Un total de 85 gènes différentiellement exprimés (fold change ≥ 3) entre les 2 souches a été mis en évidence.

En 2009, une étude a identifié 266 gènes différentiellement exprimé entre l'utérus de poule mature et l'utérus de poule juvénile qui ne produit pas encore d'œuf (Dunn *et al.* 2009b).

Jonchère et collaborateurs ont mis en évidence 469 gènes surexprimés dans l'utérus (en phase active de minéralisation) par comparaison avec le magnum et l'isthme (Jonchere *et al.* 2010, Jonchere *et al.* 2012).

Liu et collaborateurs ont utilisé des puces de type Affymetrix pour déterminer les gènes de l'utérus (aux stades précoces de minéralisation) potentiellement impliqués dans la résistance de la coquille (Liu *et al.* 2013b). Ils ont ainsi reporté 407 gènes surexprimés et 534 sous exprimés dans l'utérus de poules produisant des œufs à coquille résistante.

En 2014, une étude s'est intéressée aux gènes exprimés en présence ou en absence de minéralisation de la coquille (Brionne *et al.* 2014). Les auteurs ont identifié 302 gènes surexprimés dans l'utérus lorsqu'il y a minéralisation de la coquille d'œuf.

Enfin, en 2015, Zhang et collaborateurs ont eu recours à une méthode de séquençage HiSeq 2000 afin d'associer l'expression des gènes de l'utérus de poule avec la qualité de coquille. Ils ont identifié 889 gènes différentiellement exprimés entre des utérus produisant des œufs à coquille résistante, par comparaison avec des utérus formant des œufs à coquille de qualité normale (Zhang *et al.* 2015).

En 2018, Sah et collaborateurs ont identifié 229 gènes surexprimés dans des tissus utérins de poules en période de ponte (15-20 h post-ovulation) par comparaison à des tissus utérins de poules hors période de ponte (Sah *et al.* 2018).

Récemment, Yin et collaborateurs ont effectué des transcriptomes de l'ovaire, le magnum, l'isthme et l'utérus de la poule pondeuse. Leurs résultats ont indiqué une différence d'expression pour 585 gènes entre l'utérus en cours de minéralisation et l'utérus en phase quiescente (Yin *et al.* 2019).

Une étude RNA-Seq en cours permettra de compléter ces données de transcriptomique

via une analyse d'expression différentielle des gènes utérins en fonction des stades de la minéralisation (Gautron *et al.* en cours).

4.3.3. Les fonctions des protéines de la matrice organique

Après avoir identifié un grand nombre de protéines à travers ces approches à haut-débit, la détermination de la fonction des protéines les plus importantes dans ce processus a été l'objet de plusieurs études. L'aspect fonctionnel a été étudié de manière expérimentale pour seulement quelques protéines (ovocleidine-17, lysozyme, ovalbumine, ovotransferrine et ostéopontine) (Hincke *et al.* 2000, Jimenez-Lopez *et al.* 2003, Reyes-Grajeda *et al.* 2004, Schwahn *et al.* 2004, Voinescu *et al.* 2007, Hernandez-Hernandez *et al.* 2008a, Hernandez-Hernandez *et al.* 2008b, Hincke *et al.* 2008, Pipich *et al.* 2008, Wang *et al.* 2009b, Freeman *et al.* 2010, Wang *et al.* 2010, Wolf *et al.* 2011, Athanasiadou *et al.* 2018). Les fonctions des autres protéines ont essentiellement été prédites par des analyses bioinformatiques (Brionne *et al.* 2014, Marie *et al.* 2015a, Marie *et al.* 2015b). Parmi les protéines de la matrice organique quantifiées aux différents évènements clefs du processus de minéralisation, 22 protéines ont été identifiées comme étant des acteurs moléculaires centraux du processus de minéralisation de la coquille d'œuf de poule (Marie *et al.* 2015b). Elles correspondent à des protéines qui présentent, d'une part, des abondances élevées dans la coquille et d'autre part, des variations d'abondance au cours de la minéralisation. En outre, un rôle potentiel dans le processus de minéralisation a été déterminé *in silico* pour chacune de ces protéines. Parallèlement, certaines protéines de la matrice organique possèdent une activité antimicrobienne potentielle ou vérifiée (Gautron et Nys 2007b, Guérin-Dubiard *et al.* 2010, Hincke *et al.* 2011, Rehault-Godbert *et al.* 2011, Marie *et al.* 2015b).

Ainsi, les protéines de la matrice organique de coquille peuvent être regroupées en 3 catégories majeures, selon leur activité (**Figure 23**) :

- Les protéines qui sont impliquées directement dans la minéralisation de la coquille (Figure 23-1).

Cette catégorie fonctionnelle concerne les protéines ayant un rôle connu ou potentiel direct dans le processus.

- Les protéines ayant un rôle potentiel indirect dans la minéralisation (Figure 23-2).

Le milieu de formation de la coquille est acellulaire. Aussi, l'activité des protéines ayant un rôle direct sur la minéralisation est régulée et contrôlée par les constituants du fluide utérin.

Parmi ceux-ci, on retrouve des protéines capables d'interagir avec les autres protéines pour les activer ou au contraire les inhiber.

- Les protéines qui sont impliquées dans l'activité antimicrobienne de la coquille (Figure 23-3).

On retrouve cinq groupes dans cette catégorie (**Figure 23**). Le premier groupe correspond aux protéines dégradant les composés microbiens. Le lysozyme, les β-défensines, l'ovocalyxine-36, la protéine TENP et la BPIL2 en sont des exemples. Le second groupe rassemble les protéines avec un domaine lectine de type C. Parmi elles, on retrouve les protéines ovocléidine-17 et ansocalcine. Le 3ème groupe et 4ème groupe sont respectivement ceux des protéines inhibitrices de protéases et des protéines privant les bactéries de nutriments essentiels. Parmi les protéines du 3ème groupe, on peut citer les exemples de l'ovoinhibiteur et l'ovocalyxine-32. Le 4ème groupe contient, parmi d'autres protéines, l'ovotransferrine, l'avidine, la riboflavine binding protein, la retinol binding protein 4 et la vitamin D binding protein. Enfin, le dernier groupe concerne les protéines dont le mécanisme assurant l'activité antimicrobienne est moins connu. C'est le cas de l'ovalbumin related protein X (OVAX) qui possède une activité anti-*Listeria monocytogenes* et anti-*Salmonella enterica* sv. Enteritidis (Rehault-Godbert *et al.* 2013, Dombre *et al.* 2017). Les rôles des protéines impliquées dans l'activité antimicrobienne de la coquille ne seront pas développés dans ce manuscrit dans la mesure où le travail de ce doctorat porte sur l'analyse du phénomène de biominéralisation de la coquille. Ainsi, la suite de ce chapitre est focalisée sur les 22 protéines qui ont été identifiées comme étant des acteurs moléculaires centraux du processus de minéralisation de la coquille d'œuf de poule (**Figure 24**).

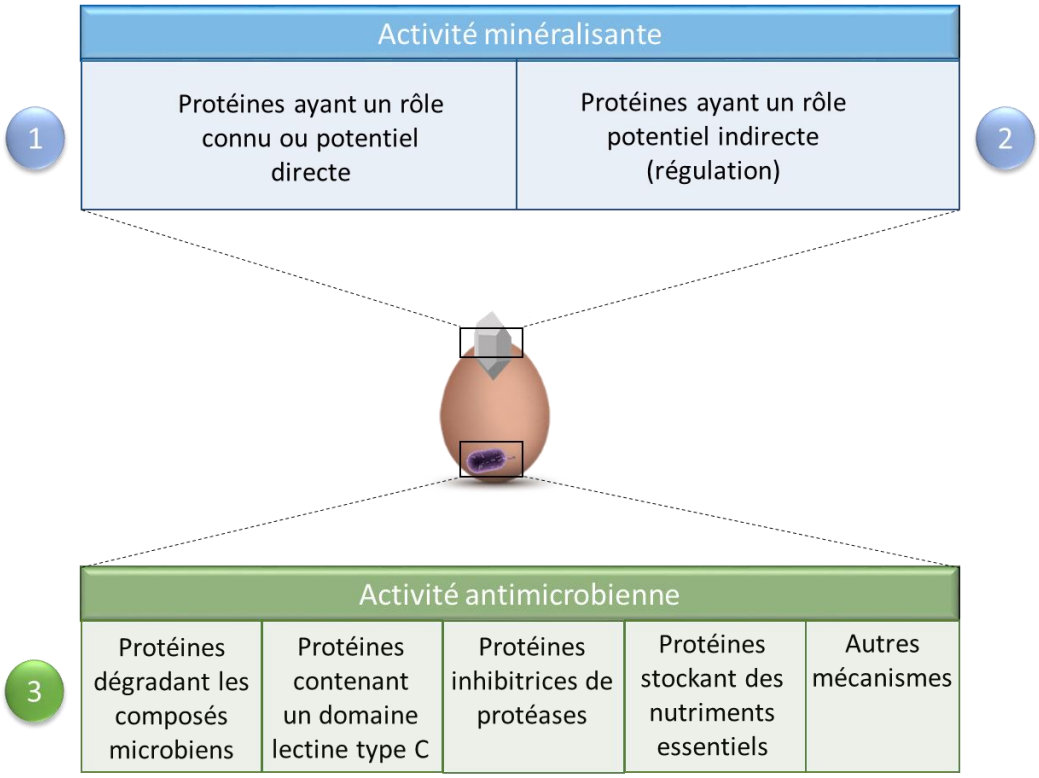


Figure 23. Les trois activités majeures des protéines de la matrice organique de la coquille d'œuf de poule. (Marie 2015, Marie *et al.* 2015b).

4.3.4. Les protéines qui interviennent directement dans le processus de minéralisation

Au sein de ce groupe, on retrouve 3 sous-catégories (**Figure 24**) :

La première sous-catégorie concerne les **protéines dont le rôle est déjà connu en biominéralisation**. Parmi celles-ci on trouve, l'ovalbumine (**OVAL**) qui stabilise le carbonate de calcium amorphe et modifie la morphologie des cristaux de calcite (Hernandez-Hernandez *et al.* 2008a, Pipich *et al.* 2008, Wang *et al.* 2009a, Wang *et al.* 2010, Wolf *et al.* 2011, Dombre *et al.* 2017). On trouve également l'ovotransferrine (**OVOT**) qui modifie la morphologie des cristaux (Gautron *et al.* 2001b, Hernandez-Hernandez *et al.* 2008a). Le lysozyme (**LYZ**) est une protéine qui stabilise l'ACC et modifie la taille et la morphologie des cristaux (Hincke *et al.* 2000, Jimenez-Lopez *et al.* 2003, Voinescu *et al.* 2007, Hernandez-Hernandez *et al.* 2008a, Hernandez-Hernandez *et al.* 2008b, Wang *et al.* 2009b). La dernière protéine de ce groupe, l'ovocléidine-17 (**OC-17**), est une protéine pouvant se lier au carbonate de calcium amorphe et modifier la morphologie des cristaux de calcite (Reyes-Grajeda *et al.* 2004, Freeman *et al.* 2010). Il est à noter que l'ostéopontine (OPN) est également une protéine qui inhibe la croissance cristalline et modifie la morphologie des cristaux *in vitro*, bien qu'elle ne rentre pas

dans le groupe des 22 protéines majeures (Hincke *et al.* 2008). Une récente étude s'est intéressée à son activité dans le processus de minéralisation de la coquille d'œuf de poule (Athanasiadou *et al.* 2018).

La seconde sous-catégorie rassemble les **protéines qui possèdent des domaines de liaison au calcium**. Ces protéines pourraient favoriser la nucléation ou modifier la morphologie des cristaux par interactions avec certaines faces cristallines. Les analyses protéomiques ont permis d'identifier une vingtaine de protéines possédant des domaines de liaison au calcium (EGF-like, EF-hand et autres domaines) (Mann *et al.* 2006, Sun *et al.* 2013, Marie *et al.* 2015b). Parmi celles-ci, EGF-like repeats and discoidin-like domains 3 (**EDIL3**), Milk fat globule EGF-factor 8 (**MFGE8**), nucleobindine-2 (**NUCB2**), albumine (**ALB**), hémopexine (**HPX**) semblent être des candidats fonctionnels majeurs de la minéralisation. La nucleobindine-2 a été identifiée comme étant la 16ème et 12ème protéine de la matrice organique, en terme d'abondance, à 7 h et 16 h post-ovulation (Marie *et al.* 2015b). Cette protéine contient deux domaines de liaison au calcium de type EF-hand. Une analyse de transcriptomique a rapporté la surexpression de son gène dans l'utérus lorsqu'une coquille est en cours de minéralisation (Jonchere *et al.* 2012). L'albumine est la 13ème protéine de la matrice organique à 5 h post-ovulation et la 3ème protéine aux autres stades de la minéralisation (Marie *et al.* 2015b). Elle est également la 3ème protéine en terme d'abondance dans le fluide utérin (Marie *et al.* 2015a). L'hémopexine est, quant à elle, la 25ème protéine du fluide utérin et compte parmi les 25 protéines les plus abondantes de la matrice organique aux différents stades de la minéralisation (Marie *et al.* 2015a, Marie *et al.* 2015b). Cette protéine présente des capacités de liaison des ions métalliques divalents (Mauk *et al.* 2005). Les protéines EDIL3 et MFGE8 sont au cœur de ce travail de thèse. Ainsi, une description détaillée de ces deux protéines sera exposée dans la partie 5 de cette revue bibliographique.

La troisième sous-catégorie correspond aux **protéines associées aux protéoglycanes** qui sont des constituants importants du processus de biomineralisation. La charge négative de ces derniers permet d'attirer les ions calcium sur le site de la minéralisation (Carrino *et al.* 1996, Carrino *et al.* 1997, Fernandez *et al.* 2001). Les études à haut-débit ont rapporté plusieurs protéines associées aux protéoglycanes (Mann *et al.* 2006, Miksik *et al.* 2010, Sun *et al.* 2013, Marie *et al.* 2015a, Marie *et al.* 2015b). Parmi ces protéines, 5 semblent avoir un rôle central dans le processus de minéralisation. L'ovocleidine-116 (**OC-116**), qui correspond au cœur protéique d'un protéoglycane à dermatane sulfate, a été retrouvée au niveau des noyaux mamillaires et de la couche palissadique (Hincke *et al.* 1999). Cette protéine apparaît comme la 2ème protéine de la matrice organique à 16 h post-ovulation et la 13ème protéine du fluide

utérin, en terme d'abondance (Marie *et al.* 2015a, Marie *et al.* 2015b). Son gène est également surexprimé lors de la calcification de la coquille (Jonchere *et al.* 2010, Brionne *et al.* 2014). Le glypican-4 (**GPC4**), qui est le cœur protéique d'un protéoglycane à héparane sulfate (Filmus *et al.* 2008), a été retrouvé comme étant la 20ème protéine de la matrice organique à 16 h post-ovulation en terme d'abondance (Marie *et al.* 2015b). La protéine Tsukushi (**TSKU**) appartient à la famille de small leucin rich proteoglycan (Dellett *et al.* 2012). Enfin, la protéine hyaluronan and proteoglycan link protein 3 (**HAPLN3**), qui affiche une capacité de liaison aux protéglycanes (Spicer *et al.* 2003), est une protéine majeure de la matrice organique (Marie *et al.* 2015b). En effet, elle compte parmi les 25 protéines les plus abondantes de la matrice organique et manifeste des variations d'abondance en fonction des stades de la minéralisation de la coquille (Marie *et al.* 2015b).

4.3.5. Les protéines régulant l'activité protéique dans le milieu de minéralisation

Dans ce groupe (**Figure 24**), on retrouve **les protéases et inhibiteurs de protéases**. Ces protéines activent ou inactivent certaines protéines du milieu en les dégradants. Une quinzaine de protéases et inhibiteurs de protéases ont été identifiés *via* les études de protéomiques portant sur l'analyse de la matrice organique de coquille. Parmi celles-ci, 5 protéines semblent avoir un rôle indirect et conséquent dans le processus de minéralisation de la coquille. La cystatine C (**CST3**) est un inhibiteur de protéases à cystéine (Hall *et al.* 1995) qui a été rapportée comme étant la 21ème protéine dans le fluide utérin et la 10ème protéine dans la matrice organique à 5 h, 6 h et 7 h post-ovulation, en terme d'abondance (Marie *et al.* 2015a, Marie *et al.* 2015b). L'ovomucoïde (**OVM**) est une protéine connue pour inhiber les protéases à sérine *via* ses trois domaines Kazal-like (Rehault-Godbert *et al.* 2011). Elle fait partie des 30 protéines les plus abondantes dans la matrice organique et affiche des variations d'abondance au cours de la minéralisation (Marie *et al.* 2015b). Elle a également été rapportée comme étant la 10ème protéine du fluide utérin en terme d'abondance (Marie *et al.* 2015a). L'ovoinhibiteur (**OIH**), une autre protéine identifiée dans la matrice organique possède également un domaine Kazal-like (Rehault-Godbert *et al.* 2011, Marie *et al.* 2015b). L'ovocalyxine-32 (**OCX-32**) apparaît comme la 29ème protéine du fluide utérin en terme d'abondance (Marie *et al.* 2015a). Cette protéine a également été identifiée dans la matrice organique et possède la capacité d'inhiber les carboxypeptidases (Xing *et al.* 2007, Marie *et al.* 2015b). Une étude antérieure aux analyses à haut-débit avait repéré cette protéine dans le haut de la couche palissadique, dans la couche des cristaux verticaux et dans la cuticule de la coquille (Gautron *et al.* 2001a). Des analyses de

génomique ont associé l'OCX-32 à la qualité de la coquille (Dunn *et al.* 2009a, Takahashi *et al.* 2009, Takahashi *et al.* 2010, Dunn *et al.* 2012). La dernière protéine, retrouvée dans la matrice organique, qui inhibe les protéases est l'ovocalyxine-25 (**OCX25**) (Marie *et al.* 2015b). Cette protéine est la 16ème protéine en terme d'abondance dans le fluide utérin (Marie *et al.* 2015a). L'OCX-25 est un potentiel inhibiteur de protéase *via* ses domaines Kunitz et WAP (Gautron et Nys 2007b, Gautron et Nys 2007a). Elle est particulièrement abondante dans la cuticule qui est la première couche protectrice de l'œuf (Rose-Martel *et al.* 2012). En outre, des protéases de la famille des cathepsines sont également retrouvées dans la matrice organique de la coquille (Mann *et al.* 2006, Sun *et al.* 2013).

Les **protéines chaperonnes** modifient la conformation des protéines en assurant leur repliement. Ces protéines peuvent également limiter l'activité de certaines protéines en interagissant avec elles. Un certain nombre de protéines chaperonnes ont été retrouvées dans la matrice organique. Les principales protéines chaperonnes sont la clusterine (**CLU**), l'ovocalyxine-21 (**OCX-21**) et la peptidylprolyl isomerase B (**PPIB**). La clusterine est relativement abondante dans la coquille (7ème et 29ème protéine selon le stade) et son gène est surexprimé lorsqu'une coquille est en cours de formation dans l'utérus (Brionne *et al.* 2014, Marie *et al.* 2015b). L'OCX-21 a été rapportée comme étant la 15ème protéine en terme d'abondance dans la matrice organique à 16 h post-ovulation et la 4ème protéine du fluide utérin (Marie *et al.* 2015a, Marie *et al.* 2015b). Une autre étude de protéomique avait identifié cette protéine comme étant la plus abondante de la matrice organique (Mann *et al.* 2006). Son domaine BRICHOS lui confèrerait son activité de protéine chaperonne (Gautron et Nys 2007a). Enfin, PPIB est également retrouvée dans la matrice organique de la coquille dans laquelle elle est surabondante lors de la formation de la couche palissadique (Marie *et al.* 2015b). Cette protéine correspond à la 77ème protéine du fluide utérin en terme d'abondance (Marie *et al.* 2015a).

Enfin, on retrouve les **phosphatases et les kinases** qui modifient le degré de phosphorylation des protéines de la matrice, de manière à réguler leur fonction. En effet, l'évaluation *in vitro* de l'activité de l'ostéopontine a démontré sa perte de fonction dans le processus de minéralisation, lorsque celle-ci est déphosphorylée (Hincke et St. Maurice 1998). L'importance de la phosphorylation de l'ostéopontine a également été rapportée lors du processus de minéralisation osseux (Gericke *et al.* 2005). De plus, une récente étude *in vitro* et *in vivo* a soutenu le rôle central des processus de phosphorylation/déphosphorylation des protéines de la matrice organique dans le phénomène de biominéralisation de la coquille d'huître (*Pincatada fucata*)(Du *et al.* 2018b). Le degré de phosphorylation semble donc crucial

pour moduler l'activité biologique des protéines de la matrice organique. Ainsi, l'étude des phosphatases et kinases est un élément important pour la compréhension du mécanisme de minéralisation de la coquille d'œuf. La phosphatase majeure de la matrice organique est **LOC428451**. Cette protéine méconnue est la 12ème de la matrice organique à 7 h post-ovulation en terme d'abondance (Marie *et al.* 2015b). Elle peut retirer les groupements phosphate d'autres protéines du milieu afin de réguler leurs activités.

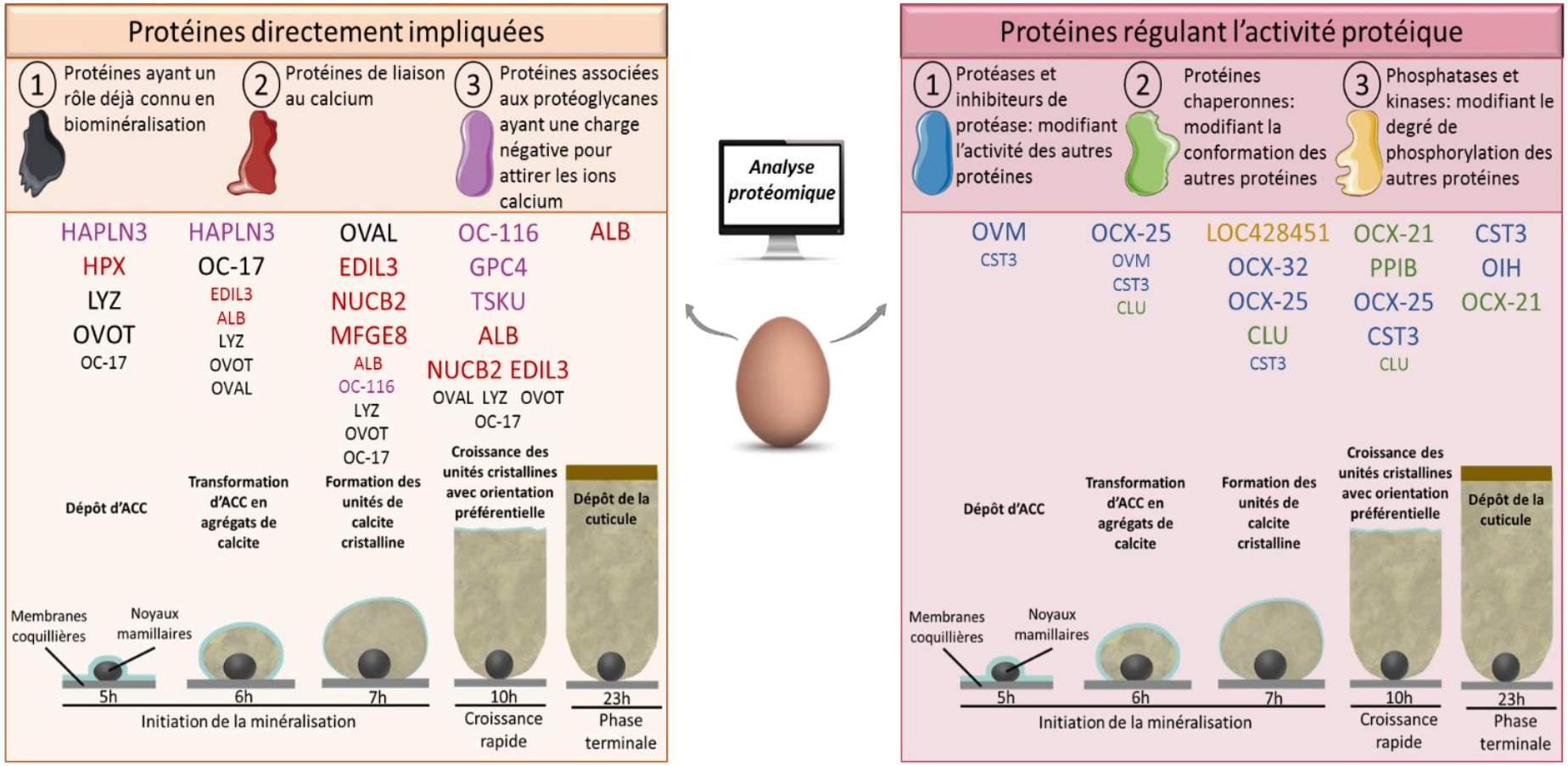


Figure 24. Les fonctions associées à la biominéralisation des protéines majeures de la matrice organique de la coquille d'œuf de poule. Adapté de (Marie *et al.* 2015b).

5. Les protéines MFGE8 et EDIL3

EDIL3 et MFGE8 constituent le principal objet d'étude de ma thèse. En effet, ces 2 protéines sont systématiquement identifiées dans les études de protéomique et de transcriptomique de la coquille d'œuf et de l'utérus de poule. Elles pourraient assurer un rôle majeur dans la formation de la coquille.

5.1. La protéine MFGE8 (Milk fat globule EGF-factor 8)

5.1.1. Identification du gène et de la protéine MFGE8

Les premières études rapportant des données sur la protéine MFGE8 s'intéressaient à la lactation et plus précisément à la composition de la membrane des globules gras du lait (Milk Fat Globule Membrane, MFGM) (Stubbs *et al.* 1990). MFGM est une membrane qui entoure les globules de graisse, synthétisés dans le cytosol des cellules épithéliales des glandes mammaires et sécrétés dans la lumière de ces dernières (Oshima *et al.* 2014). Cette membrane est composée de protéines, de triglycérides et de phospholipides (**Figure 25**) (Mather et Keenan 1975, Fong *et al.* 2007, Lopez 2011).

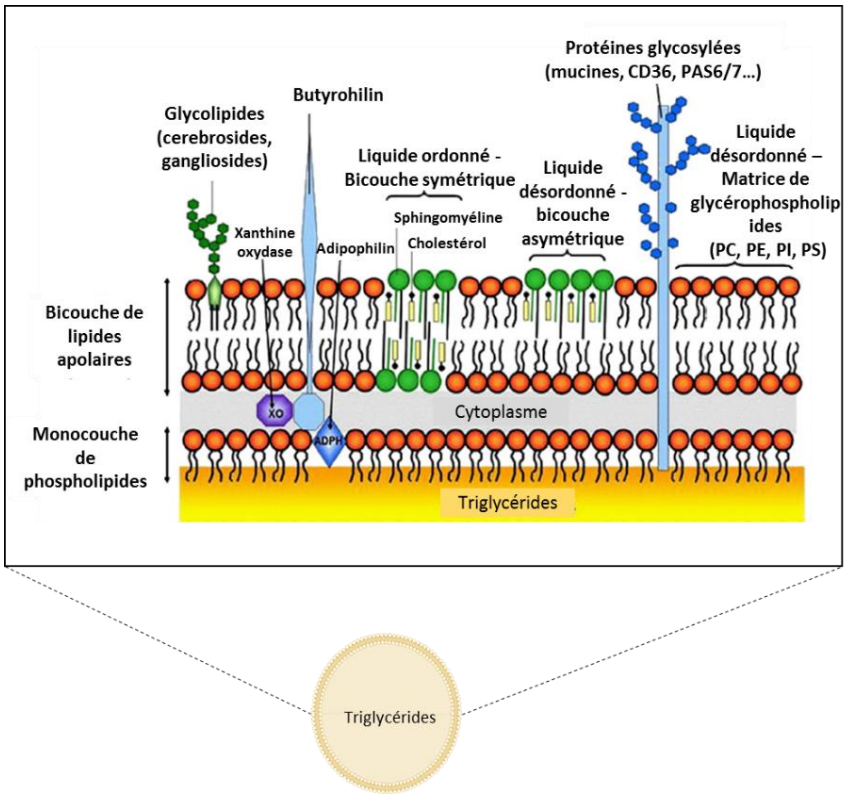


Figure 25. Représentation schématique de la membrane des globules gras du lait (MFGM). PAS6/7 est l'orthologue de MFGE8 chez les bovins. Adapté de Lopez *et al*., 2011.

MFGE8 a été caractérisée comme une glycoprotéine ancrée dans la MFGM (Stubbs *et al.* 1990). Cette protéine a tout d'abord été identifiée *via* un clonage/séquençage à partir d'une banque d'ADNc de glande mammaire de souris (Stubbs *et al.* 1990), ainsi que chez le rat (Ogura *et al.* 1996). Les protéines orthologues de différentes espèces ont ensuite été explorées. L'orthologue humain (Lactadherine ou BA46) a été proposé comme marqueur du cancer du sein (Larocca *et al.* 1991). La protéine PAS-6/7, orthologue chez les bovins, a été purifiée par une combinaison de systèmes chromatographiques (Kim *et al.* 1992, Hvarregaard *et al.* 1996).

5.1.2. Expression et localisation de MFGE8

Chez les vertébrés, *Mfge8* est physiologiquement exprimé par une variété de cellules et de tissus (Aziz *et al.* 2011, Oshima *et al.* 2014). La majorité des mammifères expriment deux variants d'ARN messagers de *Mfge8*, qualifiés de long et court, qui résultent d'un épissage alternatif (Oshima *et al.* 1999). Des données de transcription chez l'humain rapportent que *Mfge8* est abondamment exprimé au niveau des vaisseaux sanguins (artères et veines), des organes reproducteurs femelles (seins, ovaires, utérus et vagin), du cœur et des tissus adipeux (Oshima *et al.* 2014). En condition pathologique, l'expression de *Mfge8* est altérée (Aziz *et al.* 2011, Yi 2016). Dans des modèles de souris et rat en contexte d'ischémie-reperfusion rénale ou hépatique, le niveau d'expression de *Mfge8* est diminué dans la rate, les reins et le foie par comparaison au contrôle (Matsuda *et al.* 2011, Matsuda *et al.* 2013). De la même manière, son expression décroît dans un contexte de maladie auto-immune, d'arthrose rhumatoïde, d'athérosclérose ou encore de septicémie (Hanayama *et al.* 2004b, Ait-Oufella *et al.* 2007, Komura *et al.* 2009, Albus *et al.* 2016). A l'inverse, au niveau des cellules tumorales dans un contexte de cancer du sein, *Mfge8* est surexprimé par comparaison au contrôle (Larocca *et al.* 1991, Couto *et al.* 1996). Ce gène a également été retrouvé comme étant surexprimé lors d'autres pathologies comme le mélanome, la fibrose pulmonaire ou le lupus érythémateux (Jinushi *et al.* 2008, Yamaguchi *et al.* 2008, Atabai *et al.* 2009).

Actuellement, peu de données sont disponibles concernant la régulation de l'expression de *Mfge8*. Toutefois, l'expression de *Mfge8* semble être régulée positivement par une hormone lactogène, la prolactine (PRL), mais aussi, par le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes PPAR (Mukundan *et al.* 2009, Franchi *et al.* 2011). La fractalkine (CX3CL1) accroît également l'expression de *Mfge8* au niveau des cellules microgliales chez le rat (Leonardi-Essmann *et al.* 2005). A l'inverse, le lipopolysaccharide (LPS) qui est un composant des membranes de bactéries à gram négatif diminuerait l'expression de *Mfge8* au niveau de plusieurs organes chez la souris (Miksa *et al.* 2008).

La glycoprotéine MFGE8 est retrouvée dans divers tissus des mammifères. Elle est sécrétée par les cellules dendritiques (Miyasaka *et al.* 2004), les macrophages (Miyasaka *et al.* 2004, Jinushi *et al.* 2008) et les cellules épithéliales des glandes mammaires en involution (Atabai *et al.* 2005, Nakatani *et al.* 2006). Chez la souris, MFGE8 a été retrouvée dans la muqueuse du colon dans un contexte de colite, dans l'épithélium intestinal, sur la membrane plasmique des spermatozoïdes et dans les kératinocytes de l'épiderme (Ensslin et Shur 2003, Watanabe *et al.* 2005, Bu *et al.* 2007, Aziz *et al.* 2009). Cette protéine a également été localisée par des immuno-marquages au niveau des cellules de l'œil de rat et de souris (Burgess *et al.* 2006). Chez l'humain, MFGE8 a été repérée dans des biopsies d'endomètre, au niveau des cellules épithéliales (Franchi *et al.* 2011, Bocca *et al.* 2012).

5.1.3. Structure protéique et fonctions moléculaires de MFGE8

La protéine MFGE8 possède un domaine peptide signal clivable à son extrémité N-terminale qui permet son adressage dans le milieu extracellulaire (Oshima *et al.* 1999, Aziz *et al.* 2011). Elle est également composée de deux types de domaines : un domaine de type EGF-like (homologue aux *Epidermal Growth Factor* identifiés chez les drosophiles) et un domaine de type F5/8C (coagulation factor 5/8 domain, aussi appelé Discoidin repeat ; D), similaire aux domaines des facteurs de coagulation V et VIII (Stubbs *et al.* 1990, Larocca *et al.* 1991, Hvarregaard *et al.* 1996, Ogura *et al.* 1996). Le nombre de copie de ces deux domaines varie en fonction des espèces (Oshima *et al.* 2014). Une analyse évolutive a indiqué que les séquences MFGE8 des primates possèdent un unique domaine EGF-like, par opposition aux autres mammifères ne faisant pas partie des primates, qui disposent de deux domaines EGF-like (Podlaha *et al.* 2006). Les séquences MFGE8 des espèces ne faisant pas partie des mammifères contiennent trois domaines EGF-like (Oshima *et al.* 2014). Dans toutes les espèces explorées, deux copies du domaine F5/8C sont retrouvées (Podlaha *et al.* 2006, Raymond *et al.* 2009, Oshima *et al.* 2014). Ces deux types de domaines permettent à la protéine d'orchestrer ses fonctions moléculaires. En effet, le second domaine EGF-like, hautement conservé entre les espèces, contient un motif RGD (arginine/glycine/acide aspartique) qui affiche une forte affinité pour les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ exprimées à la surface des cellules (Couto *et al.* 1996, Andersen *et al.* 1997, Taylor *et al.* 1997, Andersen *et al.* 2000, Aziz *et al.* 2011, Oshima *et al.* 2014). De son côté, le second domaine F5/8C de la vache et de la souris possèdent une capacité de liaison aux phospholipides, comme les phosphatidylsérines (Hanayama *et al.* 2002, Lin *et al.* 2007, Shao *et al.* 2008, Ye *et al.* 2013, Oshima *et al.* 2014). Plusieurs études rapportent des données sur la structure tridimensionnelle du second domaine F5/8C de la protéine MFGE8 du

bovin et de la souris (Lin *et al.* 2007, Shao *et al.* 2008, Ye *et al.* 2013). Ces études, basées sur des techniques de résonnance magnétique nucléaire (RMN), de cristallographie et de modélisation, ont également permis d'analyser l'interaction du second domaine F5/8C avec les phospholipides. Ainsi, le second domaine F5/8C du MFGE8 de la souris expose quatre brins β et deux feuillets β, composés respectivement de cinq et trois brins β antiparallèles (**Figure 26**) (Ye *et al.* 2013). En complément, une analyse de mutagénèse a été réalisée chez la souris (Ye *et al.* 2013). Les résultats suggèrent que les boucles 1 à 3 du second domaine F5/8C joueraient un rôle clef dans l'interaction avec les phospholipides (Shao *et al.* 2008, Ye *et al.* 2013). En effet, des résidus positivement chargés se lieraient aux résidus négativement chargés des phospholipides *via* des interactions électrostatiques. De manière complémentaire, des résidus hydrophobes situés sur ces boucles assureraient la stabilisation de cette liaison aux phospholipides *via* des interactions hydrophobes (Ye *et al.* 2013). De par sa capacité de liaison aux phospholipides, MFGE8 possède la faculté d'interagir avec des vésicules de petites tailles (100-200 nm) (Oshima *et al.* 2002, Shi *et al.* 2004). Une étude a permis d'analyser le mécanisme de liaison entre MFGE8 et des vésicules, de taille et de composition variables, qui contenaient des phosphatidylsérines (Otzen *et al.* 2012). Les résultats indiquent que ces deux variables semblent intervenir dans l'affinité de MFGE8 pour les vésicules.

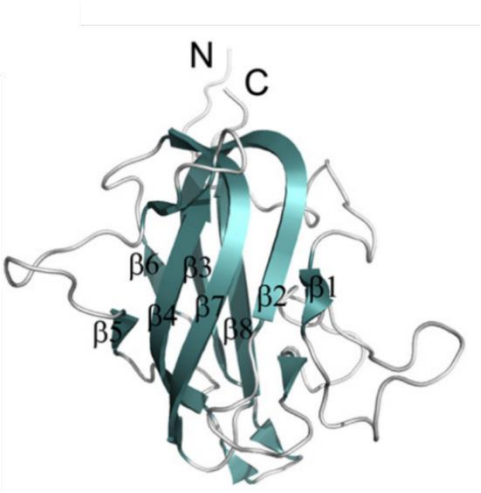


Figure 26. Structure du domaine F5/8C-2 de la protéine MFGE8 de la souris. La modélisation RMN indique que ce domaine contient quatre brins β et deux feuillets β, composés respectivement de cinq et trois brins β antiparallèles. (Ye *et al.* 2013).

Chez la souris, deux isoformes protéiques (long et court), résultant d'un épissage alternatif, ont été identifiés (**Figure 27**) (Oshima *et al.* 1999). L'isoforme long contient un domaine riche en proline-thréonine (P/T) non retrouvé dans l'isoforme court. Ce domaine riche en P/T est inséré entre le second domaine EGF-like et le premier domaine F5/8C (Discoidin repeat-1). Ces deux isoformes de la protéine ne sont pas retrouvés de la même manière dans les différents tissus explorés (Oshima *et al.* 1999). Chez l'homme, deux isoformes protéiques ont également été rapportés. Par comparaison avec la forme canonique de MFGE8, l'isoforme long ne possèdent pas les acides aminés de 1 à 75 et l'isoforme court est dépourvu des acides aminés 291 à 342 (Yi 2016).

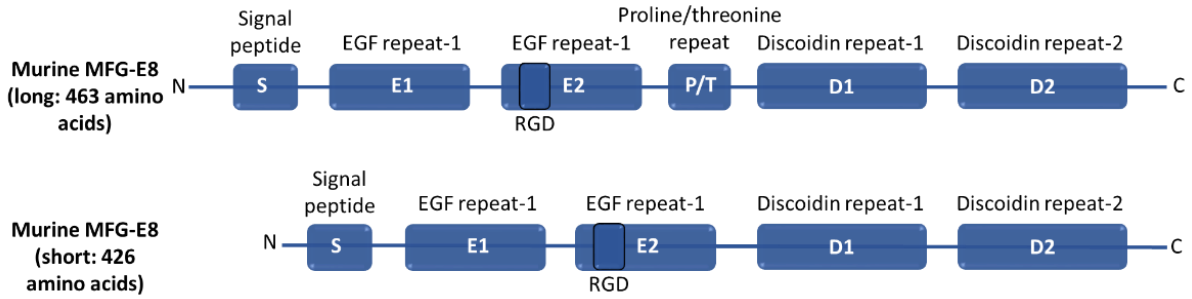


Figure 27. Les isoformes de la protéine MFGE8 de la souris. Adapté de (Yi 2016).

Chez les mammifères, la protéine sécrétée MFGE8 possède plusieurs sites de glycosylation (Oshima *et al.* 1999, Oshima *et al.* 2014, Yi 2016). Selon les espèces, le potentiel de glycosylation de la protéine varie (**Figure 28**). En effet, la protéine MFGE8 de l'homme contient 5 sites de N-glycosylations et un potentiel 6ème site. Chez le bovin, 2 sites de N-glycosylation (plus un 3ème potentiel) et 2 sites de O-glycosylation ont été identifiés. Pour finir, la séquence de l'isoforme long de MFGE8 de la souris affiche 5 sites de N-glycosylation potentiels et un site de O-glycosylation confirmé.

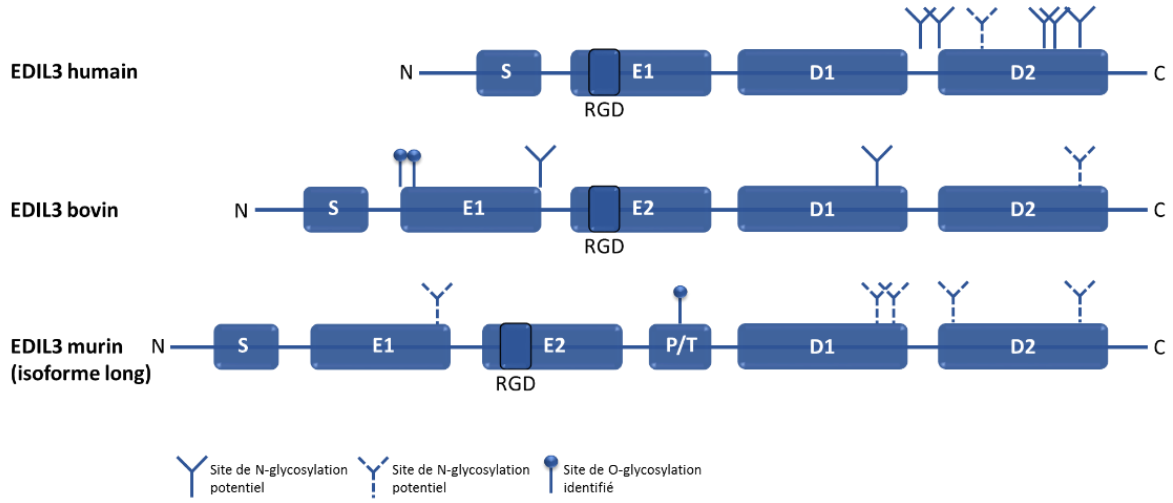


Figure 28. Les sites de glycosylation des protéines MFGE8 de l'homme, du bovin et de la souris. Adapté de (Oshima *et al.* 2014).

5.1.4. Fonctions biologiques de MFGE8

Les deux capacités de liaison présentées dans le paragraphe **5.1.3** permettent à la protéine MFGE8 de participer à diverses fonctions biologiques (**Figure 29**). En effet, MFGE8 est impliquée dans une multitude d'interactions cellulaires *via* ses liaisons avec les intégrines et les phospholipides (Raymond *et al.* 2009).

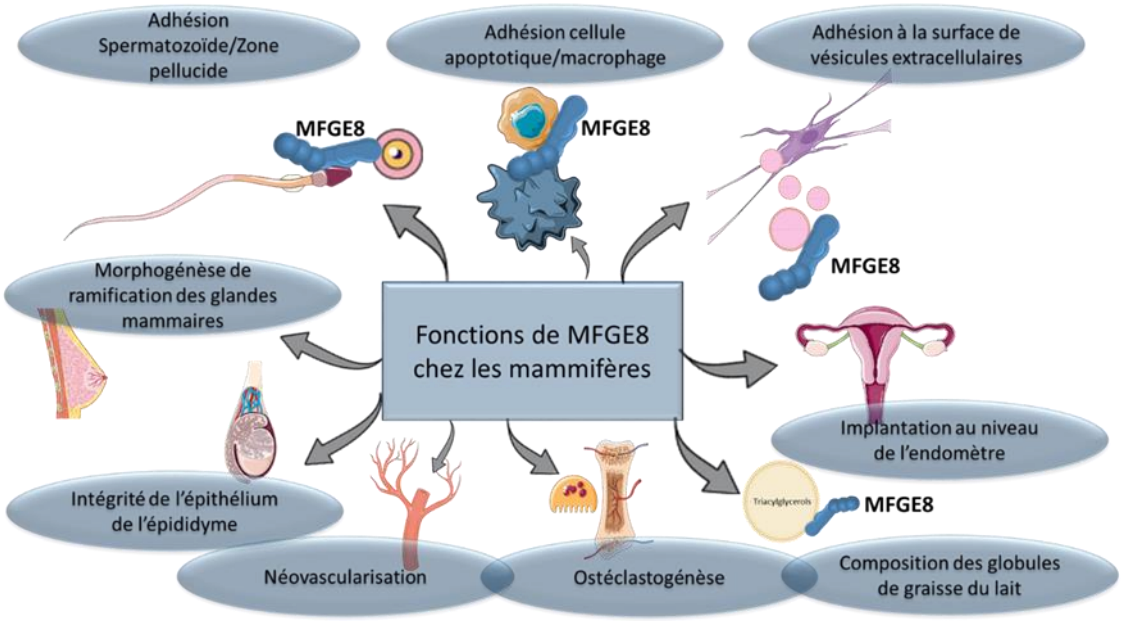


Figure 29. Les diverses fonctions biologiques de la protéine MFGE8 identifiées chez les mammifères.

Des études ont souligné le rôle de MFGE8 dans la fonction d'apoptose (Hanayama *et al.* 2002, Fens *et al.* 2008). Chez la souris, la protéine est sécrétée par les macrophages activés et permet la liaison entre les lymphocytes en apoptose et les phagocytes (Hanayama *et al.* 2002). Le domaine C-terminal de MFGE8 (D1-D2) reconnaît spécifiquement les phospholipides à la surface des cellules en apoptose alors que le motif RGD permet la liaison aux intégrines exprimées par les phagocytes (**Figure 30**) (Hanayama *et al.* 2002, Hanayama *et al.* 2004a, Yi 2016). MFGE8 est également impliquée dans l'apoptose du remodelage des glandes mammaires durant l'involution et dans l'élimination de cellules apoptotiques dans un contexte d'athérosclérose (Atabai *et al.* 2005, Ait-Oufella *et al.* 2007). Chez la souris, cette glycoprotéine intervient également au niveau des macrophages de la *lamina propria* intestinale en participant à l'homéostasie de l'épithélium (Bu *et al.* 2007).

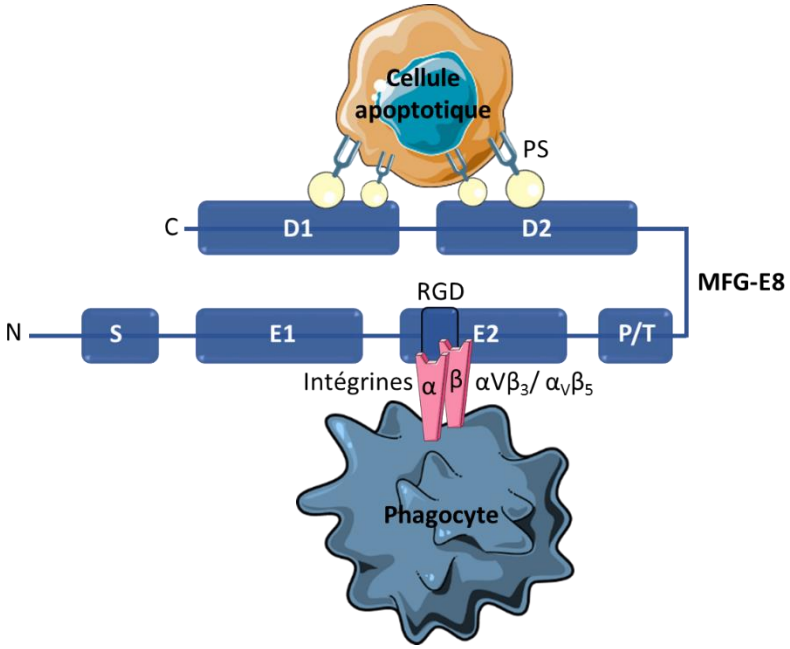


Figure 30. Mécanisme d'action de MFGE8 assurant la liaison entre une cellule apoptotique et un phagocyte. Les domaines F5/8C (D1 et D2) assurent l'adhésion avec les phospholipides de la cellule en apoptose et le motif RGD la liaison avec le phagocyte *via* les intégrines. Adapté de (Yi 2016).

L'orthologue porcin assure l'adhésion entre la membrane des spermatozoïdes et la zone pellucide de l'ovocyte (Ensslin *et al.* 1998, Ensslin et Shur 2003). Deux modèles d'adhésion entre la membrane des spermatozoïdes et la zone pellucide ont ainsi été proposés (**Figure 31**) (Ensslin et Shur 2003, Raymond *et al.* 2009).

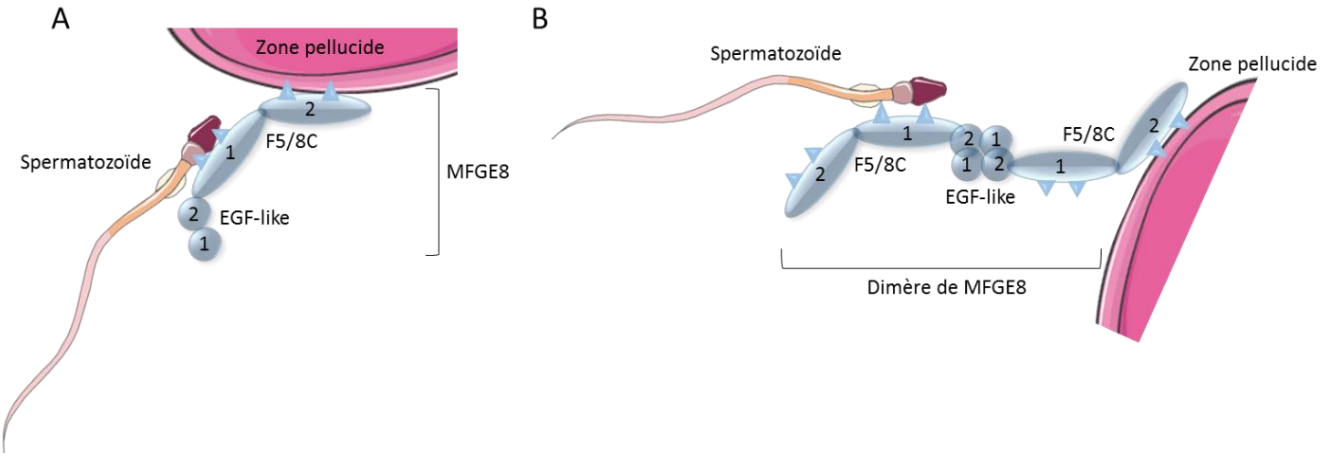


Figure 31. Modèles proposés pour la fonction de liaison de MFGE8 entre le spermatozoïde et la zone pellucide de l'ovocyte du porc. A. Les deux domaines F5/8C de MFGE8 sont respectivement liés à la zone pellucide et au spermatozoïde pour assurer l'adhésion. **B.** Un dimère de protéines MFGE8 permet l'adhésion entre le spermatozoïde et l'ovocyte *via* les interactions des seconds domaines F5/8C de chaque protéine. Adapté de (Ensslin et Shur 2003, Raymond *et al.* 2009).

Une étude sur la souris a mis en évidence le rôle de MFGE8 dans la maintenance de l'intégrité de l'épithélium de l'épididyme (Raymond *et al.* 2009).

MFGE8 a également été associée à d'autres fonctions, comme la morphogénèse de ramification au niveau des glandes mammaires (Ensslin et Shur 2007), l'implantation et la placentation au niveau de l'épithélium de l'endomètre mammalien (Bocca *et al.* 2012), la néovascularisation (Silvestre *et al.* 2005) ou encore l'ostéoclastogénèse lors de renouvellements osseux pathologiques (Sinningen *et al.* 2015).

D'autre part, MFGE8 est aussi retrouvée dans des vésicules exosomes-like appelées epididymosomes qui sont retrouvées dans l'épididyme de bélier (Gatti *et al.* 2005). En outre, MFGE8 a été reconnue comme le constituant majeur des exosomes dérivant des cellules dendritiques (Thery *et al.* 1999, Thery *et al.* 2009). Une autre étude a restitué l'implication de MFGE8 dans l'augmentation de la sécrétion d'exosomes dans des cellules épithéliales de glandes mammaires en culture (Oshima *et al.* 2002). Une récente étude a ajouté que l'interaction de MFGE8 avec les vésicules extracellulaires est nécessaire pour son accumulation dans la

matrice extracellulaire des cellules épithéliales des glandes mammaires de souris (Ooishi *et al.* 2017). Toutefois, le rôle de MFGE8 dans ces systèmes vésiculaires reste énigmatique.

5.2. La protéine EDIL3 (EGF-like repeats and discoidin-like domains 3)

5.2.1. Expression et localisation d'EDIL3

EDIL3 (ou DEL1) a été identifiée pour la première fois *via* une étude sur les gènes des cellules endothéliales d'embryon de souris (Hidai *et al.* 1998). Cette protéine sécrétée s'associe aux matrices extracellulaires comme la membrane basale (Hidai *et al.* 1998). Le dépôt de EDIL3 au niveau des matrices extracellulaires impliquerait des glycosaminoglycanes (Hidai *et al.* 2007). Elle assurerait ainsi l'adhésion des cellules endothéliales par son interaction avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Hidai *et al.* 1998).

Edil3 est exprimé dans différents tissus des mammifères, en conditions physiologiques et pathologiques. Plusieurs études ont rapporté des données sur l'expression de ce gène. Une première étude a permis l'analyse de l'expression d'*Edil3* dans des embryons de souris à différents stades du développement, dans le mésoderme extra embryonnaire, les cellules endothéliales, les vaisseaux sanguins, l'endocarde, les micro-vaisseaux (poumon, intestin, tube neural et rein), les cellules mésenchymateuses, les chondrocytes hyperthrophiques et les neurones rétiniens (Hidai *et al.* 1998). L'expression du gène semble ensuite être interrompue à la naissance (Hidai *et al.* 1998). Toutefois, une étude ultérieure a renseigné l'expression d'*Edil3* dans le cartilage hyperthrophique et mature durant la période néonatale chez des souris en développement (Wang *et al.* 2016b). Chez la souris adulte, *Edil3* est hautement exprimé dans le cerveau et le poumon, alors que l'expression de ce gène est faible voire nulle dans l'intestin, le foie, le rein, la rate et les vaisseaux sanguins (Choi *et al.* 2008). Le gène *Edil3* est également exprimé au niveau des ostéoclastes de l'homme et de la souris, ainsi que dans les cellules souches hématopoïétiques de la souris (Shin *et al.* 2015, Mitroulis *et al.* 2017). Récemment, une étude sur la souris a rapporté la forte expression d'*Edil3* au niveau de l'os crânien, du tibia/fémur et de l'œil par comparaison avec le tissus adipeux et le cœur (Oh *et al.* 2017). En outre, les résultats indiquent une surexpression du gène durant la différentiation des ostéoblastes.

Edil3 est également exprimé dans plusieurs types de cancers, comme le cancer du sein (Aoka *et al.* 2002), le cancer du poumon (Lee *et al.* 2015), le cancer du côlon (Zou *et al.* 2008), le cancer de la vessie (Beckham *et al.* 2014) et le cancer du foie (Sun *et al.* 2010, Feng *et al.* 2014, Xia *et al.* 2015). Le niveau d'expression d'*Edil3* a ainsi été associé à la progression et au

diagnostic du cancer (Calvisi *et al.* 2016). Néanmoins, son niveau d'expression varierait selon le type de cancer et le stade de développement (Lee *et al.* 2015). En effet, des études ont rapporté une diminution du niveau d'expression d'*Edil3* dans le cancer colorectal et de la vessie, alors que d'autres études ont souligné l'augmentation de son niveau d'expression dans le cancer du foie, du pancréas et du poumon (Feng *et al.* 2014, Lee *et al.* 2015, Jiang *et al.* 2016, Jeong *et al.* 2017). De la même manière, le surcroît d'expression d'*Edil3* dans les cellules souches mésenchymateuses a été associé à la pathologie du squelette axial, la spondylarthrite ankylosante (Layh-Schmitt *et al.* 2017). Au niveau de la gencive, la chute d'expression retrouvée chez des souris âgées (18 mois), par comparaison à des souris jeunes (10 semaines), serait corrélée à la perte osseuse parodontale de maladies inflammatoires (Eskan *et al.* 2012).

En 2004, une étude s'est intéressée à l'homologie structurale de MFGE8 et EDIL3 et a ainsi souligné que les gènes codants pour ces deux protéines sont exprimés dans différents types de macrophages (Hanayama *et al.* 2004a). Toutefois, peu de données sont disponibles sur les ARN messagers du gène *Edil3* et leur potentiel épissage alternatif. Cependant, il semblerait que plusieurs variants existent chez les mammifères (Kitano et Hidai 2014). Parmi eux, il y aurait un variant majoritaire et un variant minoritaire auxquels s'ajouteraient des variants additionnels (Kitano et Hidai 2014).

La protéine EDIL3 a été localisée dans les cellules endothéliales de l'embryon de souris *via* des analyses immunohistologiques (Hidai *et al.* 1998). EDIL3 a également été localisée au niveau de tumeurs humaines provenant de cancer du sein, de mélanome, de cancer du côlon, de carcinome basocellulaire et d'astrocytome (Aoka *et al.* 2002). Dans cette dernière étude, les vaisseaux sanguins de mélanome ont aussi révélé un immunomarquage positif pour la protéine EDIL3. La présence de la protéine EDIL3 au niveau du cancer du côlon a ensuite été confirmée par l'analyse de cellules cancéreuses humaines et de sections de tumeurs de souris (Zou *et al.* 2008). Plus récemment, EDIL3 a été localisée par immunomarquage aux particules d'or sur des vésicules extracellulaires sécrétées par des métastases de patients atteints de cancer du sein (Lee *et al.* 2016).

Dans les muscles des membres postérieurs de la souris, la protéine EDIL3 est exclusivement retrouvée dans un contexte d'ischémie (Ho *et al.* 2004). Au niveau de la voûte crânienne (calvaria) de la souris, un immunomarquage a permis de souligner la présence de la protéine au niveau du périoste et des régions calcifiées en périphérie des tissus osseux (Oh *et al.* 2017).

Des analyses de western blot ont montré que la protéine EDIL3 est également sécrétée par des macrophages provenant du thymus et du foie d'embryon de souris (Hanayama *et al.* 2004a).

5.2.2 Structure protéique et fonctions moléculaires d'EDIL3

Chez les mammifères, la glycoprotéine EDIL3 de 52 kDa est composée d'un peptide signal, de trois domaines EGF-like et de deux domaines F5/8C, aussi nommés discoidin repeat (domaines D1 et D2, **Figure 32**) (Hidai *et al.* 1998, Hanayama *et al.* 2004a, Hidai *et al.* 2007).

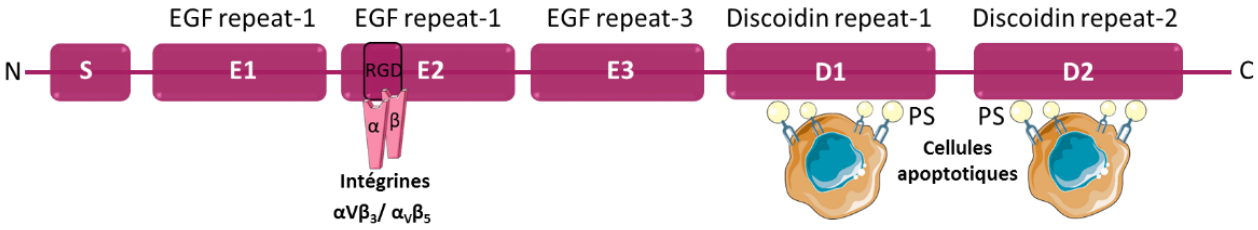


Figure 32. Structure et fonctions moléculaires de la protéine EDIL3 des mammifères. Le motif RGD du second domaine EGF-like peut se lier aux intégrines et les domaines D1 et D2 (F5/8C) ont une capacité de liaison aux phosphatidylsérines. Adapté de (Hanayama *et al.* 2004a, Choi *et al.* 2008).

L'organisation d'EDIL3 est similaire à celle de la protéine MFGE8, c'est pourquoi, ces deux protéines ont été qualifiées de protéines « structurellement homologues » (Hanayama *et al.* 2004a, Oshima *et al.* 2014). Ainsi, la protéine EDIL3 dispose de fonctions moléculaires identiques à celles de la protéine MFGE8. En effet, le second domaine EGF-like contient un motif RGD semblable à celui de la protéine MFGE8 (Hidai *et al.* 1998, Hanayama *et al.* 2004a, Schurpf *et al.* 2012). Le motif RGD de EDIL3 permet la liaison de la protéine avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ (**Figure 32**) (Penta *et al.* 1999, Zhong *et al.* 2003). Une étude de cristallisation a permis de déterminer la structure des trois domaines EGF-like de la protéine EDIL3 humaine (**Figure 33A**) (Schurpf *et al.* 2012). Les domaines EGF1-2 et 3 d'EDIL3 possèdent respectivement 40, 43 et 37 acides aminés. Le second domaine RGD est composé de 6 cystéines, impliquées dans 3 ponts disulfures 1-3, 2-4, 5-6 (**Figure 33B**). Le motif RGD est localisé dans une boucle de 13 acides aminés cernée par deux brins β (**Figure 33C**). Des analyses de mutagénèse ont démontré l'importance de la position axiale du motif RGD dans la boucle, pour assurer la liaison avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Schurpf *et al.* 2012). Cette liaison permet

ainsi à la protéine d'interagir avec les cellules endothéliales et les cellules cancéreuses (Hidai *et al.* 1998, Lee *et al.* 2016).

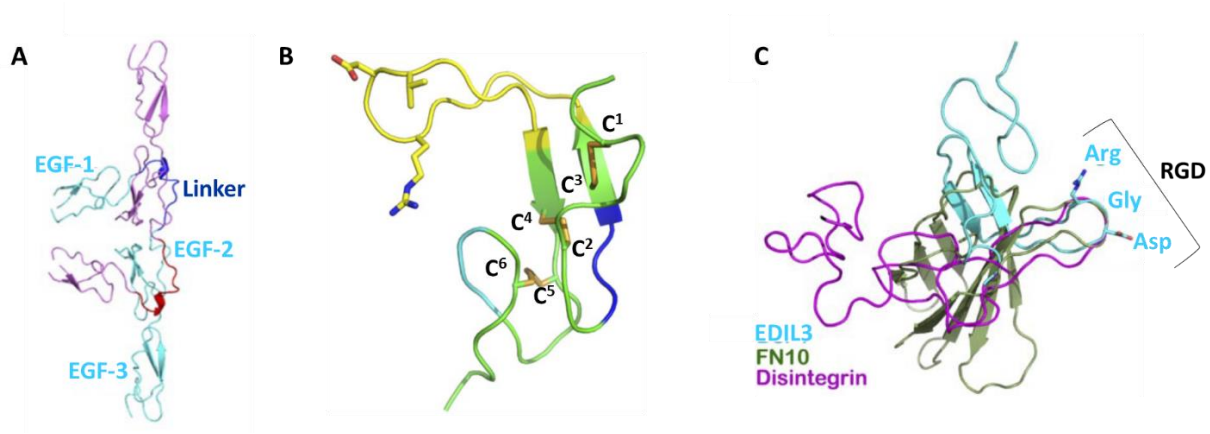


Figure 33. Structures tertiaires des domaines EGF-like de la protéine EDIL3 des mammifères. A. Structures tertiaires des 3 domaines EGF-like de la protéine EDIL3 obtenues par cristallographie **B.** Structure tertiaire du second domaine EGF-like de la protéine EDIL3. Les 6 cystéines impliquées dans les 3 ponts disulfures sont indiquées **C.** Structure tertiaire du second domaine EGF-like de la protéine EDIL3 (cyan), et des domaines EGF-like de la fibronectine de type III (vert) et de la disintégrine (mangenta). Les domaines RGD sont localisés dans la boucle entre deux brins β. (Schurpf *et al.* 2012).

Une liaison avec l'ion calcium au niveau des domaines EGF-like d'EDIL3 a également été proposée (Schurpf *et al.* 2012). Les domaines F5/8C de la protéine permettraient, quant à eux, d'interagir avec les phosphatidylsérines situées à la surface des cellules apoptotiques (**Figure 32**) (Hanayama *et al.* 2004a). Les domaines F5/8C exposeraient une affinité pour la matrice extracellulaire et celle-ci serait plus importante pour le premier F5/8C, par comparaison avec le second (Hidai *et al.* 2007). Chez les mammifères, plusieurs sites de glycosylation potentiels ont été repérés dans la séquence de la protéine EDIL3 (**Figure 34**) (Schurpf *et al.* 2012, Oshima *et al.* 2014). En effet, la protéine EDIL3 de l'homme et celle de la souris exposent 4 sites de N-glycosylation potentiels. La protéine de l'homme contient 2 sites de O-glycosylation supplémentaires qui ont été identifiés précédemment (Oshima *et al.* 2014).

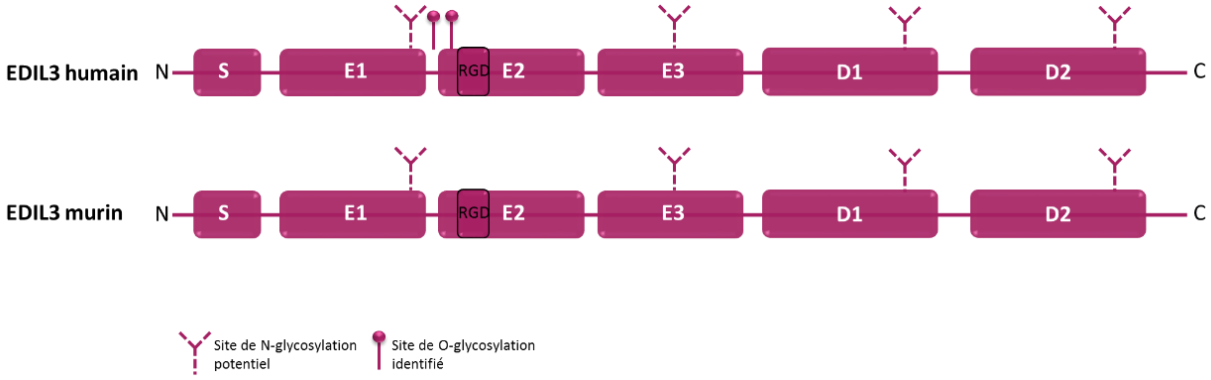


Figure 34. Les sites de glycosylation des protéines EDIL3 de l'homme et de la souris. Adapté de (Oshima *et al.* 2014).

5.2.3. Fonctions biologiques d'EDIL3

EDIL3 est très proche structurellement de MFGE8 et possède des fonctions biologiques communes avec cette dernière. La protéine EDIL3 est impliquée dans plusieurs fonctions en conditions physiologiques et/ou pathologiques (**Figure 35**).

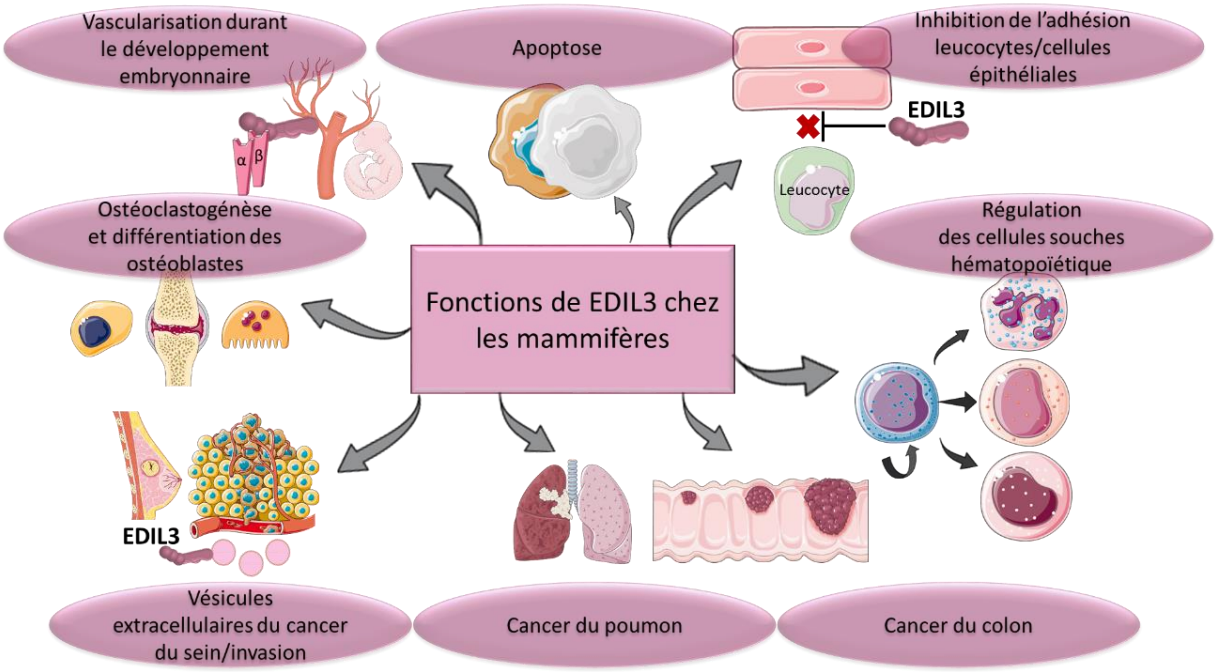


Figure 35. Les diverses fonctions biologiques de la protéine EDIL3 identifiées chez les mammifères.

En condition physiologique, la protéine EDIL3 assure une fonction dans l'angiogenèse durant le développement embryonnaire (Hidai *et al.* 1998). En effet, des analyses sur la membrane chorioallantoïque (CAM) du poussin en développement ont montré que la protéine EDIL3 de la souris participe au remodelage vasculaire (Hidai *et al.* 1998). EDIL3 favorise l'angiogenèse, *via* sa liaison avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Penta *et al.* 1999). Dans la CAM, EDIL3 interagit également avec l'intégrine $\alpha_v\beta_5$ pour induire l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et ainsi provoquer l'angiogenèse (Zhong *et al.* 2003). Cette protéine stimule également l'angiogenèse dans les tissus matures qui ont subi une ischémie (Ho *et al.* 2004). Cette protéine pourrait alors être une molécule d'intérêt dans la thérapie des patients atteints d'ischémie (Zhong *et al.* 2003).

Chez la souris, EDIL3 inhibe l'adhésion des leucocytes au niveau des cellules endothéliales, limitant ainsi le recrutement des cellules immunitaires lors d'infections ou de réactions inflammatoires (Choi *et al.* 2008). EDIL3 aurait alors des effets anti-inflammatoires. De ce fait, EDIL3 pourrait être une molécule cible lors de pathologies impliquant un excès ou une déficience de recrutement des leucocytes (Choi 2009).

Des études ont mis en évidence le rôle d'EDIL3 murin dans l'apoptose (Hanayama *et al.* 2004a, Hanayama *et al.* 2004b, Kitano *et al.* 2010). Les résultats témoignent qu'une expression ectopique de la protéine murine dans des cellules en culture induit l'apoptose de ces dernières (Kitano *et al.* 2010). De plus, l'activité apoptotique d'EDIL3 serait assurée par le troisième domaine EGF-like de la protéine, qui déclencherait l'apoptose cellulaire. Plus récemment, il a été montré que EDIL3 régulerait la prolifération et la différentiation (myélopoïèse) des cellules souches hématopoïétiques (Mitroulis *et al.* 2017).

Au niveau des chondrocytes, la protéine EDIL3 inhibe l'apoptose *via* son interaction avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Wang *et al.* 2016b, Wang *et al.* 2018). Chez la souris, une délétion du gène codant pour la protéine entraine une perte du cartilage au niveau des oreilles et des genoux (Wang *et al.* 2016b). La régulation de l'apoptose des chondrocytes, dans laquelle EDIL3 est impliquée, pourrait être un élément clef de la thérapie de l'osthéoarthrose (Wang *et al.* 2018).

De récentes études chez les mammifères ont également souligné l'implication d'EDIL3 dans l'ostéoclastogénèse et la perte osseuse chez les primates non humains et la différentiation des ostéoblastes *via* l'intégrine $\alpha_v\beta_1$ dans des cellules en culture (Shin *et al.* 2015, Oh *et al.* 2017). L'administration de la protéine EDIL3 inhiberait aussi la production de l'interleukin-17, ce qui réduirait la perte osseuse liée à une inflammation pathologique (Eskan *et al.* 2012).

Plusieurs études rapportent l'implication de la protéine EDIL3 dans le développement du cancer du côlon, du poumon, du pancréas et de l'hépatocarcinome (Zou *et al.* 2008, Lee *et al.* 2015, Calvisi *et al.* 2016, Jiang *et al.* 2016). EDIL3 contribuerait à la croissance tumorale de certains cancers humains *via* son activité de vascularisation (Aoka *et al.* 2002). Dans le cancer du sein, EDIL3 est retrouvée au niveau des vésicules extracellulaires participant à la prolifération et l'invasion cellulaire chez l'homme (Lee *et al.* 2016). En effet, chez les patients atteint de métastases de cancer du sein, le niveau d'EDIL3 sur les vésicules circulantes est significativement augmenté. Le rôle clef d'EDIL3 dans l'invasion du cancer du sein ferait de cette protéine un biomarqueur et une cible thérapeutique de cette pathologie (Lee *et al.* 2016).

Enfin, chez le crapaud, EDIL3 serait essentielle pour le développement dorsal de l'embryon (Arakawa *et al.* 2007). Cette fonction biologique serait médiée par les domaines F5/8C de la protéine EDIL3 de l'amphibien.

5.3. EDIL3 et MFGE8 dans la coquille d'œuf

Les protéines EDIL3 et MFGE8 ont été identifiées dans les études à haut-débit réalisées dans le but d'étudier le processus de formation de la coquille d'œuf des oiseaux. Ainsi, la protéine EDIL3 a été identifiée dans 9 études de protéomique conduites sur la coquille d'œuf ou le fluide utérin de la poule (Mann *et al.* 2006, Miksik *et al.* 2010, Kaweewong *et al.* 2013, Miksik *et al.* 2014, Marie *et al.* 2015a, Marie *et al.* 2015b, Rose-Martel *et al.* 2015, Cordeiro et Hincke 2016, Ahmed *et al.* 2017). De son côté, MFGE8 a été identifiée dans 8 études de protéomique réalisées sur la coquille d'œuf ou le fluide utérin de la poule (Miksik *et al.* 2010, Kaweewong *et al.* 2013, Sun *et al.* 2013, Marie *et al.* 2015a, Marie *et al.* 2015b, Rose-Martel *et al.* 2015, Cordeiro et Hincke 2016, Ahmed *et al.* 2017). EDIL3 a également été retrouvée dans la coquille des œufs de dinde et de caille (Mann et Mann 2013, Mann et Mann 2015) et MFGE8 dans celles des œufs de dinde, de diamant mandarin, de caille et de canard (Mann et Mann 2013, Mann 2015, Mann et Mann 2015, Zhu *et al.* 2019). Une récente étude a rapporté une liste de 64 protéines communes aux coquilles des œufs de poule, de dinde, de caille et de canard, dans laquelle on retrouve la protéine MFGE8 (Zhu *et al.* 2019). Ces protéines semblent donc avoir un rôle clef dans le processus de minéralisation de la coquille des oiseaux, puisqu'elles sont partagées par les quatre espèces.

Ces études qualitatives ont été complétées par des approches quantitatives. Sun et collaborateurs ont comparé l'abondance des protéines contenues dans le fluide utérin de poules pondant des œufs solides ou fragiles (Sun *et al.* 2013). Ils ont ainsi observé que MFGE8 était

1,8 fois plus abondante dans le fluide utérin des poules pondant les œufs solides. Une autre étude quantitative du fluide utérin présentée dans le paragraphe **4.3.2**, a permis de hiérarchiser l'abondance de ces protéines dans ce milieu de formation de la coquille. Ainsi, en terme d'abondance, les protéines EDIL3 et MFGE8 correspondent respectivement aux 51ème et 75ème protéines du fluide (Marie *et al.* 2015a).

Une étude de protéomique quantitative sur la matrice organique de la coquille d'œuf de poule a également été présentée dans le paragraphe **4.3.2**. Cette étude a permis l'analyse de l'abondance des protéines de la matrice organique au cours du processus de minéralisation de la coquille d'œuf de poule (Marie *et al.* 2015b). Les résultats indiquent que la protéine EDIL3 est la 4ème protéine la plus abondante à 6 h et la 3ème à 7 h p.o., lors de la transformation de l'ACC en calcite et la formation des unités cristallines de calcite (**Figure 36**) (Marie *et al.* 2015b, Rodriguez-Navarro *et al.* 2015). EDIL3 est également la 3ème protéine à 16 h p.o., lors de la croissance rapide des colonnes de cristaux (Marie *et al.* 2015b, Rodriguez-Navarro *et al.* 2015). De son côté, la protéine MFGE8 correspond à la 22ème protéine en terme d'abondance à 7 h p.o. (**Figure 36**) (Marie *et al.* 2015b). Ces deux protéines semblent donc impliquées dans l'initiation de la minéralisation, lors des premiers évènements de nucléation et la transformation de l'ACC en calcite (Marie *et al.* 2015b, Rodriguez-Navarro *et al.* 2015). Toutefois, EDIL3 est également retrouvée de manière abondante dans la suite du processus, durant le développement des colonnes de cristaux préférentiellement orientées. Cette dernière semble donc jouer un rôle essentiel tout au long du processus de calcification de la coquille d'œuf de poule.

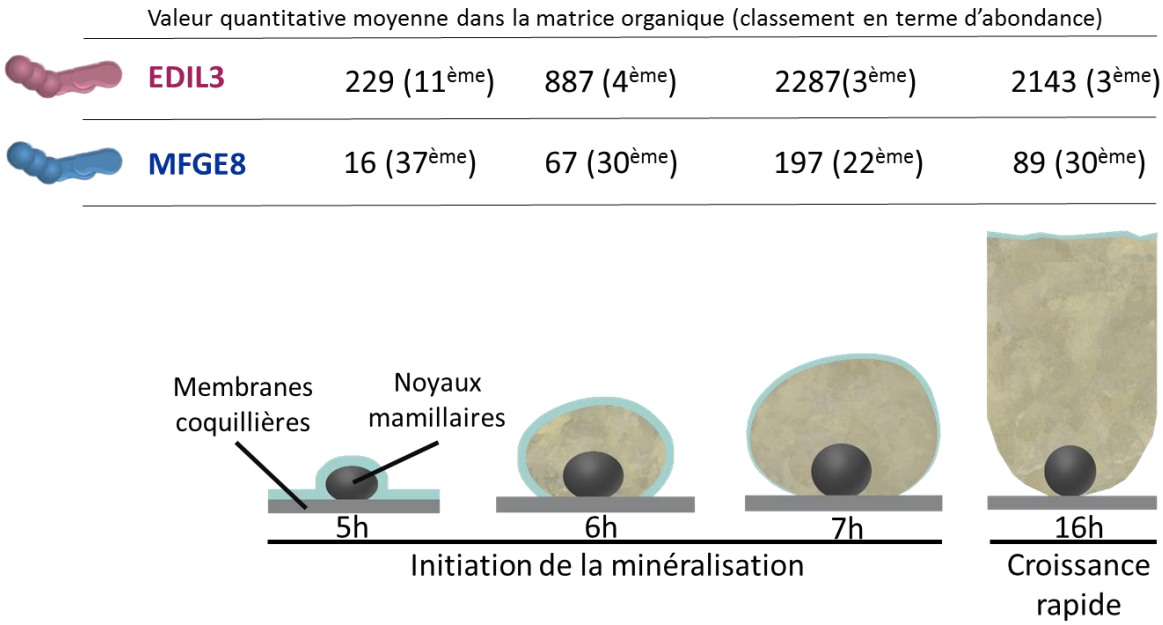


Figure 36. Abondance des protéines EDIL3 et MFGE8 dans la matrice organique au cours du processus de biominéralisation de la coquille d'œuf de poule. Adapté de (Marie *et al.* 2015b).

Au niveau transcriptomique, plusieurs études ont révélé l'expression des gènes codant pour les protéines EDIL3 et MFGE8 dans le tissu utérin, qui est le segment de l'oviducte responsable de la formation de la coquille. Lorsqu'une coquille d'œuf est en formation, les gènes *Edil3* et *Mfge8* sont exprimés au niveau de l'utérus (Brionne *et al.* 2014). Une étude RNA-Seq de l'expression des gènes du tissu utérin au cours du processus de calcification a permis de constater une expression du gène *Edil3* tout au long du processus qui atteint son maximum à 5-6 h post-ovulation (Gautron 2017a). L'expression du gène *Mfge8* est caractérisée par un maximum à 5-6 h post-ovulation, une chute d'expression à 7 h post-ovulation qui est suivie d'une augmentation d'expression à 16 h post-ovulation (Gautron 2017a).

Le facteur de croissance EGF-like consiste en une chaîne peptidique d'une cinquantaine d'acide aminés contenant 6 cystéines impliquées dans 3 ponts disulfures (Savage *et al.* 1972, Rao *et al.* 1995) (**Figure 37**). Ces ponts disulfures fournissent la structure tertiaire à ce domaine protéique (Boonstra *et al.* 1995). Plusieurs études démontrent la possibilité de liaison au calcium des domaines EGF-like. La capacité de liaison au calcium des EGF-like a été montrée pour la première fois au niveau des facteurs de coagulation IX et X de l'homme (Huang *et al.* 1989, Handford *et al.* 1990). Cette capacité de liaison a ensuite été démontrée dans la fibrilline-1 humaine qui contient 47 domaines EGF-like dont 43 pouvant lier le calcium (Pereira *et al.*

1993, Knott *et al.* 1996). Les domaines EGF-like, qui ont la capacité de se lier au calcium, possèdent une séquence consensus Asp-Asp/Asn-Asp/Asn-Tyr/Phe, en complément des 6 cystéines (**Figure 37**) (Handford *et al.* 1990, Handford *et al.* 1991).

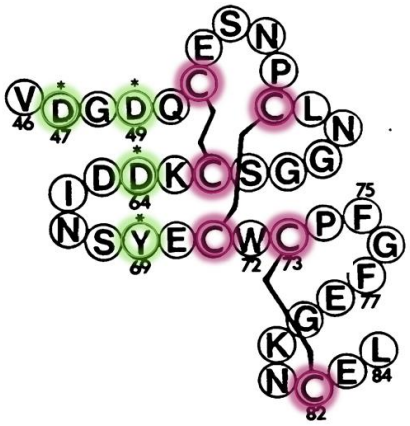


Figure 37. Structure du premier domaine EGF-like du facteur de coagulation IX humain. Les cystéines impliquées dans les ponts disulfures sont en rouge et les résidus impliqués dans la liaison au calcium sont en vert. (Handford *et al.* 1990).

Des mutations dans cette séquence consensus altèrent la capacité de liaison au calcium (Handford *et al.* 1991, Handford *et al.* 1995). La structure du domaine EGF-like du facteur de coagulation IX est illustrée en **figure 37**. Ce domaine contient un feuillet β majeur, un feuillet β mineur ainsi que 5 coudes β (Selandersunnerhagen *et al.* 1992). Le calcium est ainsi piégé dans une boucle entre deux feuillets β (Selandersunnerhagen *et al.* 1992).

Dans ce contexte, il a été proposé que les protéines EDIL3 et MFGE8 de la poule pourraient posséder une capacité de liaison au calcium qui leur permettrait d'adhérer aux cristaux qui forment la coquille (**Figure 38**) (Marie *et al.* 2015a, Marie *et al.* 2015b).

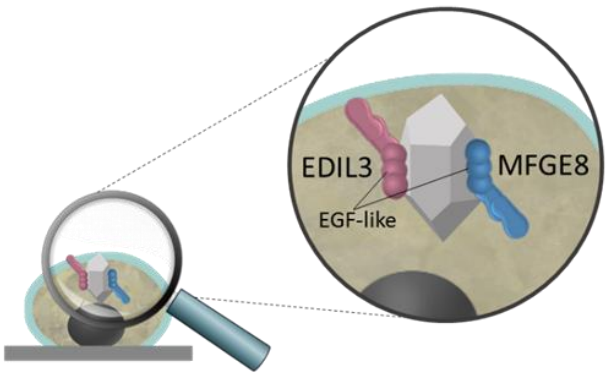


Figure 38. Adsorption potentielle des protéines EDIL3 et MFGE8 sur un cristal de calcite lors de la formation de la coquille. L'adsorption serait possible *via* les EGF-like présents dans les protéines.

III. *Objectifs de la thèse*

« Il n'est pas de vent favorable pour celui qui ne sait où il va »

Sénèque

La synthèse bibliographique m'a permis d'exposer le rôle fondamental des matrices organiques dans le phénomène de biominéralisation, et en particulier pour celui de la coquille d'œuf qui a été le modèle d'étude durant mon doctorat. De par ses interactions avec les phases minérales, la matrice organique module la croissance et l'organisation de ce biomatériau, donnant à la coquille des propriétés remarquables (vitesse de minéralisation, propriétés mécaniques). Les propriétés mécaniques de cette enveloppe protectrice et les paramètres les influençant ont été exposés dans la synthèse bibliographique. La croissance du carbonate de calcium, qui est le minéral cristallin de la coquille, est contrôlée par une matrice organique synthétisée par l'utérus de la poule. Au niveau du fluide utérin, cette matrice interagit avec le minéral pour modifier la taille, la morphologie, l'orientation et la vitesse de croissance des cristaux de calcite. La matrice organique de la coquille a fait l'objet de nombreuses études et plus de 900 protéines ont été identifiées dans la coquille d'œuf de poule (Gautron 2019). L'ensemble des études de protéomique et transcriptomique présentées dans le paragraphe **4.3.2** de la synthèse bibliographique a fourni une analyse globale de la matrice organique de coquille. La fonction potentielle des protéines les plus abondantes de la matrice organique et leurs variations au cours du processus de minéralisation ont été déterminées. Ainsi, les protéines assurant un rôle crucial dans ce processus ont pu être mises en évidence. Elles se répartissent en deux groupes majoritaires correspondant :

- aux protéines qui sont directement impliquées dans la minéralisation.

- aux protéines qui régulent l'activité des autres protéines du milieu.

Parmi les protéines clefs de la minéralisation, seules quelques protéines (OC-17, OC-116, OCX-36, OCX-32, Lysozyme, Osteopontin, Ovalbumine, Ovotransferrine), ont une fonction ayant été explorée expérimentalement (Hincke 1995, Hincke *et al.* 2000, Gautron *et al.* 2001a, Gautron *et al.* 2001b, Jimenez-Lopez *et al.* 2003, Schwahn *et al.* 2004, Voinescu *et al.* 2007, Hernandez-Hernandez *et al.* 2008a, Hincke *et al.* 2008, Pipich *et al.* 2008, Wang *et al.* 2009b, Freeman *et al.* 2010, Wang *et al.* 2010, Wolf *et al.* 2011).

Dans ce contexte, mes recherches avaient pour but de caractériser la fonction de deux protéines clefs EDIL3 (EGF-like repeats and discoidin-like domains 3) et MFGE8 (Milk fat globule-EGF factor 8) dont les fonctions lors de la calcification de la coquille étaient jusqu'alors inexplorées.

Mon travail de thèse s'est déroulé autour de deux axes principaux (**Chapitres 1** et **2** de ce manuscrit).

L'objectif du premier axe était de caractériser les protéines EDIL3 et MFGE8 chez la poule (*Gallus Gallus*) et de déterminer leur rôle dans le processus de minéralisation de la coquille d'œuf de poule (**Chapitre 1**).

En débutant ce travail de thèse, nous nous sommes aperçus que les protéines EDIL3 et MFGE8 étaient apparentées et dans un premier temps, nous avons souhaité retracer l'histoire évolutive de ces deux protéines *via* des analyses de phylogénie et de synténie. Par la suite, l'implication des protéines EDIL3 et MFGE8 durant la minéralisation de la coquille a été étudiée en mesurant l'expression des gènes et l'abondance protéique au niveau des segments responsables de la formation de la coquille, aux différents stades clefs de la minéralisation. Afin d'étudier leur fonction dans le processus de formation de la coquille, nous avions envisagé de réaliser des tests d'interaction minéral/protéine lors d'expériences de cristallisation *in vitro* auprès du Pr. Alejandro Rodriguez-Navarro de l'Université de Grenade (Espagne). Afin d'effectuer les tests fonctionnels *in vitro*, de nombreux essais de purification sur colonnes par HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance : chromatographie échangeuse d'ions, chromatographie d'affinité …), ont été réalisés. Seules des fractions protéiques contenant EDIL3 et MFGE8 parmi d'autres protéines ont été obtenues. En effet, la grande quantité de protéines contenue dans la coquille (≈ 900 protéines) et le fait que celles-ci soient inclues dans le minéral augmentent la difficulté des purifications des protéines de la matrice organique de coquille. Au cours de ce premier axe, le rôle des protéines EDIL3 et MFGE8 a fait l'objet d'une étude *in silico* approfondie, afin d'analyser les séquences géniques, des ARN messagers et protéiques. En complément, les structures tridimensionnelles de ces protéines ont été modélisées *via* une méthode basée sur l'homologie. Ainsi, les domaines fonctionnels et les propriétés moléculaires de ces deux protéines ont été identifiées et leur fonction potentielle dans la biominéralisation de la coquille a pu être explorée. La confrontation des données bibliographiques avec ces nouveaux résultats nous a permis de proposer une hypothèse de transport vésiculaire du minéral qui impliquerait les protéines EDIL3 et MFGE8 dans l'adressage des vésicules. Ce travail a fait l'objet d'un premier article dont je suis le premier auteur. L'article 1 de ce manuscrit : « *The glycoproteins EDIL3 and MFGE8 regulate vesicle - mediated eggshell calcification in a new model for avian biomineralisation* » présente l'ensemble de la démarche et les résultats obtenus. Cet article a été publié en octobre 2019, dans la revue « *Journal of Biological Chemistry* », d'impact factor 4.106. Il apparait page 132 de ce manuscrit. Ce travail a également été présenté lors de conférences nationales (30ème colloque Biotechnocentre, Seillac, France ; 20èmes Journées Françaises de la Biologie des Tissus

Minéralisés, Monaco, France) et internationale (XVth European Poultry Conference, Dubrovnik, Croatia).

L'objectif du second axe était de vérifier expérimentalement l'hypothèse d'un transport vésiculaire proposée dans le premier axe de ce manuscrit (**Chapitre 2**). Pour cela, j'ai mis en œuvre des techniques de microscopie électronique, de spectroscopie, de biologie moléculaire, de biochimie et de protéomique afin de rechercher une activité vésiculaire dans le tissu et le fluide utérin. Par la suite, nous avons vérifié la contribution de ces vésicules extracellulaires dans le transport du minéral et la forme du minéral présent dans ces vésicules. Ces analyses nécessitaient une expertise dans les domaines de la microscopie et la minéralogie (microscopie électronique à transmission ; MET, spectroscopie des pertes d'énergie ; EELS et spectroscopie de rayons-X à dispersion d'énergie ; EDS). Ces approches ont été accomplies en collaboration avec le Département de Minéralogie et Pétrologie de l'Université de Grenade (Espagne) et la plateforme de microscopie électronique de l'Université de Tours. Par la suite, j'ai cherché à identifier les acteurs moléculaires de ce transport vésiculaire impliqué dans le transfert du minéral. Ainsi, une analyse d'expression de gènes à haut-débit a été réalisée *via* le système Fluidigm, en collaboration avec la plateforme GeT-GenoToul de Toulouse. En complément, une analyse de protéomique des vésicules extracellulaires purifiées à partir du fluide utérin a été réalisée en collaboration avec la plateforme de protéomique PAIB de l'INRA de Tours. Pour confirmer les acteurs moléculaires identifiés, des immunoblots ont été effectués sur les vésicules isolées à partir du fluide utérin. Enfin, les protéines prédites pour avoir un rôle clef dans ce transport ont été localisées dans le tissus utérin, aux stades pivots de la minéralisation. Ce travail de recherche a fait l'objet d'un second article « *A new model for avian shell biomineralization : vesicular transport ensures delivery of stabilized amorphous calcium carbonate* », dont je suis le premier auteur. Cet article, qui apparait page 163 de ce manuscrit, a été soumis à « *eLife* » en octobre 2019. Ce travail a également été présenté lors de conférences nationales (13èmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Tours, France ; 21èmes Journées Françaises de la Biologie des Tissus minéralisés, Boulogne-sur-Mer, France) et internationales (XVIII European symposium on the quality of eggs and egg products and XXIV European symposium on the quality of poultry meat, Cezme, Turkey ; XV International symposium on biomineralization, Munich, Germany).

Au cours de ce doctorat, un travail additionnel a été réalisé durant une mission de 3 mois et demi auprès du Pr. Alejandro Rodriguez-Navarro du département de Pétrologie et Minéralogie de l'université de Grenade en Espagne. Cette mobilité a été réalisée dans le cadre

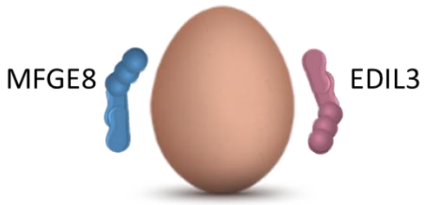
du parcours « École internationale de recherche d'Agreenium » (EIR-A) que j'ai suivi durant cette thèse et qui permet aux doctorants de suivre les enjeux actuels majeurs de l'agronomie. La qualité sanitaire est l'un des enjeux majeurs de la filière œuf et la coquille constitue la barrière physique de l'œuf qui permet de maintenir son intégrité (Nys *et al.* 2004, Nys et Gautron 2007, Hincke *et al.* 2012). Ainsi, la compréhension des paramètres influençant les propriétés mécaniques de l'œuf et donc la qualité de ce dernier est un élément clef. Dans la revue bibliographique, nous avons vu que la coquille d'œuf résiste à 3-4 kg de pression statique (Hincke *et al.* 2011). Environ, 60 % de la variabilité de qualité coquille est liée à l'épaisseur et la densité (Richards et Swanson 1965). Cette variabilité est également liée à la microstructure de la coquille et la composition de sa matrice organique (Rodriguez-Navarro *et al.* 2002, Rodriguez-Navarro 2007, Nys *et al.* 2010). L'un des objectifs majeurs des acteurs de la filière œuf (généticiens, éleveurs et producteurs) est l'allongement de la période de ponte au-delà de 80 semaines. Dans ce contexte, une meilleure compréhension des paramètres influençant la qualité de coquille en fonction de l'âge et en fonction de la solidité de la coquille à un âge donné, est essentielle pour maintenir un bon niveau de production en fin de période de ponte. Ainsi, l'objectif de cette étude a été de mesurer des paramètres de composition et de structure de la coquille d'œufs issus de poules à différents âges (36, 65 et 85 semaines). Par ailleurs, les coquilles collectées à 36 et 85 semaines, ont été divisées en 2 groupes de solidité de coquille pour chaque période d'âge (forte résistance à la rupture, HBS et faible résistance à la rupture, LBS). Des paramètres de composition (coquille et cuticule), d'ultrastructure (épaisseur des différentes couches de coquille) et de microstructure (taille, nombre et orientation des cristaux) ont ainsi été explorés et confrontés entre les groupes. Des techniques de thermogravimétrie, de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, de diffraction des rayons-X (XRD et 2D-XRD) et de microscopie électronique à balayage ont été employées pour obtenir ces mesures. Les résultats ont permis de mettre en évidence des variations de plusieurs paramètres de composition ou de structure en fonction de l'âge et de la qualité de coquille (**Annexe 1**). Ce travail fait l'objet d'un article qui est en cours de rédaction (*Structural parameters impacting mechanical properties of eggshells from selected hens*). Une version française de l'article qui expose la démarche et les résultats de cette étude est présentée page 304 de ce manuscrit (**Annexe 2**). Celui-ci sera soumis à une revue à comité de lecture au cours de l'année 2020.

IV. *Résultats expérimentaux*

« La connaissance s'acquiert par l'expérience, tout le reste n'est que de l'information »

Albert Einstein

Chapitre 1 : Le rôle des glycoprotéines EDIL3 et MFGE8 dans un nouveau modèle de transport vésiculaire pour la calcification de la coquille d'œuf des oiseaux



Présentation des travaux réalisés dans ce chapitre (article 1)

« The glycoproteins EDIL3 and MFGE8 regulate vesicle-mediated eggshell calcification in a new model for avian biomineralization »

Lilian Stapane[1], Nathalie Le Roy[1], Maxwell T. Hincke[2], Joël Gautron[1]*

From [1]BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France; [2]Department of Innovation in Medical education, Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Ottawa, Ottawa, K1H 8M5, Canada

Mots clefs : Biominéralisation, coquille d'œuf, EGF-like repeats and discoidin-like domains 3 (EDIL3), milk fat globule-EGF factor 8 (MFGE8), vésicules extracellulaires, transport vésiculaire, fluide utérin, glycoprotéines.

L'article publié est présenté page 132 de ce manuscrit.

Introduction et objectifs

La revue bibliographique a permis de dresser l'état des connaissances lors du commencement de ce travail. L'objectif de cet article était de caractériser les protéines EDIL3 et MFGE8 chez la poule et de déterminer leur rôle dans le processus de minéralisation de la coquille d'œuf. Pour ce faire, la démarche suivie est décrite en **figure 39**.

Ainsi, il est rappelé que la coquille d'œuf de poule constitue une barrière physique contre les agressions mécaniques et microbiennes pour permettre le développement extra-utérin de l'embryon des oiseaux. La coquille est composée de 95 % de carbonate de calcium ($CaCO_3$) sous forme de calcite, de 3,5 % d'une matrice organique (MO ; protéines, polysaccharides et protéoglycanes) et de 1,5 % d'eau (Nys *et al.* 2004, Hincke *et al.* 2012). La formation de la coquille se déroule en 3 phases principales dans l'oviducte de la poule (Nys *et al.* 1991, Nys *et al.* 1999). Durant la phase initiale (5-10 h post-ovulation), les premiers cristaux de calcite sont formés autour des noyaux mamillaires. La phase de croissance (10-22 h post-ovulation) correspond à la formation de la couche palissadique *via* un dépôt rapide de calcite. La phase terminale désigne l'arrêt de la minéralisation et le dépôt de la cuticule qui précède l'oviposition (22-24 h post-ovulation). Au cours de la minéralisation, le carbonate de calcium est tout d'abord

déposé sous une forme amorphe (ACC) qui se transforme progressivement en calcite (Rodriguez-Navarro *et al.* 2015). La matrice organique de la coquille stabilise l'ACC, favorise la nucléation, sélectionne le type polymorphique et régule la formation du cristal (Arias *et al.* 1993, Gautron *et al.* 1997, Dominguez-Vera *et al.* 2000). Ce sont ces interactions entre la matrice organique et la phase minérale qui vont fournir à la coquille sa texture et ses propriétés mécaniques. De nombreuses études de protéomique ont permis l'identification des protéines de la matrice organique de coquille (Mann *et al.* 2006 ; Mann *et al*. 2007 ; Miksik *et al*. 2010 ; Rose-Martel *et al*. 2012 ; Sun *et al*. 2013 ; Kaweewong *et al.* 2013 ; Miksik *et al*. 2014 ; Ahmed *et al*. 2017). Actuellement, plus de 900 protéines non-redontantes ont été identifiées dans la coquille d'œuf de poule (Gautron 2019). Parmi celles-ci, EDIL3 et MFGE8 ont été rapportées dans la majorité des études de protéomique (Mann *et al.* 2006, Miksik *et al.* 2010, Rose-Martel *et al.* 2012, Kaweewong *et al.* 2013, Sun *et al.* 2013, Miksik *et al.* 2014, Marie *et al.* 2015b, Ahmed *et al.* 2017). Ces deux protéines sont majoritairement abondantes durant l'initiation de la minéralisation, même si EDIL3 est aussi fortement retrouvée durant la phase de croissance rapide (Marie *et al.* 2015b). Elles ont également été retrouvées dans les coquilles des œufs de caille, de dinde et de pintade (Mann et Mann 2013, Mann et Mann 2015, Le Roy *et al.* 2019). Les glycoprotéines EDIL3 et MFGE8 ont été caractérisées chez les mammifères et affichent des similarités de séquences. Une récente étude a proposé un rôle potentiel pour ces deux protéines qui consisterait à contrôler la croissance du minéral *via* leur domaine de liaison au calcium (Marie *et al.* 2015a). Toutefois, le rôle de ces deux protéines dans le processus de biominéralisation de la coquille d'œuf reste indéterminé.

Ainsi, l'implication des protéines d'EDIL3 et MFGE8 dans la formation de la coquille d'œuf des oiseaux et leur rôle dans ce processus ont été explorés.

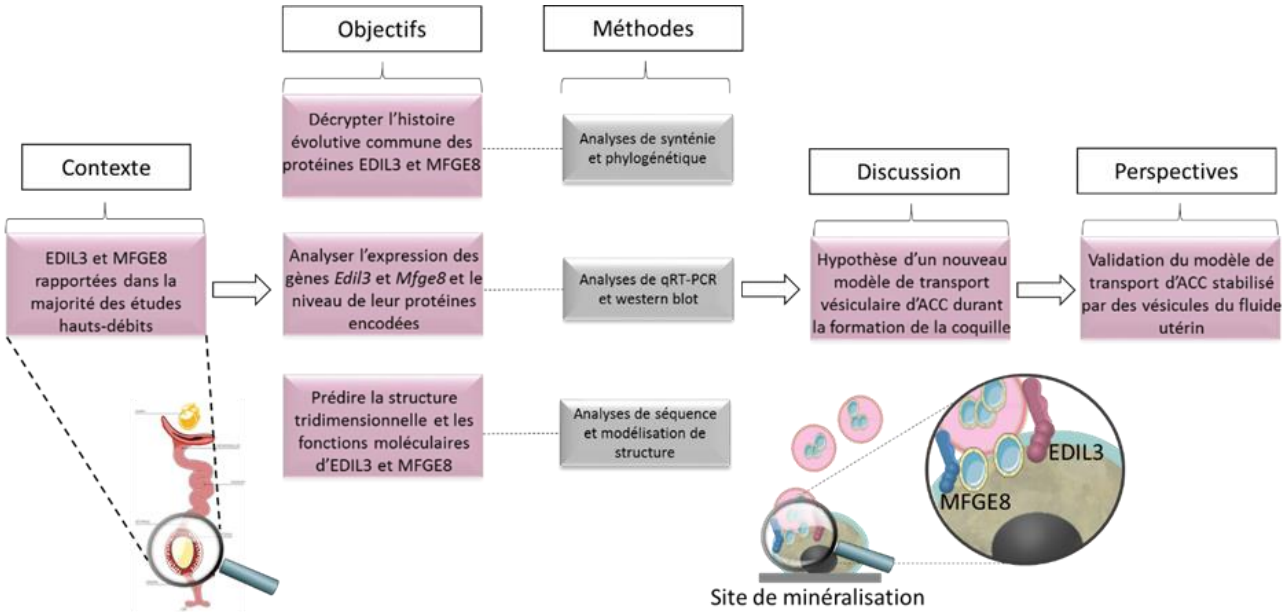


Figure 39. Diagramme de la démarche suivie pour l'article 1.

Résultats et discussion

1. Histoire évolutive d'EDIL3 et MFGE8

Dans cette partie, nous avons utilisé des outils bioinformatiques pour décrypter l'histoire évolutive commune des gènes *Edil3* et *Mfge8* à travers les eumétazoaires en utilisant des analyses de synténie et de phylogénie.

EDIL3 et MFGE8 sont deux protéines apparentées qui partagent 54 % d'identité et 69 % de similarité chez le poulet. Ces protéines sont encodées par deux gènes distincts, respectivement localisés sur le chromosome Z et le chromosome 10 de *Gallus gallus*. Dans une première étape, les loci des gènes *Edil3* et *Mfge8* ont été comparés chez 8 espèces provenant de différentes classes de vertébrés *via* le Genome data viewer de NCBI. Les résultats indiquent que les gènes *Edil3* et *Mfge8* sont nichés dans des clusters synténiques contenant *Hapln1* (hyaluronan and proteoglycan link protein 1) et *Vcan* (versicane) pour *Edil3* et *Hapln3* (hyaluronan and proteoglycan link protein 3) et *Acan* (aggrécane) pour *Mfge8*. La protéine HAPLN3 est l'une des protéines les plus abondantes dans la coquille d'œuf de poule et HAPLN1 a récemment été identifiée dans les membranes coquillières (Marie *et al.* 2015b, Cordeiro et Hincke 2016). HAPLN1, ACAN et VCAN sont également des protéines de la matrice cartilagineuse (Kiani *et al.* 2002, Shibata *et al.* 2003, Matsumoto *et al.* 2006). Par

conséquent, l'ensemble des gènes engagés dans les clusters synténiques identifiés, est impliqué dans la calcification des vertébrés. De plus, les directions relatives de transcription des gènes des clusters sont inchangées durant l'évolution des vertébrés. Ces résultats indiquent que les clusters sont hautement conservés chez les Gnathostomes et confirment que les loci dont font partie *Edil3* et *Mfge8* contiennent des gènes paralogues résultant d'un évènement de duplication.

Pour retracer l'histoire évolutive des deux protéines et déterminer leur point de divergence, une analyse phylogénétique a été réalisée chez les eumetazoaires. Pour cela, 34 séquences EDIL3/MFGE8 de 19 espèces provenant de différents taxons de vertébrés/invertébrés ont été utilisées. Les séquences ont été alignées en utilisant la méthode d'alignement multiple Clustal Omega du logiciel MEGA7. Un arbre phylogénétique a ensuite été construit avec les méthodes de maximum de vraisemblance et d'inférence bayésienne qui ont conduit à la même topologie. L'analyse de l'arbre généré a permis d'identifier une distinction entre *Edil3* et *Mfge8* ayant émergé il y a environ 480 millions d'années. Cela a conduit à une divergence/diversification de leur séquence qui a ainsi donné lieu à *Edil3* et *Mfge8* des vertébrés. Cet évènement est apparu après la séparation invertébrés/vertébrés (684 millions d'années) et avant la divergence des phyla poissons/amphibiens (473 millions d'années). L'arbre phylogénétique suggère également un autre évènement de duplication dans la lignée des invertébrés.

Une analyse des différents domaines des protéines EDIL3 et MFGE8 au cours de l'évolution a ensuite été réalisée sur les séquences utilisées pour l'analyse phylogénétique. Cette analyse indique la présence de domaines EGF-like dans toutes les séquences des vertébrés et l'absence de ces domaines dans les séquences invertébrés, à l'exception du Cnidaire *A.digitifera*. Chez les vertébrés, EDIL3 et MFGE8 comptent 3 EGF-like, à l'exception des protéines EDIL3 des poissons et des protéines MFGE8 des mammifères primates (1 EGF-like) et non-primates (2 EGF-like). Le domaine EGF-like le plus conservé des vertébrés renferme un motif RGD dans les deux protéines. Ce motif affiche une forte affinité aux intégrines, exprimées à la surface des cellules (Andersen *et al.* 1997). Cela confirme le rôle majeur de ce motif dans les interactions cellulaires (Thery *et al.* 1999, Hanayama *et al.* 2002, Ait-Oufella *et al.* 2007). Un motif de liaison au calcium a également été prédit dans le 3ème domaine EGF-like des protéines EDIL3 et MFGE8 des vertébrés (à l'exception des protéines EDIL3 des poissons). Toutefois, la protéine MFGE8 a perdu ce motif au niveau de la divergence des ovipares et vivipares. De plus, chez les vertébrés, ce motif de liaison au calcium a seulement été retrouvé

chez le corail *A.digitifera* qui minéralise un exosquelette de carbonate de calcium. Finalement, les résultats ont aussi montré la présence de domaines F5/8C dans les séquences de toutes les espèces étudiées. Chacune des séquences vertébrées renferme deux domaines F5/8C. Les seconds domaines F5/8C des protéines MFGE8 de la souris et de la vache sont connus pour interagir avec les phospholipides (Andersen *et al.* 1997, Shi *et al.* 2004, Shao *et al.* 2008, Ye *et al.* 2013). Nous avons pu identifier dans les séquences EDIL3 et MFGE8 de la poule, les motifs identifiés chez la souris et la vache. Cette fonction moléculaire permet à ces protéines de se lier aux vésicules et aux membranes des cellules afin d'assurer des interactions cellulaires et un transport exosomal (Thery *et al.* 1999, Hanayama *et al.* 2002, Gatti *et al.* 2005).

2.Expression génique et niveau des protéines EDIL3 et MFGE8 durant la minéralisation de la coquille

Pour confirmer l'implication d'EDIL3 et MFGE8 dans la minéralisation de la coquille, nous avons quantifié l'expression de leurs gènes au sein des tissus impliqués à différents stades de la calcification de la coquille. Nous avons également vérifié la présence des deux protéines dans la coquille, l'utérus et le fluide utérin qui est le milieu qui baigne l'œuf durant le processus de minéralisation (Gautron *et al.* 1997).

Les expressions des gènes *Edil3* et *Mfge8* ont été quantifiées dans les différents segments de l'oviducte (magnum, isthme blanc, isthme rouge et utérus), et comparées à celles de l'os (tissu minéralisé), du duodénum (impliqué dans l'apport du calcium), du rein (impliqué dans le transfert d'ions) et du foie (impliqué dans le métabolisme général). Ces mesures de la variation d'expression selon les tissus ont été déterminées lors de la phase de croissance rapide de la minéralisation (10 h post-ovulation). Les expressions de ces deux gènes ont ensuite été évaluées aux stades pivots de la minéralisation dans les segments responsables de la minéralisation de la coquille (isthme rouge et utérus). Enfin, des analyses de western blots ont permis de vérifier la présence des protéines EDIL3 et MFGE8 dans la coquille, le fluide utérin et l'utérus.

Les résultats montrent une surexpression significative du gène *Edil3* dans les segments de l'oviducte impliqués dans la formation de la coquille. Au niveau de l'utérus, l'expression du gène *Edil3* est significativement plus élevée à 6 h et 7 h post-ovulation par comparaison au stade 16 h, alors que son expression ne varie pas dans l'isthme rouge pendant la minéralisation. De plus, les analyses de western blots effectuées ont permis de confirmer la présence de la protéine EDIL3 dans la matrice organique soluble de la coquille, le fluide utérin et l'utérus.

Enfin, notre analyse des résultats de données de RNA-Seq et de protéomique (Gautron 2017a) indique que l'expression du gène *Edil3* est trois fois plus élevée que la moyenne d'expression des gènes utérins et que la protéine EDIL3 est la 6ème plus abondante de la matrice organique de la coquille. Ces résultats suggèrent un rôle central de la protéine EDIL3 dans le processus de minéralisation de la coquille.

De son côté, *Mfge8* est exprimé dans tous les tissus avec une expression maximale dans le foie. Les résultats montrent également une forte expression de *Mfge8* dans l'isthme rouge, qui est le segment dans lequel débute la minéralisation. Au cours de la minéralisation, l'expression de ce gène ne varie ni dans l'utérus, ni dans l'isthme rouge. Les résultats des western blots confirment la présence de la protéine MFGE8 dans la coquille, le fluide utérin et l'utérus. La protéine a également été identifiée dans le duodénum qui est impliqué dans l'apport du calcium, nécessaire à la formation de l'os et de la coquille. De plus, les résultats de l'analyse des données de RNA-Seq et de protéomique indiquent que *Mfge8* est deux fois plus exprimé que la moyenne des gènes utérins et que la protéine MFGE8 est la 34ème plus abondante dans la matrice organique de la coquille (Gautron 2017a). Ces résultats supportent un rôle de la protéine MFGE8 dans la minéralisation de la coquille qui serait moins primordial que celui d'EDIL3.

3. Hypothèse d'un nouveau modèle de transport vésiculaire du carbonate de calcium amorphe durant la minéralisation de la coquille

Nous avons ensuite exploré le rôle des protéines EDIL3 et MFGE8 dans ce phénomène de biominéralisation. Pour cela, nous avons modélisé les structures tridimensionnelles des protéines EDIL3 et MFGE8 de *Gallus gallus* pour prédire leurs fonctions moléculaires. Les structures tridimensionnelles des protéines EDIL3 et MFGE8 du poulet (*Gallus gallus*) ont été modélisées avec le programme I-TASSER pour confirmer leurs fonctions moléculaires dans cette espèce. Cette étude était basée sur un principe d'homologie, afin de transposer les fonctions moléculaires identifiées dans les autres espèces (Andersen *et al.* 1997, Shao *et al.* 2008, Raymond *et al.* 2009, Ye *et al.* 2013). L'organisation structurale et les acides aminés impliqués dans les fonctions moléculaires des protéines EDIL3 et MFGE8 des mammifères, ont été explorés dans les protéines de la poule. Les résultats démontrent que les deux protéines de la poule ont la capacité de se lier au calcium *via* leur 3ème domaine EGF-like et aux phospholipides des cellules ou des vésicules *via* leur second domaine F5/8C. Les protéines EDIL3 et MFGE8 ont précédemment été associées à des systèmes de vésicules impliquées dans la minéralisation au niveau osseux ou cartilagineux (Balcerzak *et al.* 2008, Rosenthal *et al.*

2011, Shapiro *et al.* 2015). Or, des structures sphériques (≈ 300 nm), ressemblant à des vésicules, ont été observées dans la matrice organique de coquilles d'œufs décalcifiées (Dennis *et al.* 1996, Fraser *et al.* 1998, Hincke *et al.* 2008). Nous avons donc réalisé une étude préliminaire de microscopie électronique qui nous a permis de repérer des vésicules contenant du calcium, du carbone et de l'oxygène, dans le fluide utérin. Au vu de ces données, nous avons donc posé l'hypothèse d'une implication de vésicules extracellulaires dans la formation de la coquille d'œuf de poule. Ces vésicules pourraient donc contenir l'ACC nécessaire à la formation des cristaux de calcite, afin de le délivrer sur le site de la minéralisation. Les protéines EDIL3 et MFGE8 seraient des acteurs majeurs de ce système, qui permettraient d'assurer la liaison entre le site de minéralisation et la vésicule extracellulaire *via* leurs domaines de liaisons au calcium et aux phospholipides. Les protéines annexines et anhydrases carboniques assureraient de leur côté, l'apport en ions calcium et bicarbonates nécessaires à la formation de l'ACC à l'intérieur de la vésicule (Wuthier et Lipscomb 2011). D'autres protéines, préalablement identifiées dans la coquille, pourraient également être impliquées dans ce transport vésiculaire. Parmi celles-ci, la protéine chaperonne HSPA8 et des facteurs de biogénèse des vésicules (PDCD6IP, EZR, Syntenin-1) pourraient être retrouvées. Enfin, 2 protéines du blanc (LYZ et OVAL), dont le rôle potentiel de stabilisateur d'ACC a précédemment été démontré, pourraient également être impliquées.

Conclusion

Dans cette étude, une analyse bioinformatique a permis de retracer l'histoire évolutive des protéines EDIL3/MFGE8 chez les eumétazoaires, et de montrer que celles-ci dérivent d'un évènement de duplication qui aurait eu lieu au sein des deutérostomiens. Les analyses d'expression des gènes *Edil3* et *Mfge8* de *Gallus gallus*, du niveau de leurs protéines encodées et de leur structure tridimensionnelle ont permis de proposer un nouveau modèle cohérent pour la minéralisation de la coquille des oiseaux. Dans ce modèle, les protéines EDIL3 et MFGE8 seraient impliquées dans un transport vésiculaire qui permettrait de délivrer l'ACC stabilisé sur le site de la minéralisation. Ce transport permettrait le transfert des ions Ca^{2+} et HCO_3^- dans le fluide utérin, afin d'éviter une éventuelle minéralisation non-spécifique dans ce milieu saturé.

JBC ARTICLE

The glycoproteins EDIL3 and MFGE8 regulate vesicle-mediated eggshell calcification in a new model for avian biomineralization

Received for publication, June 14, 2019, and in revised form, July 26, 2019 Published, Papers in Press, July 29, 2019, DOI 10.1074/jbc.RA119.009799

Lilian Stapane[‡], **Nathalie Le Roy**[‡], **Maxwell T. Hincke**[§], **and Joël Gautron**[‡1]

From the [‡]*BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France and the* [§]*Department of Innovation in Medical Education, Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Ottawa, Ottawa K1H 8M5, Canada*

Edited by Xiao-Fan Wang

The avian eggshell is a critical physical barrier, which permits extra-uterine development of the embryo. Its formation involves the fastest known biomineralization process in vertebrates. The eggshell consists of proteins and proteoglycans that interact with the mineral phase to impart its specific microstructure and mechanical properties. In this study, we investigated the role of epidermal growth factor (EGF)-like repeats and discoidin-like domains 3 (EDIL3) and milk fat globule–EGF factor 8 (MFGE8), two glycoproteins that are consistently detected in eggshell proteomes. We verified their common evolutionary history and identified the timing of the duplication event giving rise to these two distinct proteins. *Edil3*/*mfge8* chromosomal locations revealed a nested syntenous relationship with other genes (*hapln1*/*hapln3* and *vcan*/*acan*) that are also involved in vertebrate calcification. EDIL3 and MFGE8 proteins possess EGF-like and coagulation factor 5/8 (F5/8C) domains, and their 3D structures predicted that they bind calcium and extracellular vesicles. In chicken, we confirmed the presence of EDIL3 and MFGE8 proteins in eggshell, uterine fluid, and uterus. We observed that only *edil3* is overexpressed in tissues in which eggshell mineralization takes place and that this overexpression occurs only at the onset of shell calcification. We therefore propose a model in which EDIL3 and, to a lesser extent, MFGE8 proteins guide vesicles containing amorphous calcium carbonate to the mineralization site. This model was supported by the observation that extracellular vesicles accumulate in uterine fluid during eggshell calcification and that they contain high levels of calcium, carbon, and oxygen that correspond to calcium carbonate.

The avian eggshell is a physical barrier against mechanical and microbial stresses that allows extra-uterine development of the embryo in a closed chamber. The eggshell consists of 95% calcium carbonate ($CaCO_3$, calcite), 3.5% organic matrix (OM[2]; proteins, polysaccharides, and proteoglycans), and 1.5% water (1, 2). This biomineral is composed of five layers: inner and outer eggshell membranes, two contiguous calcified layers (mammillary knobs and palisades), and the cuticle (3). Shell formation is extracellular and is the fastest biomineralization process in vertebrates (4). Egg formation occurs in the hen reproductive tract (1, 5). In chickens, the forming egg reaches the red isthmus (RI) at 4.5 h post-ovulation (p.o.), where shell biomineralization is initiated on organic cores. The egg then enters the uterus (Ut), where it will remain for 18–19 h during shell calcification. Calcium carbonate is initially deposited as an amorphous phase (ACC), which progressively transforms into calcite (6).

During its formation, the shell is bathed in a uterine fluid (UF) secreted by uterine cells that contains the organic and mineral precursors necessary for shell calcification (7, 8). Matrix proteins stabilize ACC, promote crystal nucleation, select the calcite polymorph, and regulate the evolution of crystal size and morphology (4, 7, 9, 10). These matrix–mineral interactions determine the orientation of calcite crystals, which results in the complex ultrastructure of the eggshell, its texture, and consequently its mechanical properties. Over the last couple of decades, numerous studies have defined the chicken eggshell matrix proteome (11–18). Currently, the entire dataset of reported proteins contains around 900 nonredundant proteins for the chicken eggshell and more than 600 for the UF (19, 20). Among them, EDIL3 (EGF)-like repeats and discoidin-like domains 3) and MFGE8 (milk fat globule–EGF factor 8) are reported in the majority of transcriptomics and proteomics studies associated with chicken eggshell biomineralization (11, 13–18, 21, 22). These two proteins were also identified in other avian eggshell proteomes (quail, turkey, and guinea fowl) (23–25).

MFGE8 and EDIL3 are two secreted glycoproteins that have been well-described in mammals and exhibit sequence similarity to each other. In avian eggshell, it was suggested that both

This work was supported in part by Canadian Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) Discovery Program RGPIN-2016-04410 (to M. H.) and Université François Rabelais de Tours and the Région Centre Val de Loire (to L. S.). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

This article contains Fig. S1 and Tables S1–S4.

[1] To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-2-47-42-75-40; E-mail: joel.gautron@inra.fr.

[2] The abbreviations used are: OM, organic matrix; ACAN, aggrecan; ACC, amorphous calcium carbonate; ANX, annexin; B, tibial bone; DEL1, developmental endothelial locus-1; EDIL3, EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3; EGF-like, epidermal growth factor-like; EV, extracellular vesicle; F5/8C, coagulation factor 5/8 domain; HCO_3^-, bicarbonate ion; ITG, integrin; K, kidney; L, liver; Ma, magnum; MFGE8, milk fat globule-EGF factor 8; MYA, million years ago; p.o., post-ovulation; PS, phosphatidylserine; RI, red isthmus; SEM, soluble eggshell matrix; UF, uterine fluid; Ut, uterus; VCAN, versican; WI, white isthmus; TEM, transmission EM; ANOVA, analysis of variance; CAM, chorioallantoic membrane; EDS, energy dispersive X-ray spectroscopy; RNA-Seq, RNA sequencing; emPAI, exponentially modified protein abundance index.

© 2019 Stapane et al. Published under exclusive license by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019

EDIL3 and MFGE8 could bind Ca^{2+}, due to an EGF-like calcium-binding domain, and could favor crystal nucleation or change crystal morphology by selective interaction with calcium ion-rich crystallographic faces (19, 21).

Nevertheless, the function of EDIL3 and MFGE8 is poorly understood. In this study, we have used bioinformatics tools to decipher the common evolutionary history of *edil3* and *mfge8* genes. We also explored the role of EDIL3 and MFGE8 in chicken eggshell mineralization by predicting their molecular features, quantifying their gene expression, and measuring protein levels in tissues involved in eggshell formation. Our study suggests that EDIL3 and MFGE8 would bind to vesicles and calcium carbonate to guide vesicular transport providing mineral cargo during avian eggshell biomineralization.

Results

Evolutionary history of EDIL3 and MFGE8: synteny and phylogenetic analysis

EDIL3 and MFGE8 are two related proteins that share 54% identity and 69% similarity in *Gallus gallus* (EDIL3, XP_424906.3; MFGE8, NP_001264039.1; Table S1). They are encoded by two distinct genes, *edil3* and *mfge8*, which are localized on chromosome Z and chromosome 10, respectively. We compared their gene loci in different vertebrate classes (fishes, amphibians, reptiles, birds, and mammals; Fig. 1). *Edil3* and *mfge8* were observed to be nested in syntenous clusters containing *hapln1* (hyaluronan and proteoglycan link protein 1) and *vcan* (versican) adjacent to *edil3*, and *hapln3* (hyaluronan and proteoglycan link protein 3) and *acan* (aggrecan) adjacent *to mfge8* (Fig. 1). HAPLN1 and HAPLN3 belong to hyaluronan and proteoglycan link protein family, and VCAN and ACAN belong to the lectican family. In chicken, HAPLN1 is related to HAPLN3 with 48% identity/66% similarity for conservative substitutions, whereas VCAN and ACAN displayed 18% identity/27% similarity (Table S1). The direction of *mfge8* gene cluster transcription is unchanged from Chondrichthyes (*Callorhinchus milii*) to mammalia (*Homo sapiens*) (Fig. 1). This observation is also true for the *edil3* cluster during vertebrate evolution (Fig. 1). Therefore, the *edil3* and *mfge8* clusters are highly conserved in Gnathostoma. In birds, the *edil3* gene cluster is consistently observed on chromosome Z, and the *mfge8* cluster is found on a nonsexual chromosome (Table S2). These results confirm that the *edil3* and *mfge8* gene loci contain paralogous genes resulting from a duplication event.

To determine the timing of divergence between these two genes, we performed phylogenetic tree analysis of the protein sequences to investigate the evolutionary history of EDIL3 and MFGE8 in metazoans (Fig. 2). We first investigated the presence of the two proteins in eukaryotes. Blast analysis revealed that EDIL3 and/or MFGE8 were absent from protozoans to sponges. Consequently, the phylogenetic reconstruction was performed with EDIL3/MFGE8 protein sequences from eumetazoan species (Fig. 2). The NCBI database contains a large number of EDIL3/MFGE8 orthologs. To perform this analysis, we loaded 34 EDIL3/MFGE8 sequences from 19 different species representing different taxa. These sequences belong to nonvertebrates (one cnidarian, one platyhelminthe, two molluscs, one arthropod, one echinoderm, and one cephalochordate) and vertebrates (two fishes, one amphibian, three reptiles, three birds, and three mammals; Table S3). MFGE8 sequences were often annotated as lactadherin in various databases (Table S3). For consistency during our analysis, all lactadherin sequences were renamed MFGE8 (Fig. 2). Sequences were aligned using Clustal Omega multiple alignment. A phylogenetic tree was constructed using Maximum Likelihood and Bayesian inference methods, which both conducted to similar tree topology, and Maximum Likelihood result was displayed (Fig. 2). According to the topology of the tree, with coral *Acropora digitifera* EDIL3 protein as a rooted sequence, two distinct groups emerged within the phylogenetic tree. The first one contained nonvertebrate EDIL3/MFGE8 sequences, and the second one contained vertebrate EDIL3/MFGE8 sequences. The latter group had a cephalochordate MFGE8 sequence as a root and is then divided into two clusters: vertebrate EDIL3 and vertebrate MFGE8 sequences, respectively. Inside both clusters, we noticed that species were also grouped according to their class (actinopterygii, amphibian, reptiles, aves, and mammals).

In Fig. 2, the number of substitutions by site indicated that EDIL3 had undergone fewer changes during vertebrate evolution compared with MFGE8. Indeed, MFGE8 branches were longer than EDIL3 branches, and the EDIL3 cluster bootstrap value (node value, 98) was higher than the value for the MFGE8 cluster (node value, 56). This result indicated that vertebrate sequences of MFGE8 were more divergent from each other than within the EDIL3 sequences. In nonvertebrates, EDIL3 and MFGE8 sequences did not form two distinct clusters. Moreover, we did not consistently observe both EDIL3 and MFGE8 protein sequences; in several nonvertebrates species, only one sequence is present. These are mostly annotated as lactadherin-like (Table S3). The presence of both genes in the same nonvertebrate species, and their proximity in the tree, suggested that another duplication event affecting the ancestral *edil3/mfge8*-like gene appeared in the nonvertebrate lineages, as observed for the coral *A. digitifera*, the cephalochordate *Branchiostoma belcheri* and the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. We also observed during the course of vertebrate evolution a distinction between *edil3* and *mfge8* emerging around 480 million years ago (MYA), which led to further diversification/divergence of their sequences and gave rise to vertebrate *edil3* and *mfge8*. This event occurred after the split of nonvertebrate/vertebrate lineages and before the split between fishes/amphibian phyla. Therefore, the *edil3*/*mfge8* divergence appeared between 684 and 473 million years ago.

A comparison of protein domains was performed throughout eumetazoan evolution (Fig. 2). In nonvertebrates, only EDIL3 of the coral *A. digitifera* possesses EGF-like domains, although this domain was present in all EDIL3/MFGE8 vertebrate species. The most primitive vertebrate of the study (*C. milii*) possessed three EGF-like domains in MFGE8 but only two in its EDIL3. With the notable exception of fishes, all EDIL3 vertebrate sequences contain three EGF-like domains. Three EGF-like domains are also present in nonmammalian MFGE8 sequences, whereas two and one are present in nonprimate

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019

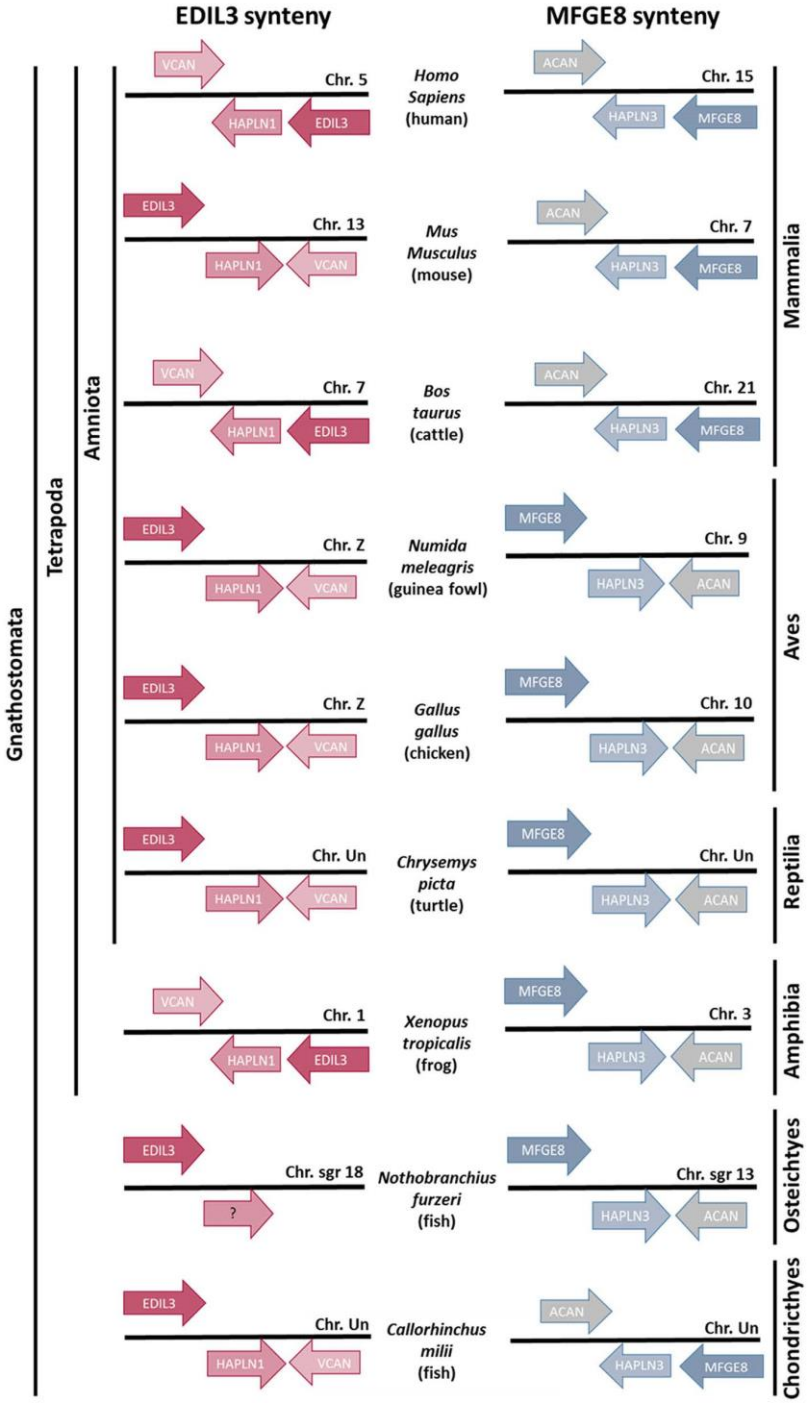


Figure 1. Chromosomal arrangements of *edil3* and *mfge8* gene clusters for several vertebrate classes. Gene organization was investigated on the NCBI genome explorer. *Arrows* indicate the direction of gene transcription.

mammals and primates, respectively. A Ca^{2+}-binding motif is also present in *A. digitifera* EDIL3 and in all other sequences except in fishes EDIL3, mammalian MFGE8, and nonvertebrates. An RGD motif (integrin (ITG)-binding) was also detected in EGF-like domains of all vertebrate MFGE8s and EDIL3s. In nonvertebrates, this motif is observed in F5/8C domains, when present. This latter domain was observed in all vertebrate and nonvertebrate sequences. A double RGD motif was also detected in three nonvertebrate sequences and in *G. gallus* EDIL3. However, the vertebrate RGD sequences are

ASBMB

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019

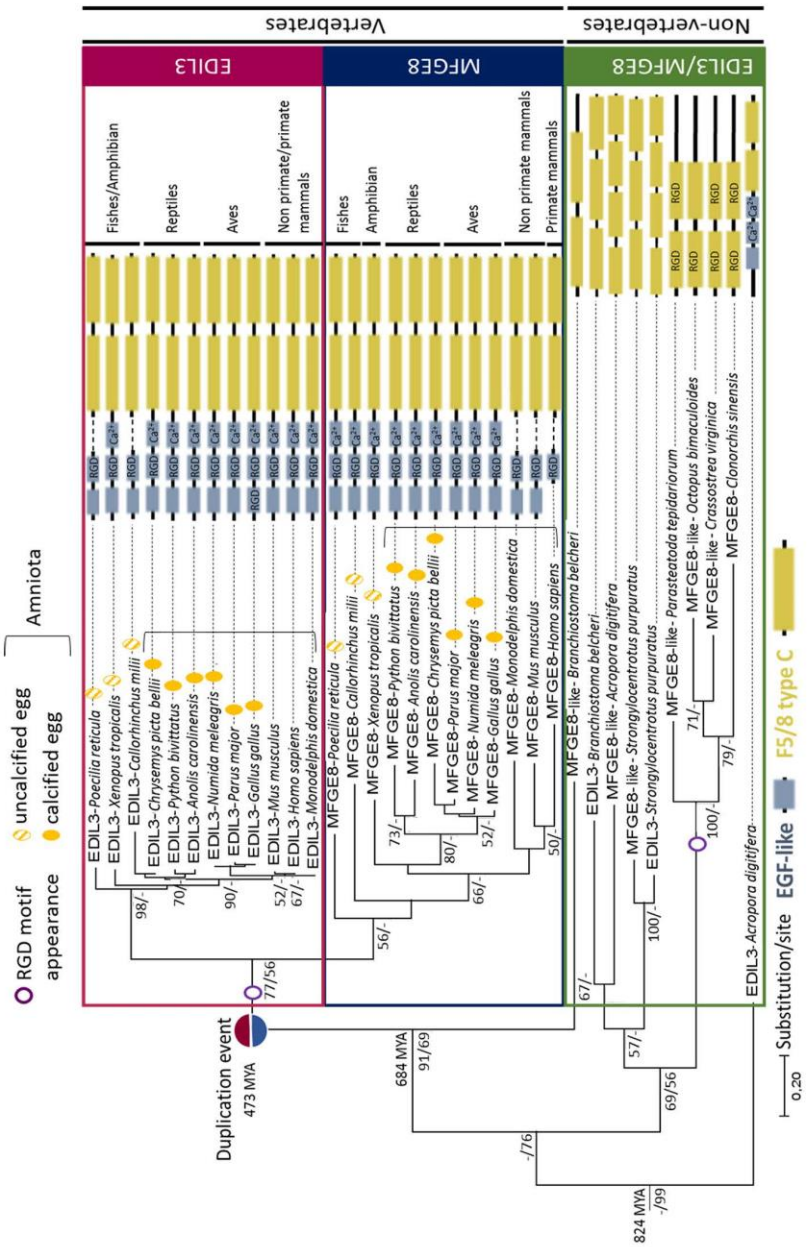


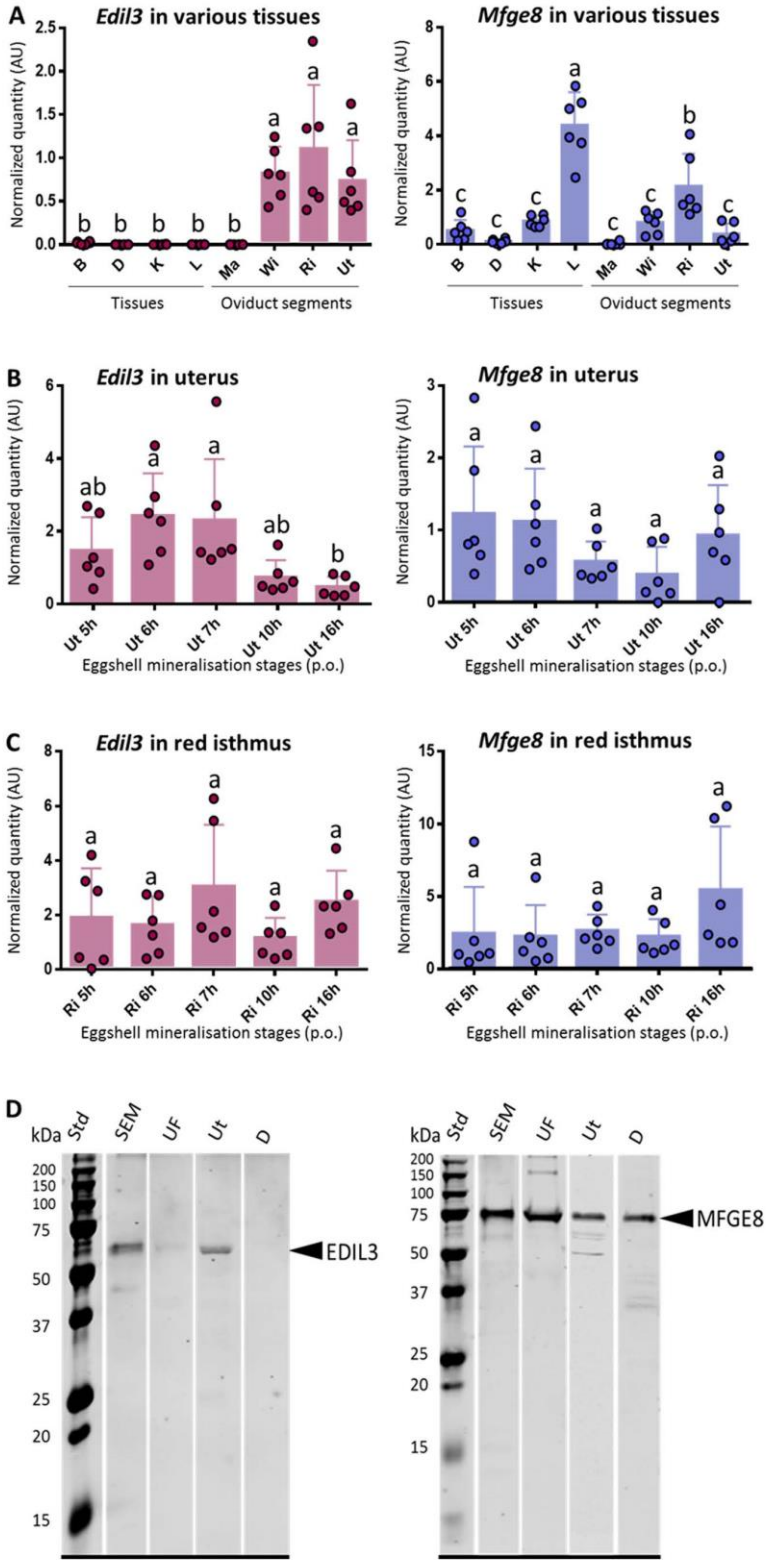
Figure 2. Phylogenetic tree reconstruction of EDIL3 and MFGE8 common evolutionary histories in Eumetazoa. Multiple alignment of protein sequences (LG substitution model) was performed using Clustal Omega, and the phylogenetic tree was reconstructed using Maximum Likelihood (in MEGA7) and Bayesian inference (in BEAST version 1.10.4) methods. The topology of the tree is that resulting from Maximum Likelihood. Node values correspond to the percentage of Maximum Likelihood bootstrap values/Bayesian posterior probabilities, respectively. Only values above 50 are indicated. The divergence times were analyzed on Timetree. The schematic representation of EDIL3 and MFGE8 protein domains were acquired with HomoloGene of NCBI and several databases (ExPASy-PROSITE, Ensembl, and SMART). RGD, integrin-binding site; Ca^{2+}, calcium-binding site. NCBI accession numbers for each protein are listed in Table S3.

found in the EGF-like domains, whereas the invertebrate RGDs are located within the F5/8C regions.

Edil3 and mfge8 expression in G. gallus tissues at various stages of shell mineralization

We investigated the level of expression of both genes in oviduct tissues involved in egg white and eggshell formation (Fig. 3*A*). These are the magnum (Ma), where egg white proteins are synthesized, and the white isthmus (WI), where the shell membranes are formed. In addition, the red isthmus (RI) and uterus (Ut) are involved in the onset and development of shell mineralization, respectively. Gene expression in these oviduct segments was compared with samples from mid-shaft tibial bone (B) (mineralized tissue), duodenum (D) (high calcium intake),

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019



Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019

kidney (K) (involved in ion exchange), and finally liver (L) as an important tissue of general metabolism. Levels of expression were measured in tissues harvested during the onset of the rapid growth phase of shell mineralization (10 h p.o., except for B collected at 18 h p.o. when shell mineralization and bone demineralization are completed).

Edil3 expression was low in D, L, Ma, B, and K and not significantly different from background levels (Fig. 3*A*). *Edil3* was significantly expressed in tissues involved in shell formation in contrast to the five other tissues. They were, however, not significantly different from each other. RI/B and Ut/B expression ratios were 58.6 and 39.2, respectively, and 846.9 and 566.9, respectively, for RI/K and Ut/K ratios. *Mfge8* was expressed in all tissues (Fig. 3*A*). Liver exhibited the highest level of *mfge8* expression followed by RI. *Mfge8* expression levels were significantly different in these two tissues, which were both significantly different from the six other tissues. Ratios of RI expression were 73, 18.3, 4.1, 2.5, and 2.6 with Ma, D, B, K, and WI, respectively.

Levels of *edil3* and *mfge8* expression in oviduct regions that are active during eggshell mineralization (Ut and RI) were measured at five key stages of shell calcification. *Edil3* was expressed at all stages in Ut and RI and was significantly higher in Ut for stages 6 h and 7 h p.o. compared with 16 h p.o. (Fig. 3, *B* and *C*), when ACC is massively deposited with the first aggregates of calcite forming around mammillary knobs. *Edil3* expression compared with 16-h p.o. exhibited a fold change of 5.6 and 4.9 at 6 h and 7 h p.o., respectively. In contrast, from 5 h to 16 h p.o., no significant difference was observed for *edil3* in RI and for *mfge8* in Ut and RI (Fig. 3, *B* and *C*).

EDIL3 and MFGE8 protein levels during eggshell formation

The presence of EDIL3 and MFGE8 proteins was investigated in soluble eggshell matrix (SEM), UF, Ut, and D (which is involved in ion transfer without mineralization). Using anti-EDIL3 antibodies, a single immunoband was observed around 60 kDa (expected size 54 kDa) in SEM, Ut, and to a lesser extent in UF (Fig. 3*D*). No immunoreactive band was observed in D. MFGE8 exhibited an intense immunoreactive band in all tissue samples, including D (Fig. 3*D*) at 75 kDa (expected 53 kDa). The higher than predicted molecular mass observed for MFGE8 could be due to post-translational modification such as glycosylation, which has been reported for this protein (26, 27). These results are in accordance with expression measurements, and they confirmed that EDIL3 is specific to the oviduct tissue involved in shell mineralization, whereas MFGE8 is present in a variety of tissues or organs, including those responsible for eggshell calcification (Fig. 3).

Characterization of G. gallus EDIL3 and MFGE8 functional domains

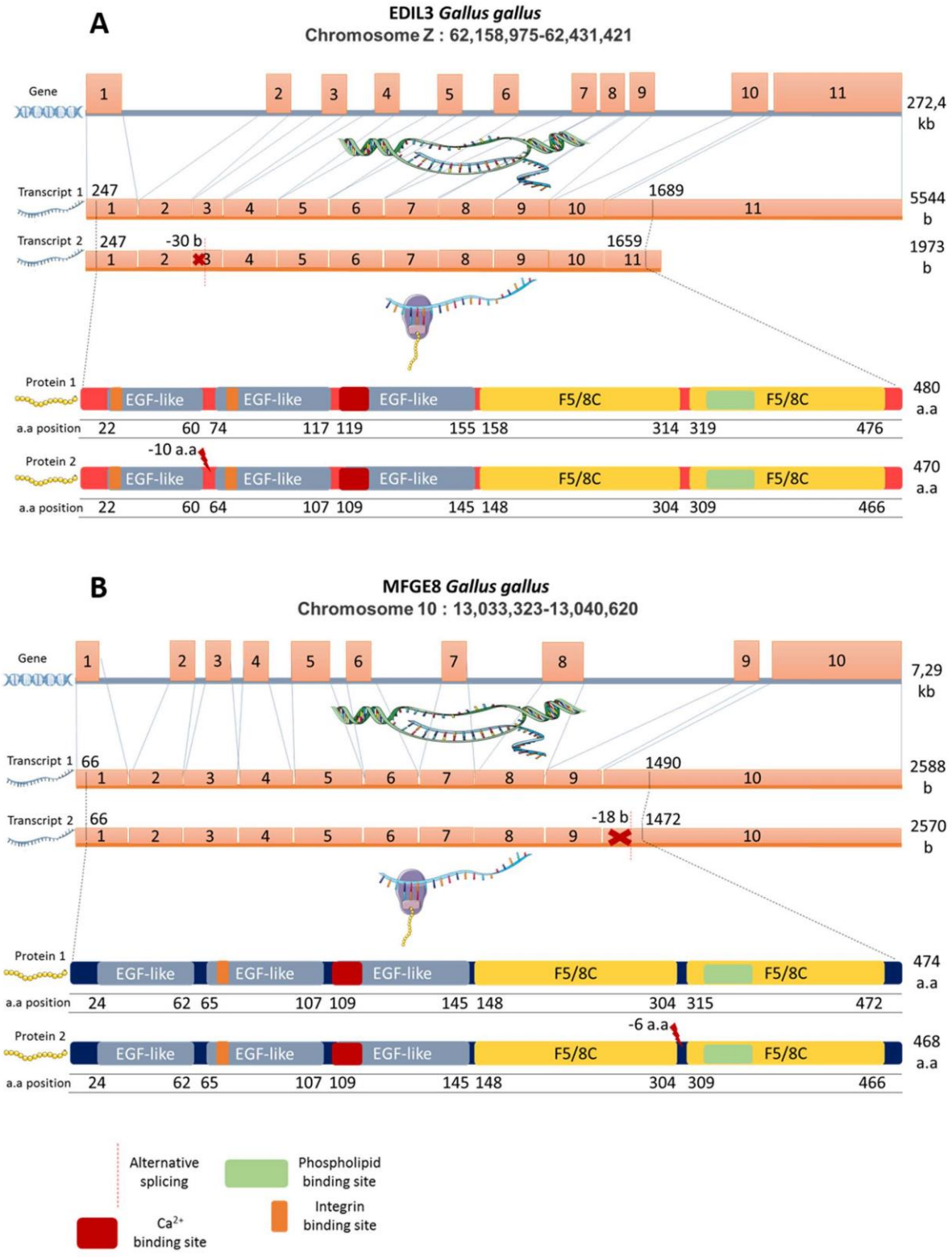
We explored gene and protein sequences of EDIL3 and MFGE8 using bioinformatics tools. *G. gallus edil3* is made of 11 exons and is located on sex chromosome Z (Fig. 4). Its transcription leads to two different transcripts of 5544 and 1973 nucleotides coding for 480 and 470 amino acid proteins, respectively (NCBI). Differences in transcript size are the consequence of a 30-nucleotide deletion in exon 3 and alternative splicing of exon 11. This latter alternative splicing does not affect the translated protein because it modifies the 3′-UTR region in the mRNA. Stop codons are located at positions 1657–1659 and 1687–1689 in the short and long mRNA variants, respectively. The 30-nucleotide in-frame deletion of exon 3 resulted in a loss of 10 amino acids between two EGF-like domains. The *G. gallus mfge8* gene is located on chromosome 10 and is made of 10 exons (Fig. 4). As is the case for *edil3*, *mfge8* also exhibited two transcripts of 2588 and 2570 bases, which encode proteins of 474 and 468 amino acids, respectively (NCBI). The shorter transcript is the result of an 18-nucleotide deletion at the onset of the last exon, which induces a loss of six amino acids between two F5/8C domains of the corresponding protein. The remaining sequence is not affected by this deletion.

EDIL3 and MFGE8 *G. gallus* proteins were aligned with MEGA7 software, and protein domains were investigated using PROSITE (Fig. 5, *protein 1* in Fig. 4). Residues 22–60 and 24–62 correspond to EDIL3 and MFGE8 EGF-like 1 domains, respectively. Other EGF-like domains were located at positions 74–117, 65–107 and 119–155, 109–145 for domains 2 and 3 of EDIL3 and MFGE8, respectively. EDIL3 EGF-like 1 and 2 domains possess an ITG-binding site (RGD motif in positions 22–24 and 96–98), whereas this motif was only present in the EGF-like 2 domain for MFGE8 (position 86–88). Both proteins also possess a Ca^{2+}-binding motif in the EGF-like 3 domain. This motif was composed of about 40 residues with six cysteine residues that form three disulfide bonds with the following consensus pattern: *nXnn*C-*X*(3,14)-C-*X*(3,7)-C*XX*-b*XXXXA*XC-*X*(1,6)-C-*X*(8,13)-C*X*. This Ca^{2+}-binding motif was found in positions 119–143 and 109–133 for EDIL3 and MFGE8, respectively. Alignments of *G. gallus* EDIL3 and MFGE8 EGF-like 3 domains with *H. sapiens* coagulation factors IX/X EGF-like domains are represented on Fig. S1*A*. The Ca^{2+} consensus sequence of human coagulation factors IX/X are depicted in Fig. 5. The Ca^{2+}-binding motifs of EGF-like 3 domains translated from the longer transcripts of *G. gallus* EDIL3 (Asn-119, Asn-121, Asp-136, and Tyr-141) and MFGE8

Figure 3. *A–C*, gene expression of *edil3* and *mfge8* in oviduct regions and four tissues of *G. gallus* at key events of eggshell biomineralization. Each tissue and stage were determined on six different laying hens ($n = 6$). *A*, *Edil3* and *mfge8* expression in oviduct regions and four tissues of *G. gallus*. All tissues were harvested at 10 h post-ovulation from 40-week-old hens, except for tibial bone (*B*), which is from 18-h post-ovulation in 90-week-old hens. *B*, *Edil3* and *mfge8* expression in uterus at five key stages of eggshell biomineralization (5–7, 10, and 16 h post-ovulation). *C*, *Edil3* and *mfge8* expression in red isthmus at five key stages of eggshell biomineralization (5–7, 10, and 16 h post-ovulation). Relative expression levels of genes were normalized with eight housekeeping genes (see under "Experimental procedures"). *Error bars* indicate standard deviations. *Different letters* indicate significant differences in levels of expression (p value <0.05), based on one-way ANOVA and pairwise Tukey test. *D*, Western blot analysis of EDIL3 and MFGE8 levels in SEM, UF, Ut, and D. For each sample, 15 μg of protein was subjected to electrophoretic separation and electro-transfer. The membranes were probed with anti-EDIL3 (*left*) or anti-MFGE8 (*right*) antibodies. AlexaFluor® 680-labeled secondary antibody was used for the detection. *Std,*: molecular mass standard.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019

EDIL3/MFGE8 in avian shell calcification



ASBMB

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019

(Asn-109, Asn-111, Asp-126, and Tyr-131) were highly conserved when compared with the EGF-like Ca^{2+}-binding consensus sequences of the human protein (Asp-1, Asp-3, Asp-18, and Tyr-23; Fig. 5 and Fig. S1*A*). However both Asps of the human coagulation factors IX/X Ca^{2+}-binding motif were replaced by Asn (residue with a similar polar property to Asp) in each *G. gallus* protein. Cysteines were strictly conserved between both proteins at the Ca^{2+}-binding site.

We also observed two F5/8C domains in both EDIL3 and MFGE8 C-terminal regions (positions 158–314, 319–476 and 148–304, 315–472, respectively, Fig. 5). Finally, phosphatidylserine-binding (PS-binding) motifs have been reported in the mammalian sequences, and we investigated the presence of this motif in both EDIL3 and MFGE8 from *G. gallus*. The following residues (Lys-24, Trp-26, Phe-31, Lys-45, Gln-76, Arg-79, Phe-81, and Arg-146) were described in *Mus musculus* protein as involved in PS binding (28). The same residues were observed in positions 338, 340, 345, 359, 390, 393, 395, and 453 of the F5/8C two domains of *G. gallus* MFGE8, whereas EDIL3 showed identical and similar residues (R-FKQKFR) in positions 342, 349, 363, 394, 397, 399, and 466 (Fig. 5 and Fig. S1*B*). Trp is not present in the EDIL3 sequence, and conservative substitutions (Lys/Arg and Arg/Lys) are observed in positions 342 and 397, respectively. However, an absence of Trp at this position did not affect the function of the PS-binding site (28); consequently, these data suggest potential functional PS-binding activity for both *G. gallus* EDIL3 and MFGE8 proteins.

We performed computational predictions of secondary structure for chicken EDIL3 and MFGE8 using PSIPRED version 3.3 and the I-TASSER program server. Twenty two β-sheets and two α-helices were predicted for EDIL3, and 25 β-sheets and two α-helices were predicted for MFGE8 proteins, with good correspondence between the 22 β-sheets of EDIL3 and those in MFGE8. We also observed that EGF-like domains are made up of two β-sheets in each protein. The first F5/8C contains 11 β-sheets in MFGE8 and nine in EDIL3, whereas the second is similar in both proteins with seven β-sheets.

The 3D structures of EDIL3 and MFGE8 were also predicted with the I-TASSER program server (molecular homology modeling), and the spatial arrangement of amino acids involved in each binding function (ITG, Ca^{2+}, and PS) was highlighted on the 3D structure models using PyMOL Molecular Graphics system (Fig. 6, *A* and *C*). A close spatial proximity among residues was observed in accordance with their ability to interact with their substrates, and consequently, we predicted that these domains are functional. The conformation of the Ca^{2+}-binding domain was composed, as expected, of three disulfide bridges necessary to maintain the protein conformation for interaction with Ca^{2+} (Fig. 6, *A* and *C*). The spatial arrangement of residues in the second F5/8C domains associated with the PS-binding motif in *G. gallus* is highlighted (Fig. 6, *A* and *C*). This motif involves seven and eight amino acids for EDIL3 and MFGE8, respectively. Residues are located in three different loops as observed for the mammalian sequences (Fig. 6, *A* and *C*, *green balls*). Only Gln-390 was observed in a β-sheet in the MFGE8 F5/8C 2 domain. Both EDIL3 and MFGE8 RGD motifs involved in ITG binding of the second EGF-like domains were localized to a loop between two β-sheets (Fig. 6, *orange balls*). Structural modeling also indicates that the major difference between EDIL3 and MFGE8 is associated with the first EGF-like domain (Fig. 6), for which an additional specific RGD motif was observed in EDIL3. This additional RGD motif is not located in a loop between β-sheets.

Discussion

EDIL3 and MFGE8 are two proteins widely detected in proteomic studies associated with chicken eggshell biomineralization (11, 13–18, 21). In chicken these two proteins exhibited a high abundance in partially mineralized eggshell at the initiation of biomineralization, and consequently, they are thought to be potential major actors in the calcification process (21).

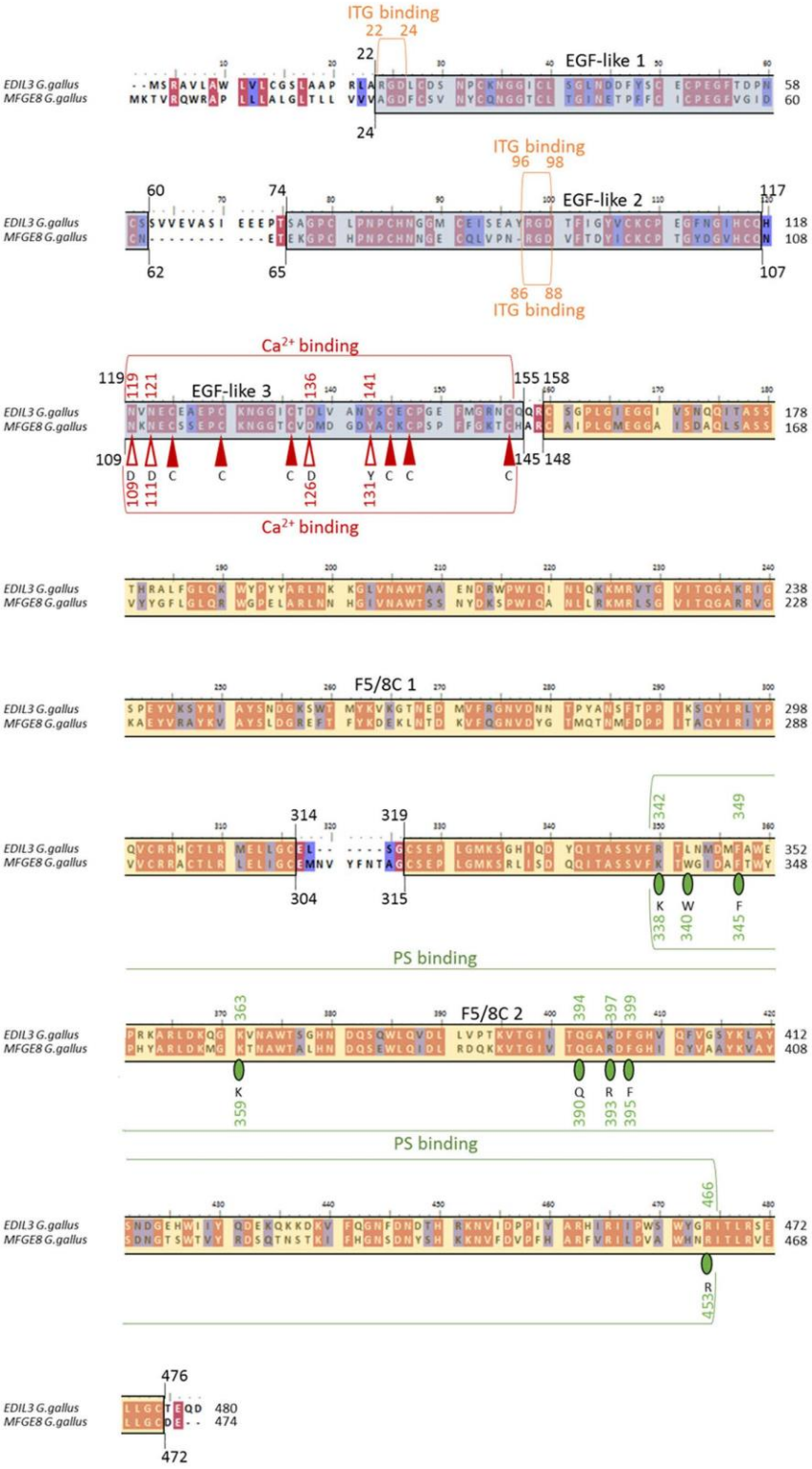
MFGE8 and EDIL3 are homologously-secreted glycoproteins that have been well-described in mammals. The *mfge8* transcript was first identified in mouse mammary epithelial cells (29). MFGE8 is known to participate in a wide variety of cellular interactions such as macrophage and apoptotic cell bridging, adhesion between sperm and the zona pellucida of the egg, or exosome function (30–34). EDIL3 was first identified in mouse as an extracellular matrix protein involved in embryonic vascular development and demonstrating an angiogenic role (35–37). In mammals, EDIL3 is physiologically expressed in various tissues such as brain, intestine, heart, and kidney (38). EDIL3 was also detected during cancer development and is expressed by primary tumors from breast and colon cancers (39). In breast cancer, EDIL3 was identified on extracellular vesicles (EV) promoting cellular invasion and was suggested to be a potential biomarker for monitoring this metastatic cancer (40). In developing chicken embryos, experiments have been performed on chorioallantoic membrane (CAM) using mammalian EDIL3 (DEL1). DEL1 was found to be involved in embryonic vascular remodeling, in mediating the breakdown of existing vascular blood, and inducing restructuring of the CAM vasculature (35). In contrast, a potent pro-angiogenic activity was reported for DEL1 in chicken CAM, which was mediated by integrin ($\alpha v\beta 3$) activation via the RGD motif (36).

Our phylogenetic analysis demonstrated that vertebrate *edil3* and *mfge8* are derived from a duplication event of an ancestral common gene. The divergence point between these two paralogs was estimated to be about 480 MYA. Gene duplication processes are crucial to generate genes with novel or altered functions (41). The duplication events giving rise to *edil3* and *mfge8* in early vertebrates emerged prior to the appearance of the amniotic egg at the split between amphibians (uncalcified egg) and reptiles (calcified egg, amniota) that

Figure 4. Gene, mRNA variants, and protein isoforms for *G. gallus* EDIL3 (*A*) and MFGE8 (*B*). The domain positions and sequence lengths were determined using the NCBI database. *Edil3* Gene ID, 427326; transcript 1, XM_424906.6; transcript 2, XM_004949448.3; protein isoform 1, XP_424906.3; protein isoform 2, XP_004949505.1. *Mfge8* Gene ID, 415494; transcript 1, NM_001277110.1; transcript 2, NM_001277111.1; protein isoform 1, NP_001264039.1; protein isoform 2, NP_001264040.1. Elements were from Servier Medical Art (https://smart.servier.com/),[3] licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019

EDIL3/MFGE8 in avian shell calcification



Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019

occurred around 350 MYA (42, 43). According to our study, the function of EDIL3 and MFGE8 was recruited to diverse biological processes, including eggshell calcification.

In nonprimate mammals, two homologous domains of epidermal growth factor from *Drosophila* NOTCH (EGF-like) at the N terminus and one tandem of discoidin-like domains similar to those of coagulation factors V and VIII (F5/8C) at the C terminus were described in MFGE8 (29, 44). Our evolutionary study confirmed the presence of these domains in mammals and also explored additional eumetazoan sequences used in this study. The F5/8C domains appear to be present in all species sequences indicating an origin of this domain in the common ancestor of eumetazoans. The number of F5/8C domains is variable in nonvertebrates (from two to four), whereas it is constant in vertebrates, in which two F5/8C were reported. The PS-binding site of MFGE8 orthologs was previously described in cow (*Bos taurus*) and mouse (*M. musculus*) (28, 45–48). The following residues (Lys-24, Trp-26, Phe-31, Lys-45, Gln-76, Arg-79, Phe-81, and Arg-146) are major residues contributing to the interaction between the F5/8C 2 domain of MFGE8 and PS in the mouse (28). Several studies reported the mechanism of mammalian MFGE8 F5/8C binding to PS (47, 49). PS binding allows MFGE8 to complex with vesicles or cell membranes through their second F5/8C domain to perform physiological functions such as cellular interactions and exosome transport (30, 31, 33). Thus, mammalian MFGE8 binds to PS-containing vesicles in a two-step mechanism that explains the strong enrichment of MFGE8 in exosomes from dendritic cells (30, 47). We identified this motif in the *G. gallus* EDIL3/MFGE8 sequences suggesting that chicken EDIL3 and MFGE8 proteins can also bind to membrane phospholipids.

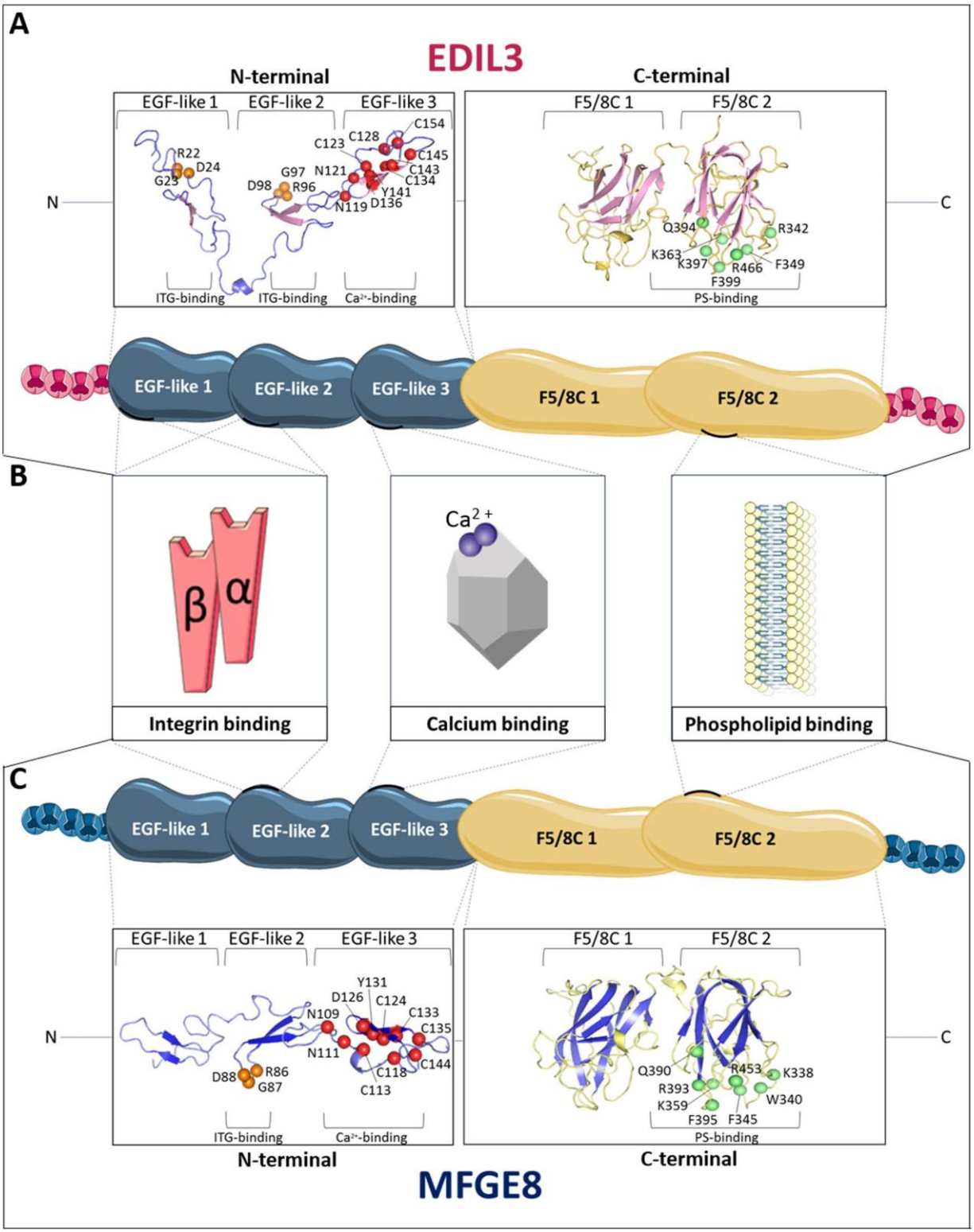
EGF-like domains are present in all vertebrates but absent in nonvertebrates with the notable exception of EDIL3 of the Cnidaria *A. digitifera,* which is the most primitive eumetazoan species used in this study. In vertebrates, three EGF-like domains were present, except for EDIL3 in fishes (two domains) and MFGE8 in mammals (one and two domains in primate and nonprimates, respectively). This result confirms previous findings on mammalian MFGE8 (27, 50). The highest-conserved EGF-like domain in vertebrate species includes an RGD motif (arginine, glycine, and aspartic acid) in both MFGE8 and EDIL3 proteins. This motif displays a strong affinity for $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ ITGs, which are expressed at the cell surface and widely present in vertebrates, underlying its major role in cellular interactions (30, 31, 33, 34). It is present in the second and third EGF-like domains in vertebrates. In nonvertebrates, the RGD site is found in the F5/8C domain of protostomian species (arthropods, molluscs, and trematodes) and is completely absent in others (Fig. 5). These results suggest the independent acquisition of the RGD motif in protostomians and in vertebrates. We also predict a Ca^{2+}-binding motif in the third EGF-like domain of EDIL3 and MFGE8 in the majority of the vertebrate sequences analyzed. However, this motif was not observed in mammalian MFGE8 or in EDIL3 of fishes selected for this study. The Ca^{2+}-binding motif was therefore lost in MFGE8 at the split of oviparous/viviparous vertebrates. Interestingly, MFGE8 was reported as the major component of the milk fat globule membrane, which is a calcium-rich milieu (51). In nonvertebrate species, Ca^{2+}-binding sites were only found in the EDIL3 sequence of the staghorn coral (*A. digitifera*), which precipitates a calcium carbonate exoskeleton. However, we did not identify Ca^{2+}-binding motifs in protein sequences of the purple sea urchin (*S. purpuratus*) or the eastern oyster (*Crassostrea virginica*), which also mineralize a $CaCO_3$ skeleton. The cephalochordate *B. belcheri*, which is a "fish-like" species without a calcareous skeleton, did not exhibit this motif.

The question of the role(s) of these two proteins in avian eggshell formation is the main focus of this study. EDIL3 and MFGE8 were initially proposed to be important molecular actors in chicken eggshell mineralization (21). They were quantified at the four key steps of shell mineralization and classified according to their abundance (21). Among the 216 eggshell proteins quantified in this study, EDIL3 abundance was among the top 10 proteins at the two stages corresponding to the transformation of ACC into calcite crystals. The abundance of MFGE8 was intermediate in the shell, whatever the stage of shell mineralization (21). A comparative study revealed that MFGE8 is overabundant in the proteome of strong eggshells compared with weaker shells (15). In addition to their detection in numerous investigations of the chicken eggshell proteome, both proteins were identified in other avian eggshell proteomes (quail, turkey, and guinea fowl) (23–25). The experiments performed in this study support our hypothesis that EDIL3 plays a key role during eggshell formation. *Edil3* was overexpressed in the oviduct regions where eggshell formation takes place (WI, RI, and Ut), and EDIL3 protein was present in SEM, UF, and Ut. We also compared *edil3* expression levels with those of other uterine genes during eggshell calcification. We have previously observed by RNA-Seq that the *edil3* counting per million (CPM) value was about three times higher than the median CPM value of genes coding for eggshell matrix proteins (52, 53). The median emPAI of proteins quantified in the shell proteome is 5.92, whereas the maximum emPAI was obtained for lysozyme with a value of 13537. The second most abundant protein was Ovocleidin-116 (OC-116, MEPE) with an emPAI value of 7168. EDIL3 exhibited a value of 3523 and was the sixth most abundant eggshell protein. MFGE8 was the 34th most abundant protein with an emPAI value of 37.5. The role of MFGE8 in chicken eggshell biomineralization is not so clear. Indeed, *mfge8* was significantly overexpressed in RI where shell mineralization is initiated, but its expression is not specific to the oviduct segment where shell mineralization occurs; moreover, it is ubiquitous in all tested tissues, with the highest levels in liver. Nevertheless, its levels in uterus determined by RNA-

Figure 5. Domain prediction for *G. gallus* EDIL3 and MFGE8 protein sequences. GenBank™ accession numbers used are EDIL3 XP424906.3 and MFGE8 NP_001264039.1. Alignment was performed using Clustal Omega method in MEGA7 and then annotated with BioEdit. *Red*- and *blue*-colored residues indicate identity and similarity, respectively. *Blue* and *yellow backgrounds* correspond to EGF-like and F5/8C domains, respectively. *Red vertical arrows* (filled for cysteines) and *green circles* correspond to amino acid residues involved in Ca^{2+} binding and PS binding, respectively. The *letters below arrows* and *circles* indicate the consensus pattern for Ca^{2+}-binding and PS-binding residues of human coagulation factors IX/X and mouse MFGE8, respectively. Indicated positions correspond to the residue numbering for the full-length sequences of *G. gallus* EDIL3 and MFGE8.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019

EDIL3/MFGE8 in avian shell calcification



Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019

Seq were about two times higher than the median CPM value for genes encoding matrix proteins (52, 53).

In mammals, MFGE8 was reported to be involved in spermatozoid-egg zona pellucida-binding (54). In bird eggs, the vitelline membranes that surround the yolk contain zona pellucida proteins that originate from the liver (55). Therefore, MFGE8 could play a role in spermatozoid adhesion. Western blotting confirmed the presence of MFGE8 protein in shell, uterine fluid, and uterus but also in duodenum. In birds, the duodenum is not involved in shell calcification but plays a key role in the uptake of dietary calcium to provide the ions necessary for bone and eggshell formation (56).

Our exploration of *edil3* and *mfge8* chromosomal arrangements throughout vertebrate evolution highlighted a strongly conserved synteny for both genes (Fig. 1). In avian species, we observed that *edil3* and *mfge8* are localized on chromosome Z and on a nonsexual chromosome, respectively. Interestingly, quantitative trait loci affecting chicken eggshell strength are present on the Z chromosome (57, 58). Moreover, we observed that the adjacent genes at the *edil3* and *mfge8* loci are *hapln1/vcan* and *hapln3/acan*, respectively. HAPLN3 is one of the most abundant proteins in the chicken eggshell, and HAPLN1 was identified in the eggshell membranes of fertilized eggs (21, 59). Proteoglycans play an important role in eggshell biomineralization; for example, the dermatan sulfate proteoglycan ovocleidin-116 (MEPE) is abundant in eggshells (21, 60–63). Proteoglycan macromolecules combine a protein core with a negatively charged complex polysaccharide and strongly interact with calcium (64). In mammals, HAPLN1, ACAN, and VCAN are cartilage matrix proteins, and they participate in multimolecular aggregates (65–67).

Numerous studies on mammals revealed the participation of vesicles in bone and cartilage mineralization (68–73). A noncrystalline calcium phosphate phase was shown within intracellular vesicles of bone-lining cells (74). Membrane-bound mineral particles have been identified in osteoblasts (75), and numerous vesicles containing calcium phosphate are also present in the circulatory system or in the extracellular space adjacent to osteoblasts during embryonic chicken long-bone development (76). Additionally, MFGE8 is an abundant protein in mineralizing vesicles from chicken embryonic femurs and was also present with EDIL3 in mammalian cartilage vesicles (77–79). Furthermore, HAPLN1, ACAN, and VCAN were also identified in these vesicles (77, 78, 80). Recently, an RNA-Seq study reported that several vesicular genes are highly expressed in hen uterus (52). For example, *pdcd6ip* and *sdcbp* encode proteins (PDCD6IP and Syntenin-1) found in matrix vesicles isolated from bone or cartilage (79). In addition, EM studies of hen utero-vaginal junction detected a large number of vesicles released into the lumen (81). Spherical voids can be visualized by scanning EM in the calcified eggshell (82, 83), which we hypothesize are the remnants of mineralization-associated matrix vesicles. Spherical structures (≈300 nm) are observed within the organic matrix of decalcified eggshell (82); they are observed throughout the entire palisade layer and upper mammillary knobs, and they are immunoreactive for the eggshell proteoglycan ovocleidin-116 (84–87).

We hypothesize that extracellular vesicles are involved in eggshell formation. Chicken eggshell biomineralization requires ACC to supply ions for rapid mineralization (88, 89). Indeed, ACC was reported as an important highly-reactive translational phase for the formation of sea urchin spines or molluscan shells (89–91). In chicken eggshell, ACC is first massively deposited on the entire surface of the shell membranes, and then it accumulates at specific nucleation sites to supply ions to form calcite (6). ACC is highly unstable under physiological conditions, and consequently, the vesicles observed in eggshell could stabilize and transport ACC during mineralization. *In vitro* studies have shown that liposome vesicles can stabilize ACC and prevent its premature crystallization (92). Indeed, uterine fluid is a supersaturated solution (93); therefore, transport of ACC via vesicles through the uterine fluid would avoid ectopic calcification, as proposed for bone mineralization by calcium phosphate (75). We also reported in this study that *G. gallus* EDIL3 and MFGE8 have Ca^{2+}-binding and PS-binding sites. PS binding would allow their attachment to vesicle membranes, and the Ca^{2+}-binding domain could interact with the mineral phase. We therefore propose a model in which EDIL3 and MFGE8 would guide vesicles containing ACC cargo to the site of mineralization (Fig. 7). This hypothesis is supported by the description in dendritic cell exosomes of MFGE8 targeting effector cells ITG as a guiding protein (30). The presence of vesicles in $CaCO_3$ mineralization has been described in sea urchin embryos (94). In this study, EDIL3 and MFGE8 were observed in Ut and UF and would be present in vesicles originating from uterine epithelial cells, transiting through the UF and targeting Ca^{2+} to the mineralization site to deliver the mineral precursor (Fig. 7). We used transmission electronic microscopy (TEM) to analyze uterine fluid, and we confirmed the presence of EV in the 100–300-nm size range in this milieu (Fig. 8). We also performed energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) on vesicles to detect elements present in vesicles (Fig. 9). Several mapping measurements were obtained across a vesicle (Fig. 9*B*) or mapped point by point at different sites where vesicles were present or absent (Fig. 9*C*). The spectra showed that calcium, carbon, and oxygen were present in vesicles in agreement with calcium carbonate. However, phosphorus and chlorine, representing alternative counterions for calcium (phosphate and chloride), were not detected at these levels. This result is robust evidence for calcium carbonate inside UF vesicles and highlights their contribution to the transport of calcium necessary for calcification.

Figure 6. *In silico* prediction and structure modeling of EDIL3 and MFGE8 protein domains and binding sites. *A*, tertiary structure prediction of EGF-like and F5/8C regions of *G. gallus* EDIL3 (XP_424906.3). *B*, schematic representation of *G. gallus* EDIL3 and MFGE8 protein domains, including their binding sites. *C*, tertiary structure prediction of EGF-like and F5/8C regions of *G. gallus* MFGE8 (NP_001264039.1). The tertiary structure prediction models were generated by EGF-like and F5/8C domain regions splitting using the I-TASSER template-based modeling. Following prediction modeling, the generated tertiary structures were edited using PyMOL. *Orange balls* indicate RGD residues of the ITG-binding sites; *red balls* illustrate residues of the Ca^{2+}-binding sites, and *green balls* display PS-binding sites. The position of the residues is indicated according to their location in the entire protein. Elements were from Servier Medical Art, licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019

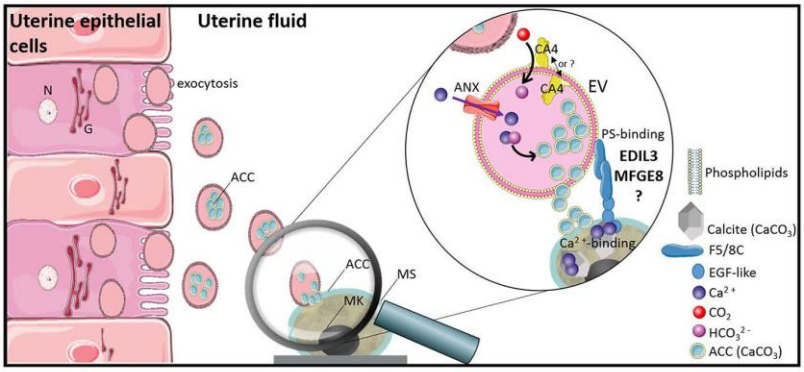


Figure 7. Schematic representation of proposed vesicular transport during eggshell mineralisation. EVs originate from the plasma membrane of the uterine epithelial cells and accumulate in the UF. ANX and CA4 provide Ca^{2+} and HCO_3^- ions, respectively, for the accumulation of ACC inside the EV. This mechanism implies ACC stabilization by additional proteins. EDIL3 and MFGE8 are present at the EV surface due to their PS-binding motif. EVs target the mineralization site (*MS*) through Ca^{2+} binding of EDIL3/MFGE8 and deliver the ACC required for mineral formation. *MK*, mammillary knobs; *N*, nucleus; *G*, Golgi. Elements were from Servier Medical Art, licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

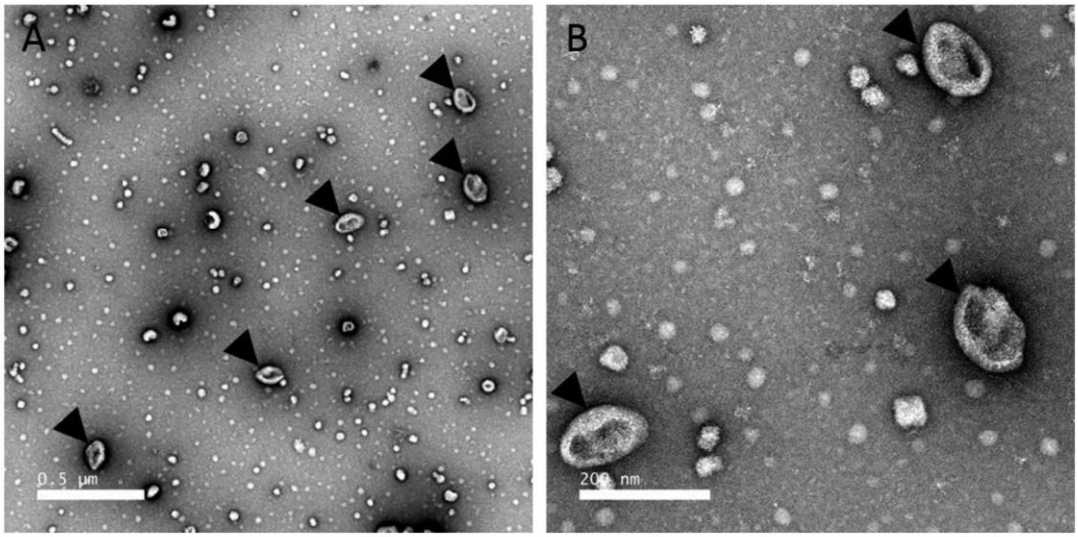


Figure 8. Transmission EM of EV fractions purified from uterine fluid harvested at 7 h post-ovulation. *A*, low magnification view. *B*, higher magnification TEM micrograph of the EVs. EVs were negatively stained with 2% uranyl acetate (see "Experimental procedures"). *Black arrowheads* indicate extracellular EVs. *Scale bars*, *A*, 0.5 µm; *B*, 200 nm.

Moreover, we confirmed that both proteins are incorporated into the shell matrix during mineralization. Additionally, our results highlighted *edil3* and *mfge8* expression throughout eggshell formation and notably at the early stages for *edil3* when ACC deposition is massive (6). This scenario would take place during the entire process of shell formation, as ACC is required at the mineralization front (6).

We surveyed previous chicken eggshell and uterine fluid proteomic studies (11, 15, 19, 21) to identify additional proteins potentially involved in our proposed vesicular transport model (Table 1). Annexins (ANX) should be involved in vesicular transport as shown *in vitro* for cartilage or bone (95–97). Indeed, ANXs can act as a Ca^{2+} channel in vesicle membranes (Fig. 7) (98–100). ANXA1, ANXA2, ANXA5, and ANXA8 are detected in the chicken eggshell, and their encoding genes are highly expressed in uterine cells (11, 15, 21, 52). ANXA2 is also identified in other bird eggshell proteomes such as duck, quail, turkey, and guinea fowl, suggesting a common role in shell biomineralization (25, 101). Eggshell $CaCO_3$ requires bicarbonate ions in addition to calcium to form ACC. This role of the HCO_3^- supplier inside the vesicles could be ensured by carbonic anhydrases (CAs), which transform soluble CO_2 into bicarbonate ions (Fig. 7). Indeed, the UF has a high partial pressure of CO_2 (100 mm Hg), which is elevated 2-fold compared with plasma (93, 102). Among the members of the carbonic anhydrase family, CA4 is present in the eggshell proteome of chicken, duck, quail, turkey, and guinea fowl (25, 101). CA4 is a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein that is attached to plasma membrane, and consequently, we predict that it is present in the extracellular vesicles. Ovocleidin-17 (OC-17), ovalbumin (OVAL), and lysozyme (LYZ) are three chicken eggshell proteins described as ACC stabilizers (103–105). Finally, we used the Vesiclepedia database (106) to explore vesicular markers among chicken shell proteins already identified (Table 1).

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019

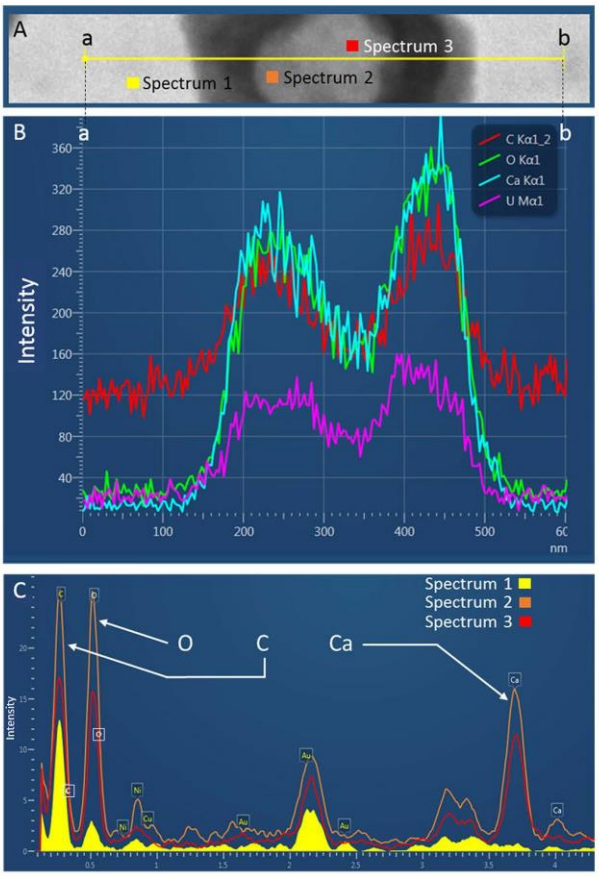


Figure 9. TEM and EDS on EVs from UF collected at 16 h p.o. *A*, transmission electron microphotography of an extracellular vesicle observed in uterine fluid. The *yellow line* (from *points a to b*) indicates the mapping zone across which EDS analysis was performed to obtain elemental spectra along the line for the indicated elements (*B*). *C*, *spectrum 1* corresponds to EDS analysis of background in the absence of vesicles, and *spectrum 2* and *spectrum 3* correspond to EDS analysis at two different locations within a vesicle, as indicated in *A*. UFs were negatively stained with uranyl acetate 2%. Intensities are given in arbitrary units.

We found seven groups of EV marker proteins according to their function: chaperone proteins (HSP), biogenesis factors (PDCD6IP, EZR, and syntenin-1), cell adhesion (FN1), intracellular trafficking proteins (Rab10), membrane organizer (CD9), signaling proteins (YWHAZ and YWHAE), and other cargo (ALB, GSN, VCP, etc.). Moreover, EZR, FN1, GSN, HSPA5, PDCD6IP, and syntenin-1 are present in several avian eggshell proteomes (chicken, duck, quail, and turkey) (101). Their presence in several proteomes highlighted their central role in the shell mineralization process. These proteins could play functional roles in the vesicular transport model proposed herein.

In this study, we used a bioinformatics approach to delineate the evolutionary history of *edil3*/*mfge8* in Eumetazoa, and we suggest that EDIL3 and MFGE8 proteins in vertebrates are derived from a duplication event, as supported by observed synteny in these and adjacent genes. Our gene expression and immunochemistry results allow us to propose a coherent model for EDIL3 and MFGE8 function in vesicles that deliver stabilized ACC for shell mineralization. This scenario involves the vesicular transport of both Ca^{2+} and HCO_3^- in the uterine fluid and predicts the involvement of additional vesicular genes, such as annexins. We confirmed the presence of extracellular vesicles in the uterine fluid and detected the elements of calcium, carbon, and oxygen (calcium carbonate) within them.

Experimental procedures

Ethical statement animal handling and housing

The present experiments, including animal handling protocols, were performed in accordance with European Communities Council Directives concerning the practice for the care and use of animals for scientific purposes and the French Ministry of Agriculture on animal experimentation under the supervision of authorized scientists (authorization no. 7323, delivered by the "Direction Départementale de la Protection des Populations d'Indre et Loire-France," DDPP). Experimental unit (UE-PEAT 1295), where the birds were housed, has an agreement to rear birds and to euthanize experimental animals (decree no. C31-175-1 of August 28, 2012, delivered by the "Préfecture d'Indre et Loire"). The experimental protocol was accepted by the CEEA VdL Ethical Committee (French National Ethics Committee for Animal Experimentation no. 19) and the French Ministry under no. 16099-015902.

Uterine fluid, egg, and tissue collections

Thirty six mature brown laying hens (ISA-Hendrix, 40 and 90 weeks old) were placed in individual furnished cages with automatic devices for recording of the oviposition times. Animals were fed *ad libitum* (layer mash) using a commercial feed for layers. Laying hens were subjected to a cycle of 14 h of light/10 h of darkness. Following collection and opening of eggs, the eggshells were thoroughly washed with water, air-dried, and stored at −20 °C.

Uterine fluids were collected as described previously (7). Briefly, egg expulsion was induced by an intravenous injection of 50 μg of Dinolytic® prostaglandin-F2α (Zoetis, Malakoff, France) at 7–9 and 16 h p.o., which correspond to the initiation and active phase of shell mineralization. Immediately after egg expulsion, UFs were collected by gravity in a tube placed at the entrance of the everted vagina. UFs were directly frozen in liquid nitrogen in the form of beads or diluted into PBS. UF samples were stored at −20 °C until use. An additional UF aliquot was also diluted 5× for SDS-PAGE into Laemmli sample buffer, for a final composition of 0.0415 M Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 10% glycerol, 1.66% β-mercaptoethanol, and 0.01% bromphenol blue.

Tissues were collected from 30 40-week-old and six 90-week-old laying hens. Animals were euthanized with Dolethal® (Vetoquinol, Magny-vernois, France) at the initial phase of eggshell mineralization (5, 6, and 7 h p.o., when the nucleation sites appear and early mineralization starts), at the beginning of the active calcification phase (10 h p.o.) or during the linear growth phase of rapid calcification (16 h p.o.). Various tissues (D, K, and L) and oviduct regions (Ma, WI, RI, and Ut) were collected from birds at each stage of shell calcification. Mid-shaft tibial bone (B) from 90-week-old hens (18 h p.o., at the end of bone resorption) were also harvested. Tissues were directly immersed in liquid nitrogen and were kept at −80 °C.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019

Table 1
Proteins involved in the proposed vesicular transport
All proteins have been reported in proteomic studies of chicken eggshell (ES) or uterine fluid (UF) (11, 15, 19, 21). ANX and CA can provide Ca^{2+} or HCO_3^-, respectively. ACC can be stabilized by LYZ (103), OC17 (105), or OVAL (104). EV markers are from the Vesiclepedia database (106).

Mineralizing activity			EV markers found in ES or UF	
Targeting	Ion accumulation (Ca^{2+} and HCO_3^-)	ACC stabilization	Function	Protein symbol
EDIL3	ANXA1	LYZ	Chaperone	HSP90AA1
MFGE8	ANXA2	OC17		HSP90B1
	ANXA5	OVAL		HSPA5
	ANXA8			HSPA8
	CA2		Biogenesis factor	PDCD6IP
	CA4			Syntenin-1
				EZR
				TSG101
			Cell adhesion	FN1
			Intracellular trafficking	RAB10
			Membrane organiszer	CD9
			Signaling protein	YWHAE
				YWHAZ
			Other (cargo)	ALB
				VCP
				TPI1
				GSN
				LDHB
				ENO1
				GDI2

Soluble eggshell matrix and tissue protein extraction

Eggshell matrix proteins from eggs were extracted as detailed previously (107). Briefly, eggshell pieces with eggshell membranes were immersed in 154 mM NaCl solution containing protease inhibitors (2.5 mM benzamidine-HCl, 50 mM ϵ-amino-*n*-caproic acid, 0.5 mM *N*-ethylmaleimide, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) and ground into a fine powder. Eggshell powders were fully demineralized by immersion in 20% acetic acid with overnight stirring at 4 °C. The resulting suspensions were dialyzed (cutoff at 3500 Da) against demineralized water during 24 h at 4 °C and lyophilized. Samples were then incubated overnight at 4 °C in 4 M guanidine HCl, 5 mM benzamidine HCl, 0.1 M ϵ-amino-*n*-caproic acid, 10 mM EDTA, 50 mM sodium acetate, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Samples were then dialyzed (cutoff at 3500 Da) against 0.5 M sodium acetate, pH 7.4, solution during 24 h at 4 °C and then centrifuged for 10 min at 2000 × *g* at 4 °C. The resulting supernatants were stored at −20 °C.

Harvested tissues were homogenized with ULTRA-TURRAX® (IKA, Staufen, Germany) in Tris-buffered saline (TBS: 50 mM Tris-HCl, 77 mM NaCl, pH 7.4, and protease inhibitors), for 0.2 g/ml tissue in each extraction solution. Samples were then centrifuged for 30 min at 10,000 × *g*, and supernatants were stored at −20 °C.

Electrophoresis and Western blot analysis

Protein concentrations were determined in various samples (SEM: Ut 10 h, UF 9 h, and D 10 h), using Bio-Rad DC Protein assay kit II (Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France) in accordance with the manufacturer's instructions and using BSA as a standard. Fifteen micrograms of each sample (SEM: UF, Ut, and D) were diluted into Laemmli sample buffer (5:1), as described previously, and boiled for 5 min. Protein samples were then separated on 12% polyacrylamide gels (Mini-Protean II electrophoresis cell, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and transferred onto 0.2-μm nitrocellulose blotting membrane (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) for Western blot analysis. Membranes were washed 5 min in TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) and incubated for 2 h with the Odyssey® blocking buffer (LI-COR, Bad Homburg, Germany) in TBS (1:1). Membranes were then incubated for 3 h in the blocking solution, containing 0.1% Tween 20, with rabbit polyclonal anti-EDIL3 (1: 1000; SAB2105802, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) or rabbit anti-MFGE8 peptide (GKAEYVRAYKVAYS) (1:1000; ProteoGenix, Schiltigheim, France), and sequentially washed 5 min in TBS, 0.1% Tween 20. The membranes were then incubated 1 h in the blocking solution, 0.1% Tween 20 and AlexaFluor® 680 goat anti-rabbit secondary antibody (1: 20,000, Invitrogen), washed three times in TBS, 0.1% Tween 20, and two times in TBS. Immunobands were revealed with Odyssey® imaging system (LI-COR, Bad Homburg, Germany) with the 700 nm channel.

Gene expression analysis

Total RNA was extracted from frozen samples (B, D, K, L, Ma, WI, RI, and Ut). RNAs from K, D, Ma, WI, RI, and Ut were extracted using NucleoSpin RNA® commercial kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), and the B total RNA was extracted using RNA Now® (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France) and tandem TRI Reagent®–TRI Reagent LS® commercial kits (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Tissues were extracted at 10 h p.o., except for tibial bone, as this sample was solely collected at 18 h p.o. Additionally, Ut and RI samples were extracted at all stages (5- 7, 10, and 16 h p.o.). Total RNAs from each sample were treated with TURBO DNA-free kit (Invitrogen). RNA concentration was measured at 260 nm, and their integrity was assessed on 1.5% agarose gels. Total RNA samples (1 μg) were reverse-transcribed using RNase H–Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Superscript II, Invitrogen) and Oligo(dT)^{TM} primers (Invitrogen).

Primers to detect expression of *G. gallus edil3*, *mfge8*, and eight housekeeping genes (*b2m, eif3i, gapdh, gusb, stag2, tbp*,

ASBMB

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019

sdha, and *ppia*) were designed using Primer-BLAST (NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) (Table S4) and synthesized (Eurogentec, Lièges, Belgium). Their efficiencies were evaluated by real-time quantitative RT-PCR using LightCycler® 480 SYBR Green I Master and LightCycler® 480 Instrument II (Roche Applied Science, Bâle, Switzerland). *Edil3*, *mfge8*, and housekeeping gene expressions were quantified using the Biomark microfluidic system from Fluidigm, in which every sample–gene combination was quantified using a 96.96 Dynamic Array™ IFCs (BMK-M-96.96, Fluidigm, San Francisco) at the Get-Genotoul platform (Toulouse, France). After specific pre-amplification and according to the manufacturer's specifications, the PCR was performed using the following thermal protocol: Thermal Mix at 50 °C, 2 min; 70 °C, 30 min; 25 °C, 10 min; Hot Start at 50 °C, 2 min; 95 °C, 10 min; PCR cycle of 35 cycles of 95 °C, 15 s; 60 °C, 60 s; and melting analysis of 60 °C, 30 s; 95 °C, 1 °C/3 s. RT-qPCR results were analyzed using Fluidigm real-time PCR analysis software version 4.1.3. Six biological replicates and two technical replicates were performed for each sample. GenNorm software was used for validation of housekeeping gene stabilities. *Edil3* and *mfge8* normalized quantities were calculated using the following formula: gene efficiency $(Ct_{\text{calibrateur}} - Ct_{\text{sample}})$/geometric average quantity of housekeeping genes. Normalized quantities of *edil3* and *mfge8* gene transcripts were compared between various measured tissues and oviduct parts using one-way ANOVA and Tukey pairwise test analysis on Minitab® 18 software with p value<0.05 to detect significance.

Synteny and phylogeny of EDIL3 and MFGE8

Synteny of *edil3* and *mfge8* genes were analyzed using the Genome data viewer of NCBI for eight vertebrate species (three mammals, two birds, one nonavian reptile, one amphibian, and two fishes).

EDIL3 and MFGE8 protein sequences of 12 vertebrate and 7 nonvertebrate species (Table S3) were aligned using Clustal Omega multiple alignment in MEGA7 (108). The appropriate substitution model, determined using MEGA7 substitution model, was the LG model. The phylogenetic tree was built with MEGA7 using Maximum Likelihood method (LG substitution model) with 1000 repetitions and the bootstrap method to evaluate branch robustness. Additionally, phylogenetic analysis using Bayesian inference was performed using BEAST version 1.10.4 (109) with 10,000,000 generations and a sampling of tree each 1000 steps. Trees were then summarized with TreeAnnotator (distributed with BEAST version 1.10.4) and displayed using FigTree version 1.4.4 (115) (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).[3] Divergence times between species were determined using Timetree (www.timetree.org/)[3] (113) and are reported on the generated phylogenetic tree.

Distinct protein domain conservation throughout the evolution of eumetazoans was investigated with HomoloGene (NCBI) and domain sequence analysis in several databases and genome browsers (ExPASy-PROSITE, https://prosite.expasy.org/; Ensembl, https://www.ensembl.org/index.html; and SMART, http://smart.embl-heidelberg.de/).[3]

Analysis of gene and protein sequences of EDIL3 and MFGE8 in G. gallus

G. gallus edil3 and *mfge8* gene, mRNA, and protein sequences were collected from the NCBI database (*edil3* Gene ID, 427326; *edil3* transcripts, XM_424906.6 and XM_004949448.3; EDIL3 proteins, XP_424906.3 and XP_004949505.1; and *mfge8* Gene ID, 415494; *mfge8* transcripts, NM_001277110.1 and NM_001277111.1; and MFGE8 proteins, NP_001264039.1 and NP_001264040.1). NCBI Genome data viewer was used to identify the exon/intron boundaries and alternative splicing of each gene. EDIL3/MFGE8 (XP_424906.3/NP_001264039.1), HAPLN1/HAPLN3 (XP_015136083.1/XP_413868.3), and VCAN/ACAN (XP_015136071.1/XP_015147464.1) pairwise alignments were performed using Clustal Omega in MEGA7. BioEdit software (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)[3] was used to determine identity and similarity percentages between sequences. Protein domains were characterized using PROSITE (https://prosite.expasy.org/)[3] and NCBI graphical view. *G. gallus* EDIL3 and MFGE8 residues involved in Ca^{2+}-binding site and PS binding were identified by homology with *H. sapiens* coagulation factor IX and X EGF domain residues and *M. musculus* MFGE8 F5/8C domain residues (28, 110). Alignment of *G. gallus* EDIL3 (XP_424906.3) and MFGE8 (NP_001264039.1) F5/8C 2 with *M. musculus* MFGE8 (NP_001038954.1) F5/8C 2 was performed using Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) (114).[3]

G. gallus EDIL3 and MFGE8 secondary and tertiary structure homology

Secondary structure of *G. gallus* EDIL3 (XP_424906.3) and MFGE8 (NP_001264039.1) peptide signal regions was predicted using PSIPRED version 3.3 (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/).[3] EGF-like and F5/8C sequence regions were then loaded on the I-TASSER program server (111), to generate secondary and tertiary structural predictions. This template-based modeling program computed protein 3D structure predictions by molecular homology for each region of EDIL3 and MFGE8. The 3D structure prediction models were edited on PyMOL Molecular Graphics system.

Purification of extracellular vesicles from uterine fluid, examination by transmission EM, and energy-dispersive X-ray analysis

Immediately after dilution, EVs were isolated from UF harvested at 7 h p.o., using previously described methodology (112). Briefly, diluted UFs were centrifuged at 100 × *g* for 15 min and then at 12,000 × *g* for 15 min to remove cell debris (Sorvall ST40 R, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Two successive ultracentrifugation steps at 100,000 × *g* (Beckman Coulter L8–70M, Beckman, Fullerton) were then performed during 90 min to pellet the EVs. The pellet was suspended in 50 μl of PBS and stored at −20 °C until TEM analysis.

Ten microliters of EV fraction were deposited on an electron microscope grid (Copper + Carbon) and then dried for 1 min. Excess liquid was absorbed with filter paper, and EVs were

[3] Please note that the JBC is not responsible for the long-term archiving and maintenance of this site or any other third party hosted site.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019

stained with 2% uranyl acetate. The grid was then immediately observed with TEM-1400 Plus electron microscope (120 kV; JEOL, Tokyo, Japan). Additionally, frozen beads (20 μl) of uterine fluid harvested at 16 h p.o. and negatively stained with 2% uranyl acetate were deposited on electron microscope grids, and EDS (Oxford 65-mm^2 detector, Aztec software) measurements were performed to detect calcium, oxygen, and carbon.

Author contributions—L. S., N. L. R., M. T. H., and J. G. conceptualization; L. S., N. L. R., M. T. H., and J. G. validation; L. S. and N. L. R. investigation; L. S. and N. L. R. methodology; L. S. writing-original draft; L. S. and J. G. project administration; N. L. R. resources; N. L. R. formal analysis; N. L. R., M. T. H., and J. G. writing-review and editing; J. G. supervision; J. G. funding acquisition.

Acknowledgments—We are grateful to Jacky Ezagal for technical skills and help in molecular biology experiments. We also thank the experimental unit (UE-PEAT) for the care of birds, the GeT-GenoToul Platform Toulouse for performing the real time quantitative PCR with the Biomark Fluidigm system, and Pierre-Ivan Raynal and Sonia Georgeault from Electronic Microscopy Platform of the Université François Rabelais de Tours for the microscopic observations.

References

1. Nys, Y., Gautron, J., García-Ruiz, J. M., and Hincke, M. T. (2004) Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. *Cr. Palevol.* **3,** 549–562
2. Hincke, M. T., Nys, Y., Gautron, J., Mann, K., Rodríguez-Navarro, A. B., and McKee, M. D. (2012) The eggshell: structure, composition and mineralization. *Front. Biosci.* **17,** 1266–1280 CrossRef Medline
3. Hamilton, R. M. G. (1986) The Microstructure of the hens eggshell- a short review. *Food Microstruct.* **5,** 99–110
4. Arias, J. L., Fink, D. J., Xiao, S. Q., Heuer, A. H., and Caplan, A. I. (1993) Biomineralization and eggshells: cell-mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix. *Int. Rev. Cytol.* **145,** 217–250 CrossRef Medline
5. Nys, Y., Hincke, M. T., Arias, J. L., García-Ruiz, J. M., and Solomon, S. E. (1999) Avian eggshell mineralization. *Poult. Avian Biol. Rev.* **10,** 143–166
6. Rodríguez-Navarro, A. B., Marie, P., Nys, Y., Hincke, M. T., and Gautron, J. (2015) Amorphous calcium carbonate controls avian eggshell mineralization: a new paradigm for understanding rapid eggshell calcification. *J. Struct. Biol.* **190,** 291–303 CrossRef Medline
7. Gautron, J., Hincke, M. T., and Nys, Y. (1997) Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens. *Connect. Tissue Res.* **36,** 195–210 CrossRef Medline
8. Jonchère, V., Brionne, A., Gautron, J., and Nys, Y. (2012) Identification of uterine ion transporters for mineralisation precursors of the avian eggshell. *BMC Physiol.* **12,** 10 CrossRef Medline
9. Dominguez-Vera, J. M., Gautron, J., García-Ruiz, J. M., and Nys, Y. (2000) The effect of avian uterine fluid on the growth behavior of calcite crystals. *Poult. Sci.* **79,** 901–907 CrossRef Medline
10. Hernandez-Hernandez, A., Gomez-Morales, J., Rodriguez-Navarro, A. B., Gautron, J., Nys, Y., and Garcia-Ruiz, J. M. (2008) Identification of some active proteins in the process of hen eggshell formation. *Cryst. Growth Des.* **8,** 4330–4339 CrossRef
11. Mann, K., Macek, B., and Olsen, J. V. (2006) Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer. *Proteomics* **6,** 3801–3810 CrossRef Medline
12. Mann, K., Olsen, J. V., Macek, B., Gnad, F., and Mann, M. (2007) Phosphoproteins of the chicken eggshell calcified layer. *Proteomics* **7,** 106–115 CrossRef Medline
13. Mikšík, I., Sedláková, P., Lacinová, K., Patarídis, S., and Eckhardt, A. (2010) Determination of insoluble avian eggshell matrix proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* **397,** 205–214 CrossRef Medline
14. Rose-Martel, M., Du J., and Hincke, M. T. (2012) Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle. *J. Proteomics* **75,** 2697–2706 CrossRef Medline
15. Sun, C., Xu, G., and Yang, N. (2013) Differential label-free quantitative proteomic analysis of avian eggshell matrix and uterine fluid proteins associated with eggshell mechanical property. *Proteomics* **13,** 3523–3536 CrossRef Medline
16. Kaweewong, K., Garnjanagoonchorn, W., Jirapakkul, W., and Roytrakul, S. (2013) Solubilization and identification of hen eggshell membrane proteins during different times of chicken embryo development using the proteomic approach. *Protein J.* **32,** 297–308 CrossRef Medline
17. Mikšík, I., Ergang, P., and Pácha, J. (2014) Proteomic analysis of chicken eggshell cuticle membrane layer. *Anal. Bioanal. Chem.* **406,** 7633–7640 CrossRef Medline
18. Ahmed, T. A., Suso, H. P., and Hincke, M. T. (2017) In-depth comparative analysis of the chicken eggshell membrane proteome. *J. Proteomics* **155,** 49–62 CrossRef Medline
19. Marie, P., Labas, V., Brionne, A., Harichaux, G., Hennequet-Antier, C., Nys, Y., and Gautron, J. (2015) Quantitative proteomics and bioinformatic analysis provide new insight into protein function during avian eggshell biomineralization. *J. Proteomics* **113,** 178–193 CrossRef Medline
20. Gautron, J., Guyot, N., Brionne, A., and Réhault-Godbert, S. (2019) in *Eggs as Functional Foods and Nutraceuticals for Human Health* (Wu, J., ed) pp. 259–284, The Royal Society Of Chemistry, London, UK.
21. Marie, P., Labas, V., Brionne, A., Harichaux, G., Hennequet-Antier, C., Rodriguez-Navarro, A. B., Nys, Y., and Gautron, J. (2015) Quantitative proteomics provides new insights into chicken eggshell matrix protein functions during the primary events of mineralisation and the active calcification phase. *J. Proteomics* **126,** 140–154 CrossRef Medline
22. Brionne, A., Nys, Y., Hennequet-Antier, C., and 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,** 220 CrossRef Medline
23. Mann, K., and Mann, M. (2013) The proteome of the calcified layer organic matrix of turkey (Meleagris gallopavo) eggshell. *Proteome Sci.* **11,** 40 CrossRef Medline
24. Mann, K., and Mann, M. (2015) Proteomic analysis of quail calcified eggshell matrix: a comparison to chicken and turkey eggshell proteomes. *Proteome Sci.* **13,** 22 CrossRef Medline
25. Deleted in proof
26. Oshima, K., Aoki, N., Negi, M., Kishi, M., Kitajima, K., and Matsuda, T. (1999) Lactation-dependent expression of an mRNA splice variant with an exon for a multiply *O*-glycosylated domain of mouse milk fat globule glycoprotein MFG-E8. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254,** 522–528 CrossRef Medline
27. Oshima, K., Yasueda, T., Nishio, S., and Matsuda, T. (2014) in *MFG-E8 and Inflammation* (Wang, P., ed) pp. 1–31, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
28. Ye, H., Li, B., Subramanian, V., Choi, B. H., Liang, Y., Harikishore, A., Chakraborty, G., Baek, K., and Yoon, H. S. (2013) NMR solution structure of C2 domain of MFG-E8 and insights into its molecular recognition with phosphatidylserine. *Biochim. Biophys. Acta* **1828,** 1083–1093 CrossRef Medline
29. Stubbs, J. D., Lekutis, C., Singer, K. L., Bui, A., Yuzuki, D., Srinivasan, U., and Parry, G. (1990) Cdna cloning of a mouse mammary epithelial-cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor-Viii-like sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87,** 8417–8421 CrossRef Medline
30. Théry, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1999) Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes: Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J. Cell Biol.* **147,** 599–610 CrossRef Medline
31. Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (2002) Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* **417,** 182–187 CrossRef Medline

ASBMB

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019

32. Ensslin, M. A., and Shur, B. D. (2003) Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. *Cell* **114,** 405–417 CrossRef Medline
33. Gatti, J. L., Métayer, S., Belghazi, M., Dacheux, F., and Dacheux, J. L. (2005) Identification, proteomic profiling, and origin of ram epididymal fluid exosome-like vesicles. *Biol. Reprod.* **72,** 1452–1465 CrossRef Medline
34. Ait-Oufella, H., Kinugawa, K., Zoll, J., Simon, T., Boddaert, J., Heeneman, S., Blanc-Brude, O., Barateau, V., Potteaux, S., Merval, R., Esposito, B., Teissier, E., Daemen, M. J., Lesèche, G., Boulanger, C., *et al.* (2007) Lactadherin deficiency leads to apoptotic cell accumulation and accelerated atherosclerosis in mice. *Circulation* **115,** 2168–2177 CrossRef Medline
35. Hidai, C., Zupancic, T., Penta, K., Mikhail, A., Kawana, M., Quertermous, E. E., Aoka, Y., Fukagawa, M., Matsui, Y., Platika, D., Auerbach, R., Hogan, B. L., Snodgrass, R., and Quertermous, T. (1998) Cloning and characterization of developmental endothelial locus-1: An embryonic endothelial cell protein that binds the $\alpha v\beta 3$ integrin receptor. *Gene Dev.* **12,** 21–33 CrossRef Medline
36. Penta, K., Varner, J. A., Liaw, L., Hidai, C., Schatzman, R., and Quertermous, T. (1999) Del1 induces integrin signaling and angiogenesis by ligation of $\alpha V\beta 3$. *J. Biol. Chem.* **274,** 11101–11109 CrossRef Medline
37. Zhong, J., Eliceiri, B., Stupack, D., Penta, K., Sakamoto, G., Quertermous, T., Coleman, M., Boudreau, N., and Varner, J. A. (2003) Neovascularization of ischemic tissues by gene delivery of the extracellular matrix protein Del-1. *J. Clin. Invest.* **112,** 30–41 CrossRef Medline
38. Zou, X., Qiao, H., Jiang, X., Dong, X., Jiang, H., and Sun, X. (2009) Down-regulation of developmentally regulated endothelial cell locus-1 inhibits the growth of colon cancer. *J. Biomed. Sci.* **16,** 33 CrossRef Medline
39. Aoka, Y., Johnson, F. L., Penta, K., Hirata Ki, K., Hidai, C., Schatzman, R., Varner, J. A., and Quertermous, T. (2002) The embryonic angiogenic factor Del1 accelerates tumor growth by enhancing vascular formation. *Microvasc. Res.* **64,** 148–161 CrossRef Medline
40. Lee, J. E., Moon, P. G., Cho, Y. E., Kim, Y. B., Kim, I. S., Park, H., and Baek, M. C. (2016) Identification of EDIL3 on extracellular vesicles involved in breast cancer cell invasion. *J. Proteomics* **131,** 17–28 CrossRef Medline
41. Pavlopoulou, A., Pampalakis, G., Michalopoulos, I., and Sotiropoulou, G. (2010) Evolutionary history of tissue kallikreins. *PLoS ONE* **5,** e13781 CrossRef Medline
42. Packard, M. J., and Seymour, R. S. (1997) in *Amniote Origins* (Sumida, S.S., and Martin, K. L.M., eds) pp. 265–290, Academic Press, London
43. Romer, A. S. (1957) Origin of the amniote egg. *Scientific Monthly* **85,** 57–63
44. Larocca, D., Peterson, J. A., Urrea, R., Kuniyoshi, J., Bistrain, A. M., and Ceriani, R. L. (1991) A M_r 46,000 human-milk fat globule protein that is highly expressed in human breast tumors contains factor Viii-like domains. *Cancer Res.* **51,** 4994–4998 Medline
45. Andersen, M. H., Berglund, L., Rasmussen, J. T., and Petersen, T. E. (1997) Bovine PAS-6/7 binds $\alpha(V)\beta(5)$ integrin and anionic phospholipids through two domains. *Biochemistry* **36,** 5441–5446 CrossRef Medline
46. Shi, J., Heegaard, C. W., Rasmussen, J. T., and Gilbert, G. E. (2004) Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-L-serine and increased curvature. *Biochim. Biophys. Acta* **1667,** 82–90 CrossRef Medline
47. Otzen, D. E., Blans, K., Wang, H., Gilbert, G. E., and Rasmussen, J. T. (2012) Lactadherin binds to phosphatidylserine-containing vesicles in a two-step mechanism sensitive to vesicle size and composition. *Biochim. Biophys. Acta* **1818,** 1019–1027 CrossRef Medline
48. Shao, C., Novakovic, V. A., Head, J. F., Seaton, B. A., and Gilbert, G. E. (2008) Crystal structure of lactadherin C2 domain at 1.7A resolution with mutational and computational analyses of its membrane-binding motif. *J. Biol. Chem.* **283,** 7230–7241 CrossRef Medline
49. Oshima, K., Aoki, N., Kato, T., Kitajima, K., and Matsuda, T. (2002) Secretion of a peripheral membrane protein, MFG-E8, as a complex with membrane vesicles. *Eur. J. Biochem.* **269,** 1209–1218 CrossRef Medline
50. Podlaha, O., Webb, D. M., and Zhang, J. (2006) Accelerated evolution and loss of a domain of the sperm–egg-binding protein SED1 in ancestral primates. *Mol. Biol. Evol.* **23,** 1828–1831 CrossRef Medline
51. Hvarregaard, J., Andersen, M. H., Berglund, L., Rasmussen, J. T., and Petersen, T. E. (1996) Characterization of glycoprotein PAS-6/7 from membranes of bovine milk fat globules. *Eur. J. Biochem.* **240,** 628–636 CrossRef Medline
52. Gautron, J. (2018) ANR IMPACT report, Agence National de la Recherche, Paris, France.
53. Deleted in proof
54. Raymond, A., Ensslin, M. A., and Shur, B. D. (2009) SED1/MFG-E8: a Bi-Motif protein that orchestrates diverse cellular interactions. *J. Cell Biochem.* **106,** 957–966 CrossRef Medline
55. Nys, Y., and Guyot, N. (2011) in *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products* (Yves, N., Maureen, B., Filip, V.I.,) pp. 83–132, Woodhead publishing, Cambridge, UK.
56. Nys, Y., Parkes, C. O., and Thomasset, M. (1986) Effects of suppression and resumption of shell formation and parathyroid hormone on uterine calcium-binding protein, carbonic anhydrase activity, and intestinal calcium absorption in hens. *Gen. Comp. Endocrinol.* **64,** 293–299 CrossRef Medline
57. Ankra-Badu, G., and Aggrey, S. (2005) Identification of candidate genes at quantitative trait loci on chicken chromosome Z using orthologous comparison of chicken, mouse, and human genomes. *In Silico Biol.* **5,** 593–604 Medline
58. Tuiskula-Haavisto, M., Honkatukia, M., Vilkki, J., de Koning, D. J., Schulman, N. F., and Maki-Tanila, A. (2002) Mapping of quantitative trait loci affecting quality and production traits in egg layers. *Poult. Sci.* **81,** 919–927 CrossRef
59. Cordeiro, C. M., and Hincke, M. T. (2016) Quantitative proteomics analysis of eggshell membrane proteins during chick embryonic development. *J. Proteomics* **130,** 11–25 CrossRef Medline
60. Carrino, D. A., Dennis, J. E., Wu, T. M., Arias, J. L., Fernandez, M. S., Rodriguez, J. P., Fink, D. J., Heuer, A. H., and Caplan, A. I. (1996) The avian eggshell extracellular matrix as a model for biomineralization. *Connect. Tissue Res.* **35,** 325–329 CrossRef Medline
61. Fernandez, M. S., Araya, M., and Arias, J. L. (1997) Eggshells are shaped by a precise spatio-temporal arrangement of sequentially deposited macromolecules. *Matrix Biol.* **16,** 13–20 CrossRef Medline
62. Nakano, T., Ikawa, N., and Ozimek, L. (2001) Extraction of glycosaminoglycans from chicken eggshell. *Poult. Sci.* **80,** 681–684 CrossRef Medline
63. Nakano, T., Ikawa, N., and Ozimek, L. (2002) Galactosaminoglycan composition in chicken eggshell. *Poult. Sci.* **81,** 709–714 CrossRef Medline
64. Hunter, G. K., Wong, K. S., and Kim, J. J. (1988) Binding of calcium to glycosaminoglycans: an equilibrium dialysis study. *Arch. Biochem. Biophys.* **260,** 161–167 CrossRef Medline
65. Kiani, C., Chen, L., Wu, Y. J., Yee, A. J., and Yang, B. B. (2002) Structure and function of aggrecan. *Cell Res.* **12,** 19–32 CrossRef Medline
66. Shibata, S., Fukada, K., Imai, H., Abe, T., and Yamashita, Y. (2003) *In situ* hybridization and immunohistochemistry of versican, aggrecan and link protein, and histochemistry of hyaluronan in the developing mouse limb bud cartilage. *J. Anat.* **203,** 425–432 CrossRef Medline
67. Matsumoto, K., Kamiya, N., Suwan, K., Atsumi, F., Shimizu, K., Shinomura, T., Yamada, Y., Kimata, K., and Watanabe, H. (2006) Identification and characterization of versican/PG-M aggregates in cartilage. *J. Biol. Chem.* **281,** 18257–18263 CrossRef Medline
68. Anderson, H. C. (1969) Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J. Cell Biol.* **41,** 59–72 CrossRef Medline
69. Xiao, Z., Camalier, C. E., Nagashima, K., Chan, K. C., Lucas, D. A., de la Cruz, M. J., Gignac, M., Lockett, S., Issaq, H. J., Veenstra, T. D., Conrads, T. P., and Beck, G. R., Jr. (2007) Analysis of the extracellular matrix vesicle proteome in mineralizing osteoblasts. *J. Cell Physiol.* **210,** 325–335 CrossRef Medline
70. Golub, E. E. (2009) Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochim. Biophys. Acta* **1790,** 1592–1598 CrossRef Medline
71. Morhayim, J., Baroncelli, M., and van Leeuwen, J. P. (2014) Extracellular vesicles: specialized bone messengers. *Arch. Biochem. Biophys.* **561,** 38–45 CrossRef Medline
72. Bottini, M., Mebarek, S., Anderson, K. L., Strzelecka-Kiliszek, A., Bozycki, L., Simão, A. M. S., Bolean, M., Ciancaglini, P., Pikula, J. B., Pikula, S., Magne, D., Volkmann, N., Hanein, D., Millán, J. L., and Buchet, R. (2018)

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019

Matrix vesicles from chondrocytes and osteoblasts: their biogenesis, properties, functions and biomimetic models. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1862,** 532–546 CrossRef Medline
73. Hasegawa, T., Yamamoto, T., Tsuchiya, E., Hongo, H., Tsuboi, K., Kudo, A., Abe, M., Yoshida, T., Nagai, T., Khadiza, N., Yokoyama, A., Oda, K., Ozawa, H., de Freitas, P. H. L., Li, M., and Amizuka, N. (2017) Ultrastructural and biochemical aspects of matrix vesicle-mediated mineralization. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* **53,** 34–45 CrossRef Medline
74. Mahamid, J., Sharir, A., Gur, D., Zelzer, E., Addadi, L., and Weiner, S. (2011) Bone mineralization proceeds through intracellular calcium phosphate loaded vesicles: a cryo-electron microscopy study. *J. Struct. Biol.* **174,** 527–535 CrossRef Medline
75. Kerschnitzki, M., Akiva, A., Ben Shoham, A., Asscher, Y., Wagermaier, W., Fratzl, P., Addadi, L., and Weiner, S. (2016) Bone mineralization pathways during the rapid growth of embryonic chicken long bones. *J. Struct. Biol.* **195,** 82–92 CrossRef Medline
76. Kerschnitzki, M., Akiva, A., Shoham, A. B., Koifman, N., Shimoni, E., Rechav, K., Arraf, A. A., Schultheiss, T. M., Talmon, Y., Zelzer, E., Weiner, S., and Addadi, L. (2016) Transport of membrane-bound mineral particles in blood vessels during chicken embryonic bone development. *Bone* **83,** 65–72 CrossRef Medline
77. Balcerzak, M., Malinowska, A., Thouverey, C., Sekrecka, A., Dadlez, M., Buchet, R., and Pikula, S. (2008) Proteome analysis of matrix vesicles isolated from femurs of chicken embryo. *Proteomics* **8,** 192–205 CrossRef Medline
78. Rosenthal, A. K., Gohr, C. M., Ninomiya, J., and Wakim, B. T. (2011) Proteomic analysis of articular cartilage vesicles from normal and osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* **63,** 401–411 CrossRef Medline
79. Shapiro, I. M., Landis, W. J., and Risbud, M. V. (2015) Matrix vesicles: are they anchored exosomes? *Bone* **79,** 29–36 CrossRef Medline
80. Thouverey, C., Malinowska, A., Balcerzak, M., Strzelecka-Kiliszek, A., Buchet, R., Dadlez, M., and Pikula, S. (2011) Proteomic characterization of biogenesis and functions of matrix vesicles released from mineralizing human osteoblast-like cells. *J. Proteomics* **74,** 1123–1134 CrossRef Medline
81. Waqas, M. Y., Yang, P., Ahmed, N., Zhang, Q., Liu, T., Li, Q., Hu, L., Hong, C., and Chen, Q. (2016) Characterization of the ultrastructure in the uterovaginal junction of the hen. *Poult. Sci.* **95,** 2112–2119 CrossRef Medline
82. Hincke, M. T., Chien, Y. C., Gerstenfeld, L. C., and McKee, M. D. (2008) Colloidal-gold immunocytochemical localization of osteopontin in avian eggshell gland and eggshell. *J. Histochem. Cytochem.* **56,** 467–476 CrossRef Medline
83. Chien, Y. C., Hincke, M. T., and McKee, M. D. (2009) Ultrastructure of avian eggshell during resorption following egg fertilization. *J. Struct. Biol.* **168,** 527–538 CrossRef Medline
84. Wyburn, G. M., Johnston, H. S., Draper, M. H., and Davidson, M. F. (1973) The ultrastructure of the shell forming region of the oviduct and the development of the shell of *Gallus domesticus*. *Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.* **58,** 143–151 Medline
85. Dennis, J. E., Xiao, S. Q., Agarwal, M., Fink, D. J., Heuer, A. H., and Caplan, A. I. (1996) Microstructure of matrix and mineral components of eggshells from White Leghorn chickens (*G. gallus*). *J. Morphol.* **228,** 287–306 CrossRef Medline
86. Fraser, A. C., Bain, M. M., and Solomon, S. E. (1998) Organic matrix morphology and distribution in the palisade layer of eggshells sampled at selected periods during lay. *Br. Poult. Sci.* **39,** 225–228 CrossRef Medline
87. Hincke, M. T., Gautron, J., Tsang, C. P., McKee, M. D., and 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 CrossRef Medline
88. Brecevic, L., and Nielsen, A. E. (1989) Solubility of amorphous calcium-carbonate. *J. Cryst. Growth* **98,** 504–510 CrossRef
89. Addadi, L., Raz, S., and Weiner, S. (2003) Taking advantage of disorder: amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralization. *Adv. Mater.* **15,** 959–970 CrossRef
90. Weiss, I. M., Tuross, N., Addadi, L., and Weiner, S. (2002) Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. *J. Exp. Zool.* **293,** 478–491 CrossRef Medline
91. Luquet, G. (2012) Biomineralizations: insights and prospects from crustaceans. *Zookeys* 2012, 103–121 CrossRef Medline
92. Tester, C. C., Brock, R. E., Wu, C. H., Krejci, M. R., Weigand, S., and Joester, D. (2011) *In vitro* synthesis and stabilization of amorphous calcium carbonate (ACC) nanoparticles within liposomes. *CrystEngComm* **13,** 3975–3978 CrossRef
93. Nys, Y., Zawadzki, J., Gautron, J., and Mills, A. D. (1991) Whitening of brown-shelled eggs: mineral composition of uterine fluid and rate of protoporphyrin deposition. *Poult. Sci.* **70,** 1236–1245 CrossRef Medline
94. Vidavsky, N., Masic, A., Schertel, A., Weiner, S., and Addadi, L. (2015) Mineral-bearing vesicle transport in sea urchin embryos. *J. Struct. Biol.* **192,** 358–365 CrossRef Medline
95. Kirsch, T., Harrison, G., Golub, E. E., and Nah, H. D. (2000) The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage. *J. Biol. Chem.* **275,** 35577–35583 CrossRef Medline
96. Genge, B. R., Wu, L. N., and Wuthier, R. E. (2007) *In vitro* modeling of matrix vesicle nucleation: synergistic stimulation of mineral formation by annexin A5 and phosphatidylserine. *J. Biol. Chem.* **282,** 26035–26045 CrossRef Medline
97. Merolli, A., and Santin, M. (2009) Role of phosphatidyl-serine in bone repair and its technological exploitation. *Molecules* **14,** 5367–5381 CrossRef Medline
98. Rojas, E., Arispe, N., Haigler, H. T., Burns, A. L., and Pollard, H. B. (1992) Identification of annexins as calcium channels in biological-membranes. *Bone Miner.* **17,** 214–218 CrossRef Medline
99. Wuthier, R. E., Wu, L. N., Sauer, G. R., Genge, B. R., Yoshimori, T., and Ishikawa, Y. (1992) Mechanism of matrix vesicle calcification–characterization of ion channels and the nucleational core of growth plate vesicles. *Bone Miner.* **17,** 290–295 CrossRef Medline
100. Kirsch, T., Nah, H. D., Demuth, D. R., Harrison, G., Golub, E. E., Adams, S. L., and Pacifici, M. (1997) Annexin V-mediated calcium flux across membranes is dependent on the lipid composition: implications for cartilage mineralization. *Biochemistry* **36,** 3359–3367 CrossRef Medline
101. Zhu, F., Zhang, F., Hincke, M., Yin, Z. T., Chen, S. R., Yang, N., and Hou, Z. C. (2019) iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of duck eggshell during biomineralization. *Proteomics* **19,** e1900011 CrossRef Medline
102. Arad, Z., Eylath, U., Ginsburg, M., and Eyal-Giladi, H. (1989) Changes in uterine fluid composition and acid-base status during shell formation in the chicken. *Am. J. Physiol.* **257,** R732–R737 CrossRef Medline
103. Voinescu, A. E., Touraud, D., Lecker, A., Pfitzner, A., Kunz, W., and Ninham, B. W. (2007) Mineralization of $CaCO_3$ in the presence of egg white lysozyme. *Langmuir* **23,** 12269–12274 CrossRef Medline
104. Pipich, V., Balz, M., Wolf, S. E., Tremel, W., and Schwahn, D. (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. *J. Am. Chem. Soc.* **130,** 6879–6892 CrossRef Medline
105. Freeman, C. L., Harding, J. H., Quigley, D., and Rodger, P. M. (2010) Structural control of crystal nuclei by an eggshell protein. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49,** 5135–5137 CrossRef Medline
106. Pathan, M., Fonseka, P., Chitti, S. V., Kang, T., Sanwlani, R., Van Deun, J., Hendrix, A., and Mathivanan, S. (2019) Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res.* **47,** D516–D519 CrossRef Medline
107. Gautron, J., Hincke, M. T., Panheleux, M., Garcia-Ruiz, J. M., Boldicke, T., and Nys, Y. (2001) Ovotransferrin is a matrix protein of the hen eggshell membranes and basal calcified layer. *Connect. Tissue Res.* **42,** 255–267 CrossRef Medline
108. Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis Version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33,** 1870–1874 CrossRef Medline
109. Drummond, A. J., and Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* **7,** 214 CrossRef Medline
110. Handford, P. A., Baron, M., Mayhew, M., Willis, A., Beesley, T., Brownlee, G. G., and Campbell, I. D. (1990) The first EGF-like domain from human factor IX contains a high-affinity calcium binding site. *EMBO J.* **9,** 475–480 CrossRef Medline

ASBMB

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019

111. Yang, J., and Zhang, Y. (2015) I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.* **43,** W174–W181 CrossRef Medline
112. Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 2006, Chapter 3, Unit 3.22 CrossRef Medline
113. Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., and Hedges, S. B. (2017) TimeTree: a resource for timelines, timetrees, and divergence times. *Mol. Biol. Evol.* **34,** 1812–1819 CrossRef Medline
114. Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., and Lopez, R. (2015) The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res.* **43,** W580–W584 CrossRef Medline
115. Rambaut, A. (2009) *FigTree*, Version 1.4.4

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019

The glycoproteins EDIL3 and MFGE8 regulate vesicle-mediated eggshell calcification in a new model for avian biomineralization

Lilian Stapane, Nathalie Le Roy, Maxwell T. Hincke and Joël Gautron

J. Biol. Chem. 2019, 294:14526-14545.
doi: 10.1074/jbc.RA119.009799 originally published online July 29, 2019

Access the most updated version of this article at doi: 10.1074/jbc.RA119.009799

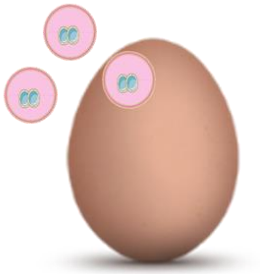
Alerts:
- When this article is cited
- When a correction for this article is posted

Click here to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 107 references, 12 of which can be accessed free at
http://www.jbc.org/content/294/40/14526.full.html#ref-list-1

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on October 4, 2019

Chapitre 2 : Validation du nouveau modèle pour la biominéralisation de la coquille des oiseaux : un transport vésiculaire assure l'adressage du carbonate de calcium amorphe stabilisé



Présentation des travaux réalisés dans ce chapitre (article 2)

« A new model for avian shell biomineralization: vesicular transport ensures delivery of stabilized amorphous calcium carbonate »

Lilian Stapane[1], Nathalie Le Roy[1], Jacky Ezagal[1], Alejandro B. Rodriguez-Navarro[2], Valérie Labas[3], Lucie Combes-Soia[3], Maxwell T. Hincke[4], Joël Gautron[1]*

[1]BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France, [2]Departmento de Mineralogia y Petrologia, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain, [3]UMR PRC, INRA 85, CNRS 7247, Université de Tours, IFCE, 37380 Nouzilly, France, [4]Department of Innovation in Medical Education, and Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Ottawa, Ottawa, Canada K1H8M5.

Mots clefs : Biominéralisation, coquille d'œuf, vésicule extracellulaire, carbonate de calcium amorphe, microscopie électronique, transport de calcium.

L'article soumis est présenté page 163 de ce manuscrit.

Introduction et objectifs

L'étude précédente était principalement prédictive, et a permis d'établir une hypothèse démontrant l'implication des protéines EDIL3 et MFGE8 dans le processus de minéralisation de la coquille d'œuf des oiseaux. Ainsi, les analyses de structure des deux protéines nous ont permis de déterminer leurs fonctions moléculaires potentielles et de prédire leur rôle dans la calcification de la coquille. Après confrontation de nos résultats avec les données bibliographiques, nous avons proposé que des vésicules extracellulaires stabiliseraient l'ACC et délivreraient ce dernier sur le site de la minéralisation durant la formation de la coquille des oiseaux (**Chapitre 1**). Les protéines EDIL3 et MFGE8 seraient impliquées dans ce transport vésiculaire, dans lequel elles assureraient l'adressage.

Dans cette seconde étude, nos objectifs étaient de valider de manière expérimentale, ce nouveau modèle de transport vésiculaire du minéral pour la calcification de la coquille, et de caractériser les acteurs moléculaires clefs de ce transport.

La démarche utilisée a été reportée en **figure 40**. Dans un premier temps, nous avons utilisé des techniques de microscopie électronique pour évaluer l'activité vésiculaire des

cellules utérines et confirmer la présence de vésicules extracellulaires dans le fluide utérin. Nous avons ensuite employé des techniques d'analyses élémentaires et de diffraction dans le but de valider la présence d'ACC dans les vésicules du fluide utérin. Nous avons alors quantifié l'expression de gènes clefs dans l'utérus, afin d'identifier les acteurs moléculaires majeurs de ce transport. Pour compléter l'analyse d'expression, nous avons mis en place une approche protéomique sur les vésicules extracellulaires isolées à partir du fluide utérin. Enfin, les protéines clefs de ce mécanisme vésiculaire ont été localisées dans le tissus utérin. Les résultats ont permis de confirmer le modèle de transport vésiculaire de l'ACC précédemment proposé et de dresser ainsi un modèle global et cohérent de l'apport des précurseurs minéraux, nécessaire à la minéralisation de la coquille d'œuf des oiseaux.

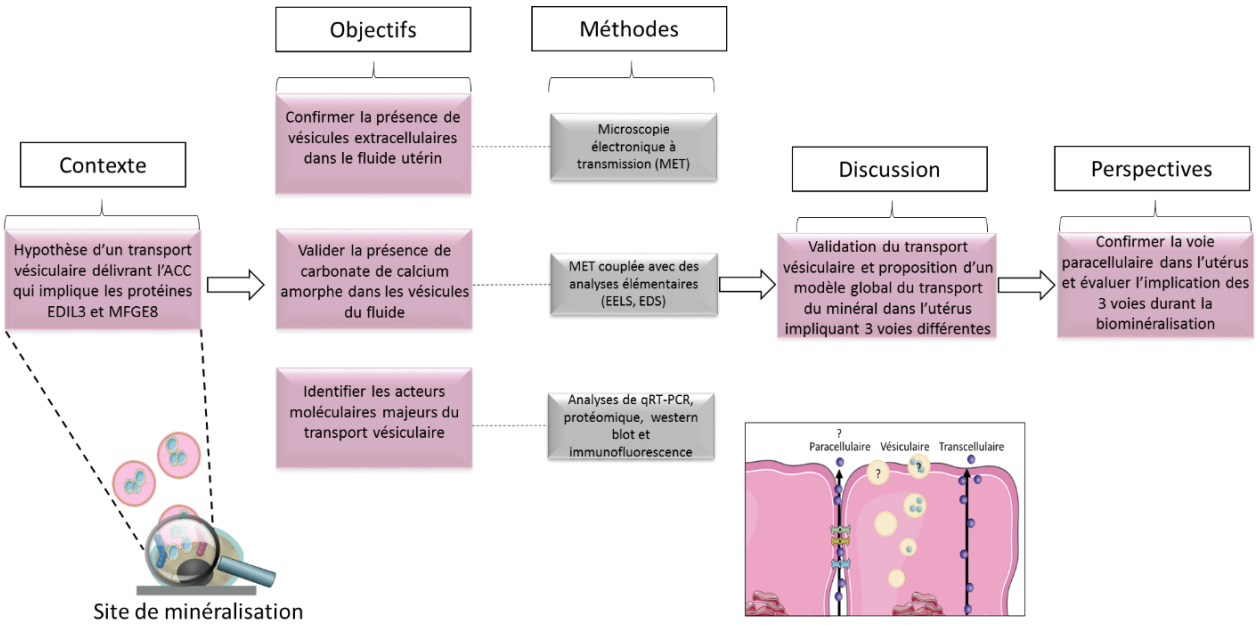


Figure 40. Diagramme de la démarche suivie pour l'article 2.

Résultats et discussion

1. Présence de vésicules extracellulaires contenant de l'ACC dans le fluide utérin

Dans une première étape, les cellules du tissu utérin ont été analysées au microscope électronique à transmission. Des vésicules ont été observées dans les cellules utérines et au niveau de la membrane plasmique. Des activités de bourgeonnements de la membrane, libérant les vésicules dans le fluide utérin, ont également été visualisées. Au niveau de la lumière de l'utérus, de nombreuses vésicules extracellulaires ont aussi été retrouvées. La taille des

vésicules extracellulaires identifiées (100-400 nm) semble correspondre à celles des ectosomes (Kalra *et al.* 2016). De plus, l'observation du fluide utérin en microscopie électronique a permis de confirmer la présence de nombreuses vésicules extracellulaires dans ce milieu.

Dans une seconde étape, la présence de minéral à l'intérieur des vésicules extracellulaires repérées dans le fluide a été prospectée *via* des techniques de spectroscopies (spectroscopie des pertes d'énergie ; EELS et spectroscopie de rayons-X à dispersion d'énergie ; EDS). Les spectres et cartographies obtenus ont permis de détecter les éléments calcium, oxygène et carbone dans les vésicules, validant ainsi la présence de carbonate de calcium dans les vésicules. Une analyse de diffraction sur ces vésicules a finalement permis de confirmer que le minéral séquestré se trouvait sous une forme amorphe (ACC). Ces résultats confortent la présence de vésicules extracellulaires transportant de l'ACC dans le fluide utérin. Les analyses de spectroscopie n'ont pas été réalisées sur les vésicules intracellulaires dans cette étude car cela nécessite une cryo-préservation du tissu et un équipement de microscopie particulier. Toutefois, des vésicules intracellulaires contenant de l'ACC ont déjà été observées dans les cellules épithéliales de l'embryon d'oursin (Beniash *et al.* 1999, Vidavsky *et al.* 2014). De la même manière, du phosphate de calcium amorphe a été observé dans des vésicules intracellulaires d'ostéoblastes de souris (Mahamid *et al.* 2011). Ces résultats semblent indiquer que l'ACC présent dans les vésicules du fluide utérin pourrait être inclus dans les cellules utérines.

2. Identification et localisation des acteurs moléculaires de ce transport vésiculaire

Le modèle du transport vésiculaire est basé sur des vésicules extracellulaires qui séquestrent des ions calcium et bicarbonates de manière à générer de l'ACC encapsulé qui est adressé sur le site de la minéralisation pour permettre le développement du minéral (**Chapitre 1**). Ainsi, les acteurs potentiels de ce transport sont les protéines décrites comme vésiculaires, les protéines qui fourniraient les ions calcium et bicarbonates, les protéines qui stabiliseraient l'ACC et les protéines qui adresseraient les vésicules.

Dans cette étude, les acteurs moléculaires du transport vésiculaire de la coquille ont été recherchés à partir d'une base de données sur les vésicules (Vesiclepedia) et les données de littérature. L'analyse d'expression de 33 gènes vésiculaires a ainsi été mesurée sur les 4 segments de l'oviducte (magnum, isthme blanc, isthme rouge et utérus) et sur 4 tissus de référence (os, rein, duodénum et foie). En complément, des analyses de protéomique et de Western blots ont été réalisées sur les vésicules du fluide utérin. Une détection par

immunofluorescence a finalement été conduite pour localiser les protéines clefs du transport vésiculaire au niveau du tissu utérin, aux stades pivots de la minéralisation.

Les résultats d'expression indiquent une forte expression de 20 gènes au niveau des segments de l'oviducte responsables de la formation de la coquille. Parmi eux, 7 gènes encodent des protéines qui sont présentes dans la base de données « Vesiclepedia », qui répertorie les marqueurs vésiculaires (Pathan *et al.* 2019). En outre, 12 gènes encodent des protéines précédemment détectées dans les vésicules extracellulaires impliquées dans les mécanismes de la formation osseuse/cartilagineuse (Xiao *et al.* 2007, Balcerzak *et al.* 2008, Rosenthal *et al.* 2011, Thouverey *et al.* 2011, Shapiro *et al.* 2015). Les gènes rapportés comme fortement exprimés dans les segments de l'oviducte responsables de la formation de la coquille encodent des protéines qui sont impliquées dans différentes fonctions dans le modèle du transport vésiculaire de la coquille.

Une partie d'entre eux sont impliqués dans le fonctionnement général des vésicules extracellulaires (formation/transport). En effet, les protéines codées par les gènes *Pdcd6ip, Sdcbp, Tsg101 et Vps26a* sont impliquées dans la biogénèse des vésicules (Colombo *et al.* 2014, Shapiro *et al.* 2015, Azoidis *et al.* 2018, Hessvik et Llorente 2018, Van Niel *et al.* 2018). De leur côté, *Rab5a, Rab27a, Vamp7, Vamp3* et *Vps4b* participent à la libération des vésicules (Colombo *et al.* 2014, Shapiro *et al.* 2015, Azoidis *et al.* 2018, Van Niel *et al.* 2018). Les gènes *Ywhah* et *Yhwaz* encodent des protéines de signalisation (Shapiro *et al.* 2015), alors que les gènes *Hspa8* et *Cd82* encodent respectivement une protéine chaperonne et une protéine impliquée dans l'organisation de la membrane des vésicules (Shapiro *et al.* 2015, Azoidis *et al.* 2018, Van Niel *et al.* 2018). Parmi les protéines encodées par ces gènes, PDCD6IP et **Syntenin-1** (*Sdcbp*) ont été retrouvées dans les vésicules du fluide utérin *via* l'analyse protéomique. Le marquage d'immunofluorescence a également révélé la présence de la protéine **PDCD6IP** dans les cellules utérines tout au long de la minéralisation. Enfin, **Ezrin** (non testée dans l'analyse d'expression), une protéine répertoriée dans la base de données Vesiclepedia qui serait impliquée dans la libération des vésicules (Blin *et al.* 2008, Pathan *et al.* 2019), a également été identifiée dans l'analyse de protéomique. Ces résultats sont soutenus par l'identification antérieure des protéines PDCD6IP, Ezrin et Syntenin-1 au niveau des vésicules extracellulaires osseuses/cartilagineuses (Balcerzak *et al.* 2008, Rosenthal *et al.* 2011, Shapiro *et al.* 2015).

Parmi les gènes fortement exprimés, on retrouve des acteurs de l'apport du calcium à l'intérieur de la vésicule. En effet, les protéines encodées par les gènes *Anxa1, Anxa2* et *Anxa8*

exposent un domaine de liaison aux phospholipides et peuvent jouer le rôle de canaux calciques (Rojas *et al.* 1992, Wuthier et Lipscomb 2011). De plus, le marquage d'immunofluorescence a révélé la présence des protéines ANXA1 et ANXA2 au niveau de l'épithélium de l'utérus avec un signal plus élevé à l'initiation. De son côté, la protéine ANXA8 a été retrouvée dans l'épithélium mais aussi dans les cellules des glandes tubulaires de l'utérus avec un marquage plus intense au début de la phase de croissance rapide. De plus, **ANXA2** fait partie des protéines communes aux coquilles des œufs de poule, de caille, de canard et de dinde (Zhu *et al.* 2019). De leurs côtés, les protéines **ANXA1** (Cordeiro et Hincke 2016) et **ANXA8** ont également été identifiées dans la coquille d'œuf de poule (Mann *et al.* 2006). Ainsi, ces 3 protéines constituent des candidats robustes, qui permettraient l'entrée du calcium dans le transport vésiculaire.

La troisième catégorie concerne les gènes impliqués dans l'apport des ions bicarbonates dans la vésicule. Les gènes *Ca2* et *Slc4a7* ont été analysés *via* l'étude d'expression. Les anhydrases carboniques sont des enzymes qui catalysent l'hydratation du CO_2 en ions bicarbonates (Hassan *et al.* 2013). Chez le poulet, la famille des anhydrases carboniques contient 14 isoformes. Parmi cette liste, nous avons testé CA2 car cette dernière était celle reportée comme étant la plus abondante dans la matrice organique de la coquille (Marie *et al.* 2015b). Par ailleurs, SLC4A7 est un co-transporteur sodium/bicarbonate qui a précédemment été identifié dans des vésicules d'ostéoblastes humains (Thouverey *et al.* 2011). Aucun des deux gènes testés n'a été retrouvé comme fortement exprimé dans les tissus responsables de la formation de la coquille. Cependant, l'analyse protéomique a révélé la présence de l'anhydrase carbonique 4 (*Ca4*). Son expression a alors été testée en PCR point final dans les différents tissus et organes. Les résultats indiquent une expression du gène *Ca4* dans l'utérus. De plus, cette protéine a été identifiée dans plusieurs protéomes de coquille (Mann *et al.* 2006, Marie *et al.* 2015b, Rose-Martel *et al.* 2015) et possède un domaine GPI-link lui permettant de se lier aux membranes (Hassan *et al.* 2013). Finalement, l'analyse d'immunofluorescence a confirmé la présence de cette protéine dans l'épithélium de l'utérus à tous les stades de la minéralisation. Par conséquent, **CA4** semble être le candidat le plus évident concernant l'apport des ions bicarbonates dans les vésicules extracellulaires.

La quatrième catégorie implique les gènes *Edil3* et *Mfge8*. Les protéines EDIL3 et MFGE8 avaient été proposées comme protéines d'adressage des vésicules extracellulaires lors du transport de l'ACC jusqu'au site de minéralisation (**Chapitre 1**). En effet, dans la coquille d'œuf, le minéral se forme sur des noyaux mamillaires qui correspondent aux sites de l'initiation de la minéralisation. Dans cette étude, l'analyse d'expression confirme une forte

expression du gène *Edil3* dans les segments responsables de la minéralisation alors que le gène *Mfge8* est fortement exprimé dans l'isthme rouge mais plus majoritairement dans le foie. Au niveau des analyses de western blots, les deux protéines ont été identifiées dans les vésicules extracellulaires. Toutefois, seule EDIL3 a été identifiée dans l'analyse protéomique sur les vésicules du fluide. Cette protéine a été localisée par immunofluorescence dans les cellules des glandes tubulaires de l'utérus durant toute la minéralisation, même si son signal décroît durant la phase de croissance rapide. Ainsi, le rôle de la protéine **EDIL3** dans l'adressage des vésicules sur le site de minéralisation semble plus évident que celui de la protéine MFGE8.

La dernière catégorie concerne les protéines qui pourraient stabiliser l'ACC. Concernant la stabilisation de l'ACC à l'intérieur des vésicules, deux hypothèses sont proposées.

La première hypothèse suggère que l'encapsulation de l'ACC dans les vésicules est suffisante pour assurer sa stabilisation, comme c'est le cas *in vitro* dans des liposomes (Tester *et al.* 2011, Ihli *et al.* 2014). En effet, dans des conditions d'encapsulation, l'ACC reste isolé du milieu aqueux permettant ainsi sa stabilisation (Ihli *et al.* 2014). De plus, les ions magnésium et phosphate sont également connus pour augmenter la stabilité de l'ACC (Rodriguez-Blanco *et al.* 2012, Alberic *et al.* 2018, Konrad *et al.* 2018). Ainsi, les conditions physico-chimiques des vésicules pourraient jouer un rôle clef dans la stabilisation de l'ACC.

La seconde hypothèse suggère que l'addition de molécules est nécessaire pour stabiliser l'ACC. Cette phase amorphe pourrait être stabilisée par des protéines présentes dans les vésicules du fluide. En effet, une étude précédente a montré que des composants de la matrice organique de l'oursin pourrait stabiliser l'ACC (Gong *et al.* 2012a). Dans notre précédente étude, les protéines **LYZ** et **OVA** avaient été proposées comme stabilisateur de l'ACC dans la vésicule. L'analyse protéomique sur les vésicules du fluide confirme la présence de **LYZ** et **OVAL** dans les vésicules. Or, en présence de LYZ du blanc d'œuf, une forme d'ACC métastable a précédemment été obtenue *in vitro* (Voinescu *et al.* 2007, Wang *et al.* 2009b). La capacité de stabilisation des formes instables de carbonate de calcium a également été démontrée *in vitro* pour la protéine OVAL (Pipich *et al.* 2008, Wang *et al.* 2009a, Wang *et al.* 2010). La présence de ces deux protéines pourrait permettre la stabilisation de l'ACC dans ce système.

Un tableau regroupant les candidats protéiques majeurs (identifiés dans cette étude) du transport vésiculaire de l'ACC durant la minéralisation de la coquille d'œuf de poule est proposé ci-après (**Tableau 4**).

Tableau 4. Acteurs moléculaires clefs du transport vésiculaire du minéral mis en évidence.

Fonctionnement général	Apport du calcium	Apport des bicarbonates	Stabilisation de l'ACC	Adressage des vésicules
PDCD6IP, Syntenin-1, Ezrin	ANXA1, ANXA2, ANXA8	CA4	LYZ, OVAL	EDIL3

3. Modèle global de l'apport des précurseurs minéraux durant la minéralisation de la coquille

Les différentes approches utilisées dans cette étude ont permis de valider le modèle du transport vésiculaire précédemment proposé pour la minéralisation de la coquille d'œuf de poule (**Chapitre 1**). Après avoir mis en évidence ce transport vésiculaire, un modèle global du transport des précurseurs minéraux des vaisseaux sanguins jusqu'au site de minéralisation a été dressé.

Les ions calcium et bicarbonate proviennent du sang. En effet, le CO_2 qui provient du sang serait hydraté en HCO_3^- par catalyse de l'anhydrase carbonique 2 (CA2) dans les cellules de l'utérus (Bernstein *et al.* 1968, Nys et Le Roy 2018). Les ions bicarbonates seraient aussi activement transférés dans les cellules utérines par les co-transporteurs (Na^+/HCO_3^-) SLC4A4, SLC4A5 et SLC4A10 (Nys et Le Roy 2018). Les ions bicarbonates seraient ensuite extrudés par les cellules utérines *via* l'échangeur (HCO_3^-/Cl^-) SLC26A9 (Brionne *et al.* 2014, Nys et Le Roy 2018). De manière complémentaire, l'anhydrase carbonique 4 (CA4) catalyserait l'hydratation du CO_2 contenu dans le fluide utérin pour fournir des ions bicarbonates (Nys et Le Roy 2018).

Au niveau de l'apport en calcium, 3 voies alternatives sont proposées dans le modèle global. La première voie est celle du transport transcellulaire. Cette voie a été décrite précédemment et ses acteurs moléculaires majeurs seraient les canaux calciques TRPV2, TRPV3 (entrée calcium dans la cellule utérine), calbindine-1 (acheminement du calcium dans la cellule), les échangeurs (Ca^{2+}/Na^+) SLC8A1, SLC8A3 et les pompes à calcium ATP2B1 et ATP2B2 (extrusion du calcium dans le fluide utérin) (Jonchere *et al.* 2012, Brionne *et al.* 2014, Nys et Le Roy 2018). La seconde voie concerne le transport paracellulaire. En effet, un transport paracellulaire a récemment été décrit dans l'intestin de la poule pondeuse (Gloux *et al.* 2019). Ce transport impliquerait des claudines, des occludines, des protéines TJP et des protéines JAM. Les données RNA-Seq (Gautron 2017a) suggèrent une potentielle implication de ce type de transport au niveau de l'utérus, pour fournir le calcium au fluide utérin. Toutefois,

le gradient de concentration dans l'utérus ne semble pas favorable à cette voie. La troisième voie concerne le transport vésiculaire de l'ACC mis en évidence dans notre étude. Dans cette dernière voie, les principaux acteurs moléculaires qui ont été mis en évidence dans notre étude sont les annexines, l'anhydrase carbonique 4, EDIL3, PDCD6IP, Syntenin-1 et Ezrin. Des protéines additionnelles (LYZ et OVAL) pourraient permettre la stabilisation de l'ACC dans ce mécanisme.

Conclusion

Cette étude a conduit à la mise en évidence d'un transport vésiculaire du carbonate de calcium amorphe durant la minéralisation de la coquille d'œuf de poule (Figure 9 de **l'article 2** présenté page 163 de ce manuscrit). C'est la première fois qu'un tel mécanisme est démontré dans un processus de biominéralisation carbonatée chez les vertébrés. L'identification des principaux acteurs moléculaires a permis de dresser un schéma qui résume ce mécanisme assurant la stabilisation et le transport spécifique de l'ACC. En outre, la validation de cette voie vésiculaire a conduit à l'élaboration d'un schéma global qui résume le transport des précurseurs minéraux des vaisseaux sanguins *via* l'utérus et le fluide utérin jusqu'au front de minéralisation. Ainsi, les 3 voies qui pourraient être employées pour fournir les précurseurs minéraux durant la minéralisation de la coquille seraient : la voie transcellulaire, la voie vésiculaire et potentiellement la voie paracellulaire. Ces 3 voies fourniraient les précurseurs minéraux nécessaires à la formation de la coquille afin que cette dernière obtienne une structure lui prodiguant ses propriétés remarquables.

A new model for avian shell biomineralization: vesicular transport ensures delivery of stabilized amorphous calcium carbonate

L. Stapane[1], N. Le Roy[1], J. Ezagal[1], A. B. Rodriguez-Navarro[2], V. Labas[3], L. Combes-Soia[3], M.T. Hincke[4], J. Gautron[1*]

[1]*BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France*

[2]*Departmento de Mineralogia y Petrologia, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain*

[3]*UMR PRC, INRA 85, CNRS 7247, Université de Tours, IFCE, 37380 Nouzilly, France*

[4]*Department of Innovation in Medical Education, and Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Ottawa, Ottawa, Canada K1H8M5.*

* Correspondence should be addressed to Joël Gautron: joel.gautron@inra.fr; Tel.+33 2 47 42 75 40

Competing interests

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Acknowledgements

The authors are grateful to the experimental unit (UE-PEAT) for the care of birds, to the GeT-GenoToul platform Toulouse for performing real time quantitative PCR with the Biomark Fluidigm system and to the Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada for electron microscopy and elemental analysis.

The authors acknowledge Pierre-Ivan Raynal and Sonia Georgeault from the IBiSA electron microscopy platform of the "Université François Rabelais" of Tours for their assistance.

The authors also acknowledge Nadine Gérard, Cindy Riou and Agostinho Alcantara-Neto from UMR "Physiologie de la Reproduction et des Comportements" (INRA Centre Val de Loire) for their help in extracellular vesicle isolation.

The authors wish to thank the Université François Rabelais de Tours and the Région Centre Val de Loire for financial support of Lilian Stapane's doctoral studies.

Abstract

In avian eggshell mineralization, amorphous calcium carbonate (ACC) is an unstable mineral phase which is progressively transformed into crystalline calcite, the calcium carbonate polymorph of the mature eggshell. Recently, we investigated the mechanism that provides stabilized ACC in chicken uterine fluid, and proposed a model of vesicular transport to transfer ACC to the mineralization site. In this work, we report further experimental evidence for this model. We observed exocytosis occurring at the apical plasma membrane of uterine cells, and moreover confirmed the presence of extracellular vesicles (EV) that contain ACC in uterine fluid, using electron microscopy and elemental analysis. We demonstrate that the oviduct segments where eggshell formation occurs display high levels of expression of vesicular markers. Proteomics and immunochemistry confirm the presence of major vesicular, mineralization-specific and eggshell matrix proteins (EDIL3, MFGE8, ANXA1, -2, -8, CA4, PDCD6IP, EZR and Syntenin-1) in the uterus and in purified EVs. We propose a comprehensive role for EVs in eggshell mineralization, in which annexins transfer calcium into vesicles and carbonic anhydrase 4 catalyzes the reversible hydration of CO_2 forming HCO_3^-, for accumulation of ACC in vesicles. We hypothesize that ACC is stabilized by ovalbumin and/or lysozyme or additional proteins identified in vesicles in this study. Finally, EDIL3 and MFGE8 are proposed to guide extracellular vesicles to the mineralization site. We therefore report for the first time experimental evidence for the components of vesicular transport to supply ACC during chicken eggshell biomineralization.

Keywords

Eggshell, biomineralization, extracellular vesicle, ACC transport, electron microscopy, calcium transport

Abbreviations

ACC, amorphous calcium carbonate; B, bone; BSA, bovine serum albumin, $CaCO_3$, calcium carbonate; Ca^{2+}, calcium; CO_2, carbon dioxide; D, duodenum; EDS, energy-dispersive X-ray spectroscopy; EELS, electron energy loss spectroscopy; EV, extracellular vesicle; HCO_3^-, bicarbonate; K, kidney; L, liver; Ma, magnum; O.C.T., optimal cutting temperature; PBS, phosphate buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; p.o., post-ovulation; RI, red isthmus; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction; SAED, selected area electron diffraction; SDS, sodium dodecyl sulfate; SEM, scanning electron microscopy; SEP, soluble eggshell proteins; TBS, tris buffered saline; TEM, transmission electron microscopy; UF, uterine fluid; Ut, uterus; WI, white isthmus.

Introduction

The avian eggshell is a biomineral barrier that allows appropriate development of the embryo within an autonomous chamber [1]. In addition to defense against physical aggression, the eggshell protects the egg contents against microbial contamination, regulates water and gaseous exchange, and provides calcium for embryonic bone calcification [2,3]. Eggshell formation occurs in the uterine segment of the hen oviduct and is one of the fastest processes of vertebrate biomineralization [4-6]. During this extracellular process, the uterine cells secrete organic and mineral eggshell precursors into the uterine fluid (UF) where mineralization takes place [7,8]. Previous studies have underlined the importance of amorphous calcium carbonate (ACC) in the calcification of calcium carbonate biominerals [9-12]. In several metazoan biomineralization processes, ACC is a transient mineral phase, which progressively transforms to crystalline calcium carbonate polymorphs (aragonite or calcite) [9,13,14]. ACC is a metastable polymorph of calcium carbonate, and can deliver ions required for rapid physiological biomineralization [15]. The high solubility of this transitory phase of calcium carbonate requires stabilization by regulatory molecules [9,16,17]. Extracellular vesicles (EVs) could play a role in ACC-mediated mineralization [12,18-20]. For example, *in vitro* data suggests that ACC nanoparticles can be stabilized within liposomes [21,22]. Additional studies have described the presence of EVs in invertebrate and vertebrate mineralizing systems such as sea urchin spines and mammalian bone/cartilage [13,23,24,25-32].

In chicken eggshell, the important role of ACC during mineralization has been described [23]. ACC aggregates are first massively deposited on the shell membranes and then transform into calcite during initial calcification of the mammillary knobs (organic cores where the primary nucleation occurs). ACC is also required at the mineralization edge during the overall eggshell calcification process, in order to provide material for the growth of columnar calcite crystals that constitute the palisade layer [23]. In a recent study, we proposed that extracellular vesicles budding from uterine cells into uterine fluid contain stabilized ACC for delivery to the mineralizing site in order to prevent non-specific mineralization in the uterine fluid [24].

In this study, we used microscopic techniques to investigate exocytosis activity at the plasma membrane of uterine cells that could be a source of EVs in the uterine fluid. We also verified the presence of ACC inside these EVs and quantified gene expression of a variety of validated EV components in the oviduct segments and other tissues. Finally, we purified EVs from UF and demonstrated the presence of key vesicular proteins in these vesicles. This experimental study is the first to demonstrate vesicular transport of amorphous calcium carbonate during chicken eggshell formation to support this rapid biomineralization process.

Material and methods

Ethical statement and housing

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, and were performed under the supervision of authorized scientists (authorization #7323, delivered by the French ministry of Education and Research). Birds were kept in the experimental unit PEAT 1295 of INRA, which has permission to rear birds and to perform euthanasia of experimental animals (decree N° B37-175-1 of August 28th 2012 delivered by the "Préfécture d'Indre et Loire" following inspection by the Direction of Veterinary Services). Our experimental protocol was approved by the 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 #16099-015902.

Mature brown egg-laying hens (ISA-Hendrix, 40 and 90 weeks old at sampling) were kept in individual cages furnished with automatic equipment for recording of the oviposition (egg-laying) times. Animals were fed layer mash *ad libitum* and exposed to a 14 h light / 10 h darkness cycle. Following collection and removal of egg contents, the eggshells were thoroughly washed with water, air dried and stored at -20°C.

Tissue and uterine fluid collection

Thirty-two brown laying hens (ISA-Hendrix, 26 and 6 at 40 and 90 weeks old, respectively) were sacrificed by lethal intravenous injection of Dolethal® (Vetoquinol, Magny-vernois, France) at either the initial phase of eggshell mineralization (5-7 h p.o.), the onset of the active mineralization phase (10 h p.o.) or during the linear growth phase of rapid mineralization (16-18 h p.o.).

For RT-PCR and Western blotting analyses, various tissues (Duodenum, D; Kidney, K; Liver, L) and oviduct regions (Magnum, Ma; White isthmus, WI; Red isthmus, RI and Uterus, Ut) were collected from 40 week old hens sacrificed at 10 h p.o., whereas mid-shaft tibial bones (B) were collected at 18 h p.o from 90 week old hens. Tissues were directly immersed in liquid nitrogen and then stored at -80 °C in cryo-tubes until RNA or protein extraction.

Small pieces of uterine wall (0.5 cm^2) were also sampled at 16 h p.o. from 40 week old hens for electron microscopy, and were fixed by incubation at room temperature for 24 h in 4% paraformaldehyde, 1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.3). Fixed tissues were stored at 4°C until preparation of sections.

For immunohistochemistry analysis, small pieces (2 cm x 0.4 cm) of the uterus at each stage (5 h, 6 h, 7 h, 10 h and 16 h p.o.), from 25 hens at 40 week old, were embedded in O.C.T. (Optimal cutting temperature) compound mounting medium for cryosectioning (VWR, Radnor, USA) using molds and direct immersion in isopentane cooled by liquid nitrogen. The blocks of O.C.T. containing uterus pieces were stored at -80 °C until cryosectioning.

UF was collected as previously described [7]. Briefly, egg expulsion was induced by injection of 50 µg prostaglandin-F2α in the alar vein of 40 week old hens, either at 9 h or 16 h p.o. Following egg expulsion, UF was collected directly by gravity in a plastic tube placed at the entrance of the everted vagina. A portion of the fluid was promptly pipetted and deposited in liquid nitrogen to obtain 50 µL beads of uterine fluid for storage at -80 °C until use for electron microcopy. The remaining UF was diluted in phosphate buffered saline (PBS, 4 v: 1 v) in cryotubes maintained on ice and immediately used for extracellular vesicle isolation.

Gene expression

Total RNA was extracted from tissues harvested at 10 h p.o. (except bone, which was extracted at 18 h p.o.), and treated as previously described [24]. Briefly, the concentration of each RNA sample was measured at 260 nm with NanoDrop™ and their integrity was assessed on 1.5 % agarose gels. Total RNA samples (1 µg) were reverse-transcribed using RNase H-MMLV reverse transcriptase (Superscript II, Invitrogen, Carlsbad, USA) and Oligo (dT)™ primers (Invitrogen, Carlsbad, USA). Primers for the *Edil3*, *Mfge8*, *Ca4*, the 31 vesicular genes and the eight housekeeping genes (*B2m, Eif3i, Gapdh, Gusb, Stag2, Tbp, Sdha*, and *Ppia*) were designed from *Gallus gallus* gene sequences (Online Resource 1), using Primer-BLAST on National Center for Biotechnology Information (NCBI), and were synthesized (Eurogentec, Lièges, Belgium). Primer efficiencies were evaluated by RT-qPCR using LightCycler® 480 SYBR Green I Master and LightCycler® 480 instrument II (Roche, Bâle, Switzerland). Gene expression was quantified using the Biomark microfluidic system, in which every sample-gene combination is quantified using a 96.96 Dynamic Array™ IFCs (BMK-M-96.96, Fluidigm®, San Francisco, USA) at the GeT-GenoToul platform (Toulouse, France). Samples were pre-amplified according to the manufacturer's specifications. PCR was then performed using the following thermal protocols: Thermal Mix (50 °C, 2 min; 70 °C, 30 min; 25 °C, 10 min), Hot Start (50 °C, 2 min; 95 °C, 10 min), 35 PCR cycles (95 °C, 15 s; 60 °C, 60 s), and Melting Analysis (60 °C, 30 s; 95 °C, 1 °C/3 s). Real time quantitative PCR results were analyzed using Fluidigm Real-time PCR analysis software v.4.1.3 (https://www.fluidigm.com/software). Six biological replicates and two technical replicates were carried out for each tissue. GenNorm software (https://genorm.cmgg.be/) was used for validation of housekeeping gene stability. The normalized quantities were calculated using the following formula:

(gene efficiency $^{(ctcalibrateur-ctsample)}$)/geometric average quantity of the eight housekeeping genes. Normalized quantities were compared between various measured tissues and oviduct segments using one-way ANOVA followed by Tukey pairwise test analysis on Minitab® 18 software (http://www.minitab.com/fr-fr/). A p-value < 0.05 was selected as the threshold for significance between different groups. The heatmap of the gene expression levels (Row-Z score) in different tissues for *Edil3*, *Mfge8* and the 31 vesicular genes was computed using the heatmap.2 function from gplots packages of Rstudio software 1.1.456 (https://www.rstudio.com/). Row and column clustering were performed using pearson-ward.D2 methods and spearman-Ward.D2 methods, respectively.

The *Ca4* mRNA was amplified by end-point PCR in each oviduct segment and tissues using DreamTaq PCR Master Mix 2X (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) and Mastercycler gradient (Eppendorf, Hambourg, Germany). After 3 min of denaturation, 35 cycles were used (95 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 30 s) to amplify PCR products, followed by a final elongation for 15 min. PCR products were then mixed with Trackit cyan/orange Loading buffer 6 X (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA), loaded on a 2.5 % agarose gel and migrated for 30 min at 100 V using the Mupid-One electrophoresis system (Dominique Dutscher, Issy-les-mouligneaux, France). The Trackit 100-bp DNA ladder was used (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) to determine the size of PCR products. Imaging was performed using the Syngene GeneGenius Gel Light Imaging System (Syngene, Cambridge, UK).

Extracellular vesicle isolation from uterine fluid and extraction of soluble eggshell matrix proteins

EVs were isolated from uterine fluid harvested at 9 h and 16 h p.o., using previously described methodology [25]. Briefly, UF diluted in PBS was centrifuged at 100 x g for 15 min and then at 12, 000 x g for 15 min to remove cell debris. Two successive ultracentrifugation steps at 100, 000 x g (Beckman Coulter L8-70M, Beckman, Fullerton, USA) were then performed during 90 min to pellet the EVs. Aliquots of the supernatants corresponding to UF without EVs were sampled and stored at -20 °C. The pellet was suspended in 50 µL of PBS and stored at -20° C until transmission electron microscopy (TEM), nanoLC-MS/MS and Western blot analysis.

Soluble eggshell proteins (SEP) from normally laid eggs were extracted as previously detailed [26]. Briefly, eggshell pieces with eggshell membranes were immersed in 154 mM NaCl containing protease inhibitors (2.5 mM benzamidine-HCl, 50 mM ε-amino-n-caproic acid, 0.5 mM N-ethymaleimide, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride), and then ground into a fine powder. Eggshell powders were fully demineralized by immersion in 20 % acetic acid, and the resulting suspensions were dialyzed (cut off 3,500 Da; dialysis membrane Spectra/Por™,

ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) against demineralized water for 24 h at 4 °C and lyophilized. Powdered samples were incubated overnight at 4 °C in 4 M guanidine-HCl, 5 mM benzamidine-HCl, 0.1 M ε-amino-n-caproic acid, 10 mM EDTA, 50 mM sodium acetate and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and then dialyzed (cut off 3, 500 Da) against 0.5 M sodium acetate pH 7.4 for 24 h at 4 °C, followed by centrifugation at 2, 000 x g for 10 min at 4 °C. The resulting SEP (supernatants) were stored at −20 °C.

Electrophoresis and Western blot analyses

Protein concentrations were determined using the BioRad DC Protein Assay kit II (BioRad, Marnes-la Coquette, France) in accordance with manufacturer's instructions and using bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) as standard. Fifteen micrograms of each sample were diluted into Laemmli sample buffer (5v:1v) and boiled for 5 min. Protein samples were then separated on 12 % polyacrylamide gels (Mini-Protean II electrophoresis cell, BioRad, Marnes-la-Coquette, France) and transferred to 0.2 µm nitrocellulose blotting membrane (GE Healthcare, Little Chalfont, England) for Western blot analysis. Briefly, membranes were washed 5 min in Tris buffered saline (TBS; 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4), blocked with the Odyssey® blocking buffer (LI-COR, Bad Homburg, Germany) in TBS (1v:1v), and then incubated for 3 h in the blocking solution (Odyssey® blocking buffer 1v: TBS 1v) containing 0.1% Tween-20 and anti-EDIL3 (1: 1, 000) or anti-MFGE8 antibodies (1: 1, 000) (Online Resource 2). Membranes were sequentially washed for 5 min in TBS, 0.1 % Tween-20, and then incubated for 1 h in the blocking solution containing 0.1 % Tween-20 and AlexaFluor® 680 goat anti-rabbit (H+L) secondary antibody (1: 20, 000; ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) (Online Resource 2). Finally, membranes were washed three times in TBS containing 0.1 % Tween-20 and twice in TBS. Immuno-reactive bands were revealed using the Odyssey® imaging system (LI-COR, Bad Homburg, Germany) at 700 nm.

Uterine Immunofluorescence

Serial sections (10 µm) were prepared from uterus embedded in O.C.T. (harvested at 5 h, 6 h, 7 h, 10 h and 16 h p.o.) using the CM3050 S cryostat (Leica, Wetzlar, Germany). Sections (stored at -80 °C until use) were thawed for 30 min at room temperature and rehydrated during 5 min in 1X PBS before immunolabeling. The blocking step was performed with 1X PBS, 3 % BSA for 20 min at room temperature. Sections were then incubated in 1X PBS, 3 % BSA with diluted primary antibodies (anti-ANXA1, anti-ANXA2, anti-ANXA8, anti-CA4, anti-EDIL3 or anti-PDCD6IP, Online Resource 2). Sections were washed 3 times at room temperature for 5 min in 1X PBS. Negative controls were prepared without primary antibody. Sections were washed 3 times for 5 min at room

temperature in 1X PBS. Then, according to the primary antibody, sections were incubated with either goat anti-rabbit secondary antibody (IgG, H+L), AlexaFluor® 488 (1: 1, 000; ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) or goat anti-mouse IgG1 cross-adsorbed secondary antibody, AlexaFluor® 555 (1: 1, 000; ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) (Online Resource 2) in 1X PBS, 1 % BSA for 1 h at room temperature. All immunolabeling was performed on duplicate sections. Sections were washed three times for 5 min at room temperature and then mounted using Fluoroshield™ with DAPI histology mounting medium (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Sections were observed with Axioplan II Fluorescence Microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) and images were acquired using an INFINITY microscope camera (Lumenera, Nepean, Canada).

Proteomics analysis of uterine fluid extracellular vesicles

Sixty micrograms of purified EVs resuspended in PBS were diluted into 2 % SDS Laemmli sample buffer (5v:1v) and boiled for 5 min. EV proteins were electrophoresed on a 12.5 % polyacrylamide gel (50V, 30 min) to obtain a single band (Mini-Protean II electrophoresis cell, BioRad, Marnes-la-Coquette, France). The gel was stained with Coommassie Blue and the single band of proteins was excised and subjected to in-gel digestion with bovine trypsin (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) as previously described by Marie *et al.* for analysis by nanoscale liquid chromatography–tandem mass spectrometry (nanoLC–MS/MS) [27]. MS/MS ion searches were performed using Mascot search engine version 2.6 (Matrix Science, London, UK) *via* Proteome Discoverer 2.1 software (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) against the NCBIprot_chordata database (July 2018). The search parameters included trypsin as a protease with two allowed missed cleavages, carbamidomethylcysteine, methionine oxidation and acetylation of protein N-termini 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 subjected to Scaffold software (v 4.8.8, Proteome Software, Portland, USA) using the protein cluster analysis option (assemblage of proteins into clusters based on shared peptide evidence). Peptide and protein identifications were accepted if they could be established at greater than 95.0 % probability as specified by the Peptide Prophet algorithm and by the Protein Prophet algorithm, respectively. Protein identifications were accepted if they contained at least two identified peptide.

Transmission electron microscopy and electron energy loss spectroscopy analyses of uterine fluid

Frozen beads of UF harvested at 16 h p.o were deposited on a Ni electron microscope grid and dried for 1 min. Excess UF was then absorbed with filter paper and the grid was immediately observed with the TEM-ZEISS LIBRA 120 instrument (ZEISS, Oberkochen, Germany). EVs were localized under the TEM and electron energy

loss spectroscopy (EELS) spectra from 270 to 410 eV and from 460 to 600 eV were acquired (Online Resource 3). Mapping of elemental calcium (345-355 eV) and carbon (280-290 eV) were performed to determine the presence and organization of $CaCO_3$ and organic phase carbon in EVs.

Transmission electron microscopy and energy-dispersive X-ray spectroscopy analyses of uterus and uterine fluid

Fixed pieces of uterus were washed in PBS and post-fixed by incubation with 2 % osmium tetroxide for 1 h. Samples were then fully dehydrated in a graded series of ethanol solutions and embedded in Epon resin, which was polymerized by heating from 37 °C to 60 °C. Ultra-thin sections (50–70 nm thick) of these blocks were obtained with a LEICA Ultracut UCT ultramicrotome (Leica, Wetzlar, Germany). Sections were stained with 5 % uranyl acetate, 5 % lead citrate and observations were made with a TEM-1400 Plus electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan).

UF harvested at 16 h p.o. and stored as frozen beads, was deposited on a Ni electron microscope grid (C coated) and then dried for 1 min. Excess UF was then absorbed with filter paper, stained with uranyl acetate 2 % and the grid was immediately observed with a TEM-1400 Plus electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan). EVs were observed under the TEM (BF/DF detector) and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS; Oxford 65 mm^2 detector) analysis was performed on EVs in order to detect elemental calcium, carbon and oxygen (AZtec software). Selected area electron diffraction (SAED) analysis was also carried out to determine the crystalline phase of minerals observed in EVs.

Results

Transmission electron microscopy of uterine epithelial cells and uterine fluid

The presence of vesicles in the tissues and milieu involved in shell mineralization was investigated by transmission electron microscopy (TEM) on the uterine epithelium cells. Ultra-thin negatively stained sections of uterus were examined by TEM to investigate exocytosis activity adjacent to the luminal site of mineralization (Fig. 1). Uterine ciliated cells possess numerous vacuolar and vesicular structures as well as dense and light granules (Fig. 1a). At higher magnification (Fig. 1b-d) we observed vesicles in the cell cytoplasm, their accumulation at the apical plasma membrane, and their budding to generate EVs in the adjacent luminal uterine fluid (Fig. 1c-d). Fig. 1e and f, show EVs in the uterine fluid. The vesicle diameters were in the 100-400 nm range. Vesicle membranes appeared electron-dense compared to their internal regions. This density is due to organic material comprising the

membranes (glycoproteins, proteins, lipids …) which was stained by uranyl acetate. However, some internal regions also appeared electron-dense. These TEM observations demonstrated the presence of vesicles in uterine fluid adjacent to the apical region of uterine cells. The uterine epithelium contains ciliated and non-ciliated cells, and the same results were observed in proximity to non-ciliated cells (data not shown). UF was also subjected to TEM analysis (Fig. 2 and 3), where numerous EVs varying in size from 100 to 500 nm were observed (Fig. 2a, c and Fig. 3a).

Elemental analysis to study chemical components of extracellular vesicles

At collection, uterine fluid was immediately frozen in liquid nitrogen in order to preserve EVs and their cargo. The elemental composition of the vesicular constituents was examined using electron energy loss spectroscopy (EELS, Fig. 2), and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS, Fig. 3).

Using EELS, peaks from the carbon-K-edge (285.0 eV, 290.3 eV, 295.5 eV and 301.5 eV) and calcium L-2, 3-edge (349.3 eV and 352.6 eV) were detected (Fig. 2b, Online Resource 3). All peaks, except 285.0 eV, are specific to $CaCO_3$ [28]. The analysis also revealed a major oxygen K-edge peak at 540.0 eV, which is also specific to the carbonate CO_3^{2-} group (Fig. 2d, Online Resource 3) [28]. The energy loss graphs therefore revealed an elemental pattern specific to $CaCO_3$ mineral [23,29]. Moreover, the 285.0 eV peak from the carbon K-edge indicated the presence of the C=C bond and the two peaks from the oxygen K-edge (534.0 eV and 545.5 eV) are specific to the C=O bond [28]. These data therefore confirm the presence of an organic phase (phospholipids and proteins) as well as calcium carbonate in the uterine EVs. These data were extended by elemental analysis with mapping of the carbon (237-290 eV) and calcium (324-355 eV) signals (Fig. 2e-h). These results showed a calcium signal inside the EVs (Fig. 2f), whereas a carbon signal, specific to the organic phase (C=C), was visualized at the vesicle periphery (Fig. 2g). Merger of the carbon and calcium maps (Fig. 2h) clearly shows that the EV membranes (phospholipid and proteins) enclose the calcium signal.

The EELS results were confirmed using energy-dispersive X-ray spectroscopic (EDS) analysis on the uterine fluid EVs (Fig. 3). Oxygen, carbon and calcium elements co-localized within EVs (Fig. 3a-d). A high background signal is notable for carbon because of the use of carbon grids. The difference between EDS spectrum 1 (EV), spectrum 2 (EV) and spectrum 3 (background) confirmed the presence of significant calcium and oxygen amounts inside EVs, compared to the background signal (Fig. 3e). Indeed, calcium and oxygen signals displayed 3- and 5-fold increases in EV locations (spectrum 1), compared to the background signal (spectrum 3), respectively. The question arises regarding the form of calcium carbonate which is inside the vesicles. In order to identify the mineral

phase in EV, we carried out selected area electron diffraction on EVs observed in UF (Fig. 3f, g). We detected diffuse continuous rings indicating that the calcium carbonate present inside vesicles was amorphous, similar in nature to the ACC identified during eggshell formation [23].

Vesicular gene expression in various* Gallus gallus *tissues

We evaluated the literature on bone and cartilage extracellular vesicles [30-33], EVs [34-37], and the Vesiclepedia database (www.microvesicles.org/), which lists the top 100 proteins that are identified in EVs [38]. A total of 33 genes coding for proteins involved in vesicular transport were selected, corresponding to proteins involved as calcium channels to supply calcium, bicarbonate supplier/transporter, chaperone molecules, addressing molecules, intracellular trafficking proteins, extracellular biogenesis and release, and signaling proteins (Online Resource 4). Expression levels for these 33 genes were quantified in different tissues and organs, namely oviduct segments, bone, duodenum, kidney and liver (Table 1, Fig. 4). The oviduct is the reproductive tract, where the forming egg transits as it progressively acquires specific egg compartments. The egg white components and eggshell membrane precursors are secreted and deposited in the magnum (Ma) and white isthmus (WI) segments, respectively, while the red isthmus (RI) and uterus (Ut) are involved in the onset and the development of shell mineralization. Tissue samples from these four specialized oviduct regions were collected to evaluate expression of EV markers associated with egg white deposition (Ma), eggshell membrane formation (WI), and shell calcification (RI, Ut). Bone was selected as a mineralized tissue (hydroxyapatite) where EVs have been demonstrated [30,31,39,40]. Duodenum (D) and kidney (K) exhibit active ion transport activity without any associated calcification. Finally, liver (L) was selected as an important organ involved in general metabolism. Comparisons of quantified gene expression in these organs and tissues were displayed using a heatmap diagram (Fig. 4). Z-scores are expressed in terms of standard deviations from their means for each genes. Consequently the color indicates an intuitive idea of the relative variation of each gene in the different tissues. We observed the highest Z-scores in oviduct segments (Ma, WI, RI, Ut), for 20 vesicular genes (*Anxa1, Anxa2, Anxa8, Ap1g1, Cd9, Cd82, Edil3, Hspa8, Itgb1, Pdcd6ip, Rab5a, Rab27a, Sdcbp, Tsg101, Vamp3, Vamp7, Vps4, Vps26a,Ywhah* and *Ywhaz)* compared to the other tissues (Clusters 6 to 8, Fig. 4). Expression of genes was also analyzed using ANOVA and Tukey pairwise analysis (Table 1). With the notable exception of *Ap1g1,* all other genes with highest Z-scores in uterus, were also significantly different in the same uterine tissue using ANOVA and pairwise analysis (Table 1). Additionally, these statistical tests show that *Itgb1, Sdcbp, Vamp7, Vps4b* were also significantly over-expressed in to one or several other tissues (bone, kidney, and duodenum). *Anxa5, Anxa11, Ap1g1, Hsp90b* and *Rab7a* were not differentially expressed in the various tissues tested. Both *Rab11a* and *Slc4a7* were significantly over-expressed in duodenum, while *Ca2*

and *Anxa7* were significantly over-expressed in bone and kidney respectively to other tissues. *Arf6* exhibited a significant higher expression in duodenum and uterus. In this test, different letters are used for statically significant different level of expression. Analysis of the remaining three genes *Anxa6, Ralb,* and *Vcp* reported most of commons letters indicating not significantly different expression for these genes (Table 1).

Proteomic and Western blot analyses of EVs

To determine the protein composition of EVs isolated from the UF, we carried out proteomics analysis using nanoLC-MS/MS and verified these observations with Western blotting techniques. Twenty nine non-redundant proteins were identified in our proteomics analysis (Table 2 and Online Resource 5). Amongst them, seven proteins correspond to predicted major actors in the hypothetical vesicular transport of ACC (CA4, EDIL3, Ezrin, PDCD6IP, Syntenin-1, OVA and Lysozyme C; Table 2 and 3) [24]. In addition, several immunoglobulins and other proteins already identified in chicken eggshell matrix (OVOT, OVALX, OVALY, OCX25, CLU, MUC, VMO1, OVST, OVOG2, PROM1, A2M, AMPN) were detected (Table 2). Finally, the protein ACE, previously reported from egg white proteome was also identified.

To confirm EDIL3 proteomic identification, we performed Western blot analysis on various samples: unfractioned UF (pure), EV fraction of UF (EV fraction), depleted UF (ØEV) and soluble eggshell proteins (SEP) (Fig. 5). We also carried out immunoblotting for MFGE8, since it is another protein potentially involved in guiding EVs during shell mineralization. Immunoreactive bands in the vesicle fractions were observed using both antibodies (anti-EDIL3 and anti-MFGE8). Using anti-EDIL3 antibodies, a unique immunoband was observed around 60-kDa (54-kDa predicted molecular weight), only in the EV fraction and SEP (Fig. 5a). MFGE8 exhibited a single band around 75-kDa (53-kDa predicted molecular weight) in all samples (Fig. 5b). An immunoband was still visible in uterine fluid without vesicles, indicating that this protein could also be present out of EV in uterine fluid.

Immunofluorescence in uterus for key proteins proposed for UF vesicular transport

Immunofluorescence analysis was performed on chicken uterus sections to localize six proteins (ANXA1, ANXA2, ANXA8, CA4, EDIL3, PDCD6IP) proposed to play key roles in vesicular transport within the tissue responsible for eggshell mineralization (Fig. 6). Analyses were performed at five defined time points in the eggshell mineralization process (5 h, 6 h, 7 h, 10 h and 16 h p.o.). Negative controls demonstrated the absence of nonspecific signals in uterus for all antibodies. According to immunofluorescence observations, EDIL3 and ANXA1 protein levels were maximum at 5 h and 6 h p.o., and then decreased from 7 h to 16 h p.o. (Fig. 6). EDIL3 is synthesized in the tubular glands of the lamina propria, whereas ANXA1 was localized in the epithelium. A

faint immunostaining was obtained for ANXA2 at 5 h p.o., while the signal was stronger at 6 h, 7 h and 10 h p.o. in the epithelium (Fig. 6), then decreased at 16 h p.o.. ANXA8 was detected in both tubular glands and epithelium regions at each stage of mineralization, with a maximum signal at 10 h p.o. (Fig. 6). A strong CA4 signal was observed in the epithelial cells at 5 h, 6 h and 7 h p.o. while the signal was low at 16 h p.o.. PDCD6IP immunofluorescence revealed that the protein was largely localized in the epithelium throughout the biomineralization process (5 h to 16 h p.o.) (Fig. 6).

Discussion

Avian eggshell mineralization is one of the fastest known biomineralization processes [4,5]. In chicken, five to six g of calcium carbonate are deposited within an 18 hours period. This requires large amounts of $CaCO_3$, as the laying hen exports 10 % of its total body calcium (2 g) each day [41]. Neither component (Ca^{2+} or HCO_3^-) is stored in the uterus, but rather are continuously supplied during eggshell formation from the blood plasma *via* transport across the uterine glandular cell. Mechanisms of transepithelial transfer of calcium and bicarbonates have been widely studied and represent the current accepted model for eggshell mineralization [8,41,42]. Recently, intestinal paracellular transfer of calcium during eggshell formation was demonstrated [43], raising the possibility of paracellular transfer of calcium in uterus as well, even if no experimental data is yet available. The vesicular transport of calcium is an alternative pathway to transfer the necessary ions to the mineralization site. Studies related to vesicular transport during biomineralization have been reported in both invertebrate and vertebrate systems. Sea urchin spicules are the best documented example of invertebrate calcite biomineralization mediated by vesicles [12,44]. The involvement of vesicles was also proposed for molluscan shell formation [18] and corals [19]. Finally, the most documented vesicular mediated mineralization systems are in vertebrate skeleton and teeth, for which vesicles associated with calcium phosphate have been described [39,40,45]. In this study, we describe the first vertebrate example of vesicular mediated transport for calcium carbonate biomineralization.

Shell calcification, which takes place in a saturated milieu (uterine fluid) [46], is not non-specific precipitation and occurs after ACC has accumulated on the eggshell membranes [23]. We have proposed a novel model for avian eggshell biomineralization involving EVs budding from uterine epithelial cells, to transit through the uterine fluid and to deliver stabilized ACC to the eggshell membranes and subsequent mineralization front, which avoids its non-specific precipitation in the fluid [24]. We report here experimental evidence, which demonstrates the presence of EVs containing ACC in uterine fluid, and we define some of the molecular actors involved in this process (Fig. 7). EVs were initially thought to be waste disposal units for cells, but they have been isolated from

many biological fluids; recent reviews highlight their biological significance for intercellular communication and their roles during pathological conditions [47-52]. EVs have been categorized as exosomes (30-150 nm) released by multivesicular exocytosis, apoptotic bodies (50-5000 nm) released at the later stages of cell apoptosis, and shedding microvesicles or ectosomes (100-1000 nm) secreted by outward budding of the plasma membrane [53]. In this study, we observed vesicles from 100 to 500 nm in the uterine cell cytoplasm and their accumulation at the apical membranes. We also observed budding from uterine cells to secrete these vesicles into uterine fluid. The size of vesicles observed in both fluid and uterine cells, and their outward budding, confirmed that extracellular vesicles are present in uterus and that extracellular vesicles are ectosomes. These observations are coherent with our previous study in which we propose that EDIL3 and MFGE8 act as vesicle guidance molecules [24]. Secretory activity has been described at the hen utero-vaginal junction, where spermatozoa are preserved in specialized glands; exocytosis and luminal vesicles were observed [54].

This study also gives new important insight on the stabilization and delivery of ACC to the mineralization site where the final structure of eggshell is completed. The avian eggshell is a highly ordered structure, consisting of a porous bioceramic resulting from the sequential deposition of calcium carbonate and organic matrix in the red isthmus/uterus regions of the distal oviduct; this process has been widely described [3,5,55-58]. ACC plays a central role in the different phases of shell calcification [23]. Metastable ACC is first deposited and accumulates over the entire eggshell membrane (5 h p.o.), followed by a rapid redistribution of ACC at specific nucleation sites (mammillary knobs) on the eggshell membranes with transformation to form calcite aggregates. Calcite aggregates then ripen into larger calcite crystals to form the mammillary layer, followed by the development of columns of crystals with a preferred orientation perpendicular to the surface to form the compact palisade layer. This rapid deposition of mineral requires a supply of ACC at the mineralization edge [23], until the process is inhibited (22 h p.o.), and the organic cuticle is deposited on the surface of the calcified shell (22-24 h p.o.) [5,56]. Finally, the egg is expulsed about 24 hours after the initial ovulation. Eggshell mineralization therefore results from the assembly of aggregated ACC particles and their transformation into calcite crystals to allow a very fast controlled process during the various steps of shell calcification. Additionally, ACC, which is highly unstable under physiological conditions, must be stabilised in this milieu. We have hypothesized that vesicles would allow the transportation of calcium carbonate in amorphous form to the mineralization site where ACC could serve as a precursor phase of calcite [24]. We performed both EELS and EDS spectroscopy to analyze the elemental composition of extracellular vesicles. Both methods detected calcium, oxygen and carbon inside EVs. Additionally, the carbon K-edge peaks detected using EELS are specific for the elemental pattern of calcium

carbonate. In order to detect the nature of the calcium carbonate form, we also performed electron diffraction on vesicles containing calcium carbonate. No diffraction circles specific for crystalline polymorphs were detected, confirming that calcium carbonate inside EVs was of an amorphous nature. Intracellular vesicles containing ACC were previously observed inside sea urchin epithelial cells [12,59,60]. Amorphous calcium phosphate (ACP) has been observed inside intracellular vesicles in embryonic mouse osteoblasts [61]. Extracellular vesicles with mineral were also reported for embryonic chick femur [62] and growth plate cartilage of chicken [63,64]. Based on these observations, we hypothesize that ACC is packaged inside vesicles when they are formed within the uterine cells. In other biomineralization models, it is known that intracellular calcium is stored in the endoplasmic reticulum and mitochondria [65]. Calcium containing-vesicles could therefore originated from these organelles in the hen uterus, where calcium might be sequestered in vesicles.

The experimental evidence from this study is summarized in a diagram of ACC vesicular transport to the mineralizing site, in which the main identified vesicular actors are incorporated (Fig. 7). We investigated genes involved in ion accumulation / mineral transport by EVs. They included annexins, which can function as calcium channels [66-69], to enable uptake of the calcium ions required for intravesicular ACC formation. Three of them (*Anxa1*, *-2* and *-8*), exhibited a high expression where eggshell calcification takes place (Ut and RI) (Fig. 8a). We also reported in this study that ANXA1, -2 and -8 proteins were also observed in uterine tissue and were found to be overabundant at the initial phase of shell mineralization (5 to 10 h p.o.), compared to later stages. Additionally, ANXA1 [8,70], ANXA2 [8,42,71-73] and ANXA8 [70,73] have already been reported in chicken eggshell proteomic and transcriptomic surveys [70]. ANXA1, ANXA2 and ANXA8, exhibit phospholipid-binding domain, and consequently could bind to EV membrane [74]. These three annexins constituted therefore, robust candidates for participants in vesicular transport, where they could mediate the entry and accumulation of calcium.

Bicarbonate is a precursor for the calcium carbonate of avian eggshells, and consequently we investigated carbonic anhydrase 2 (CA2) and sodium bicarbonate cotransporter 3 (SLC4A7), as bicarbonate suppliers in vesicular transport. Carbonic anhydrases (CAs) are metallo-enzymes, which catalyze the reversible hydration of CO_2 into HCO_3^- [75,76]. The carbonic anhydrase superfamily consists of 16 isozymes in mammals [77] and 14 in chicken (https://www.ensembl.org/index.html). From this list, we investigated the level of expression of *Ca2* because of its high expression in chicken uterine cells during eggshell calcification [42] (https://anr.fr/Projet-ANR-13-BSV6-0007). Moreover, its encoded protein is the most abundant among the CAs present in hen eggshell proteome, which was previously reported in matrix vesicles isolated from the epiphyseal growth plate cartilage of rat [71,78].

SLC4A7 is a sodium bicarbonate cotransporter containing transmembrane domains (https://www.uniprot.org/), which was identified in matrix vesicles released from mineralizing human osteoblast-like cells [33]. Its gene was reported in chicken uterine RNA-Seq (https://anr.fr/Projet-ANR-13-BSV6-0007). We also investigated its expression in the oviduct segments. In our study, neither gene was significantly overexpressed in tissues where the shell is mineralized (RI and Ut). We therefore investigated carbonic anhydrase 4 (CA4), which was previously identified in chicken eggshell proteomes [70,71,79]. In order to confirm its presence in tissues involved in shell mineralization, *Ca4* expression was also measured in the various tissues and organs using end-point RT-PCR (Fig. 8b). *Ca4* was expressed in duodenum, kidney and magnum, in addition to Ut where eggshell calcification occurs. The presence of CA4 protein in the uterine epithelial cells was confirmed by immunofluorescence, and was overabundant at the onset of shell calcification compared to later stages. Finally, proteomic analysis of purified UF EVs confirmed that CA4 is present in vesicles. CA4 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked protein [75], suggesting that this protein could be anchored to the outside of vesicle membranes. The CA4-catalysed accumulation of high levels of bicarbonate in proximity to the vesicular stores of Ca would promote the formation of intravesicular ACC.

In this study, we quantified the expression of numerous additional vesicle markers within uterine epithelial cells. Among the 20 vesicular genes highly expressed in RI and Ut, seven encode for proteins ranked in the Top 100 of EV protein markers by Vesiclepedia (Online Resource 4). These seven proteins encoded by *Pdcd6ip*, *Hspa8, Anxa2, Ywhaz, Sdcbp, Tsg101* and *Anxa1* are respectively reported to rank 1st, 3rd, 5th, 13th, 19th, 39th and 43th by Vesiclepedia [38]. These seven proteins were previously reported as constituents of the avian eggshell proteome (Online Resource 4) [27,70-73,80-88]. Moreover, 12 vesicular genes (*Anxa1, Anxa2, Cd82, Edil3, Hspa8, Pdcd6ip, Rab5a, Sdcbp, Tsg101, Vamp7, Ywhah* and *Ywhaz*) encode proteins previously detected in exosomes or matrix vesicles of bone cells, mineralizing cartilage or articular cartilage (Online Resource 4) [30-33,89]. The 20 genes reported as highly expressed in the oviduct region responsible for eggshell mineralization encode proteins that have been incorporated into our eggshell vesicular transport model (Fig. 7; Online Resource 4). Some are involved in the general functioning of EVs such as vesicle formation and/or trafficking. Indeed, the genes *Pdcd6ip, Sdcbp, Tsg101, and Vps26a* encode proteins involved in the biogenesis of EVs [31,34-37]. Proteins encoded by *Rab5a, Rab27a, Vamp7, Vamp3 and Vps4b* participate in membrane fusion / vesicle release [31,34,35,37]. *Yhwah* and *Ywhaz* encode signaling proteins [31], while *Hspa8* and *Cd82* encode chaperone and membrane organizer proteins, respectively [31,35,37]. Our proteomics analysis also confirmed the presence of PDCD6IP and Syntenin-1 (*Sdcbp*) in purified vesicles (Table 2 and 3). Syntenin-1 (*Sdcbp*) is a signaling protein and a biogenesis factor

described as an extracellular vesicles marker in Vesiclepedia (http://microvesicles.org/extracellular_vesicle_markers). In addition, immunofluorescence for PDCD6IP revealed its presence at each stage and at higher levels during the earliest stage. PDCD6IP is a biogenesis factor for EVs, and is the most frequently reported extracellular vesicles marker (Vesiclepedia). Ezrin is another common EV marker, which is involved in plasma membrane/cytoskeleton cross-linkage during vesicle formation [38,90]; it is present in uterine fluid EVs (Table 3). The biogenesis factor, Syntenin-1 (*Sdcbp*) and Ezrin could be attached to EV membrane *via* their phosphatidylinositol 4, 5 bisphosphate-binding site (Table 3). These results are also supported by previous identification of PDCD6IP, Syntenin-1, Ezrin in bone and cartilage EVs [30-32].

In our previous study, we underlined the major role of EDIL3 and MFGE8 as proteins predicted to target vesicles containing ACC cargo to the mineralization site [24]. EDIL3 and MFGE8 are the sixth and 34th most abundant eggshell proteins, respectively [71]. EDIL3 was previously identified in the proteome of cartilage EVs [32]. We have previously reported that *Edil3* is overexpressed in the oviduct region where eggshell mineralization takes place (Ut), compared to other oviduct segments or tissues [24]. In this study, EDIL3 was identified in the proteomic analysis of purified EVs (Table 2, 3 and Online Resource 5). Using Western blotting, we demonstrated that EDIL3 is only present in the EV fraction of uterine fluid, confirming that this protein is vesicle specific (Fig. 5a). EDIL3 is synthesized by the tubular glands of the uterus (Fig. 6) and could bind to vesicles *via* its phosphatidylserine-binding functionality. In addition, EDIL3 was more abundant during the initiation of mineralization (5-10 h p.o., Fig. 6) [71]. Concerning MFGE8, which is paralogous to EDIL3, we observe a high expression of its mRNA in RI compared to other tissues; only liver exhibits a higher expression, as already reported [24]. MFGE8 was not detected in our proteomic analysis of EVs, although Western blotting revealed its presence in UF and to a lesser extend in EVs. Altogether, these results strongly suggest that EDIL3 is a key protein in EVs transport at the initiation stage of eggshell biomineralization, while the role of MFGE8 in vesicles transporting ACC is tenuous.

We propose two main hypotheses to explain the presence of stabilized ACC in uterine EVs, which are not mutually exclusive. The first one is that accumulation of ACC in the interior of an EV is sufficient to ensure its stabilization, as reported *in vitro* for ACC nanoparticles stabilized in liposomes [21,22]. In this case, the membrane coats ACC and shields it from bulk water. Indeed, an increased water content in the ACC milieu will accelerate its crystallization [91,92]. Under encapsulated conditions, the initial ACC remains isolated from the aqueous milieu and is observed to dehydrate to the more stable anhydrous ACC phase [22]. Moreover, magnesium and phosphate ions are also reported to enhance the stability of ACC and to delay its crystallization [91-93]. Physicochemical

vesicular conditions could therefore be a key element for ACC stabilization in uterine fluid EVs during eggshell biomineralization.

An alternative hypothesis incorporates additional molecules to thermodynamically stabilize the transient ACC phase [23]. Calcium carbonate could be stabilized in the ACC form by vesicular proteins. Indeed, previous studies have shown that organic matrix components of sea urchin spicules, coral skeleton or mollusk can stabilize ACC [94-96]. Moreover, ACC was observed using cryo-electron microscopy inside the vesicles of the sea urchin cells involved in spicule mineralization [59,60]. In this context, we paid particular attention to lysozyme (LYZ) and ovalbumin (OVA) that were identified in our proteomic study (Table 2 and 3), previously reported in chicken eggshell [70,79-82,84,97] and shown to modify crystal morphology *in vitro*. The role of lysozyme in the stabilization of ACC has been explored but remains controversial. Only high concentrations of lysozyme alter the morphology of *in vitro* grown calcite crystals [98]. Lysozyme from quail eggshells did not induce the precipitation of ACC under *in vitro* conditions [99]. However, metastable ACC was obtained *in vitro* in the presence of chicken egg white lysozyme [100,101]. Lysozyme markedly decreased the average diameter of metastable ACC particles and promoted a network of associated particles that incorporated the protein into the precipitate [100]. Additionally, lysozyme-ACC particles transform exclusively into the crystalline calcite polymorph [100,101]. Conversely, lysozyme protein was shown to be ineffective in the stabilization of ACC particles [102]. Consequently, LYZ could be involved in ACC stabilization inside vesicles (Table 3, Fig. 7).

OVA, OVALX and OVALY belonging to the serpin family, and have been previously identified in the eggshell matrix [71,103]. Their role in calcium carbonate formation and ACC stabilization has been investigated [103-107]. Calcium binds to ovalbumin and this accumulation creates a nucleation center for mineral formation [107]. A model for calcium carbonate mineralization in the presence of ovalbumin has been proposed [105]. Calcium ions are bound to the protein by complexation through acidic groups leading to protein rearrangement. 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 [106]. The ability of OVA to stabilize unstable calcium carbonate phases was further confirmed through *in vitro* experiments [107,108]. OVA is one of the major proteins involved in shell formation and its presence in vesicles will contribute to the formation of metastable ACC (Table 3, Fig. 7).

We also identified about 20 additional proteins in UF EVs by proteomic analysis (Table 2 and Online Resource 5). Ovotransferrin (OVOT) is known to modify calcite crystal morphology at low concentration [26]. Alpha-2-

macroglobulin (A2M), another protein identified in our study (Table 2 and Online Resource 5), is an egg yolk protein able to interact with low density lipoprotein, which exhibits binding calcium properties and consequently could interact with ACC (https://www.uniprot.org/) [6,109]. Ovomucin (MUC), ovomacroglobulin (ovostatin, OVST) and ovoglobulin G2 (TENP or OVOG2) are egg white proteins, whereas vitelline membrane outer layer protein (VMO1) is a protein of vitelline membrane (Table 2 and Online Resource 5) [110]. They were previously identified in eggshell [70,71], but their role related to the calcification process is unknown. Clusterin (CLU) is a chaperone protein previously identified in eggshell and proposed to prevent the premature aggregation and precipitation of eggshell matrix proteins during calcification [111]. Aminopeptidase N (AMPN) and Loc 771972 (OCX25) are a protease and protease inhibitor, respectively [3,112], which were also revealed in vesicles (Table 2 and Online Resource 5). Protease and protease inhibitors could potentially control the calcification process, either by degrading proteins or by modifying the processing of protein maturation [71]. Prominin-1-A (PROM1), a protein involved in lipid metabolism was also present in vesicles but its role is not yet defined. Finally, nine EV proteins are partial immunoglobulins, with unknown functions in vesicles or in shell mineralization.

We consequently propose a comprehensive model for EV-mediated calcium transport to the mineralization site (Fig 9). Calcium and carbon dioxide originate from blood. Blood CO_2 passively diffuses into uterine cells [113], where it will be hydrated by CA2. Alternatively, bicarbonate can be actively transferred into uterine cells using the Na^+/HCO_3^- co-transporters SLC4A4-A5-A10 [41]. Bicarbonates are actively extruded from cells by the HCO_3^-/Cl^- exchanger SLC26A9 [41]. Additionally, bicarbonate ions will be produced in uterine fluid by hydration of CO_2 by CA4, which has its active site in the extracellular space [114]. The transcellular pathway to secrete calcium and bicarbonates ions into the fluid has been previously described [8,42]. The calcium channels TRPV2 and TRPV3 allow the entry of plasma calcium, and it is buffered / transferred intracellularly by Calbindin-1 (others Ca^{2+} pumps associated with the endoplasmic reticulum could be also involved in this transfer); additionally, the Ca^{2+}/Na^{2+} exchangers SLC8A1-3 and the Ca^{2+} pumps ATP2B1-B2 are involved in the apical extrusion of calcium into the uterine fluid [41]. A paracellular Ca^{2+} uptake pathway was recently described in intestine that acts to replenish calcium stores from dietary sources during eggshell biomineralization. The paracellular pathway involves Claudins (CLDN), Occludins (OCN), junctional adhesion molecules (JAM) and tight junction proteins (TJP) [43]. It is also possible that a paracellular pathway is present in the uterus to contribute to ionic constituents of the uterine fluid. Uterine RNA-Seq analysis reveals elevated expression of several genes of the paracellular pathway that were also identified in the hen intestines (*Tjp1*, *Cldn1*, *Cldn10*, *Ocln*, *Jam2*) (https://anr.fr/Projet-ANR-13-BSV6-0007). Moreover, *Cldn10* was also reported from two recent studies on uterine gene expression

of chicken [115,116]. Consequently, we have incorporated this pathway in our comprehensive model of ionic pathways during shell biomineralization (Fig 9). Finally, we have added our evidence related to vesicular ACC transport within uterine fluid. Based on the available literature, we propose that ACC is taken up by vesicles that form inside uterine epithelial cells (1 in Fig. 9). Intracellular vesicles containing stabilized ACC are then secreted into the uterine fluid to be targeted to mineralization sites. Alternatively, vesicles could be secreted without ACC; if so, ACC would accumulate in vesicles within the uterine fluid (2 in Fig. 9). Further experiments will be necessary to distinguish between these possibilities. Annexins present on vesicle membranes will ensure the entry of calcium, whereas CA4 will catalyze the hydration of CO_2 into bicarbonate ions. ACC inside EVs will then be delivered to the mineralization sites. EDIL3, and possibly MFGE8, are proposed as guidance molecules for extracellular vesicle targeting [24]. Additional calcium / bicarbonate ions provided by transcellular and paracellular pathways would supplement vesicular ACC for epithaxial growth of calcite at the mineralization front during initial and subsequent stages of shell mineralization.

Conclusion

In a previous study, we proposed a vesicular transport model that could deliver ACC for deposition during eggshell biomineralization [24]. In the present study, we used multiple approaches to confirm predictions based on this model. TEM coupled to elemental analysis demonstrated several phases of EV formation at uterine cells, as well as the presence of EVs containing ACC in the UF. The major actors involved in this vesicular transport were organized into a comprehensive schema (Fig. 7), which incorporates EVs and constituent proteins in the process of shell mineralization. EDIL3 and possibly MFGE8 are targeting proteins that are proposed to address vesicles for delivery of ACC to the mineralization site. Calcium accumulation by vesicles is promoted by annexins 1, 2 and 8, whereas carbonic anhydrase 4 catalyzes bicarbonate formation from CO_2. Moreover, our study identified and characterized several additional proteins that could contribute to the stabilization of ACC inside vesicles, under favorable physical and chemical conditions. Finally, we propose an updated and coherent model for the transfer of ions to ensure avian eggshell biomineralization (Fig 9). This model blends together transcellular, paracellular and vesicular pathways to address the supply of minerals necessary to build this composite biomaterial. Further work will be necessary to define the relative contribution of each pathway.

Tables and figures

Table. 1 Normalized vesicular gene expression in the four oviduct regions and other tissues. Expression results are reported as mean ± SD. Gene expression was assessed during the active growth phase of eggshell mineralization at 10 h p.o. except for B at 18 h p.o.. Following reverse transcription, gene expression was quantified using primers designed with Primer-blast tool of NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) and validated for the Biomark microfluidic system (BMK-M-96.96; Fluidigm). Relative quantification was normalized with eight housekeeping genes using GenNorm software. Superscript letters "a" to "e" correspond to significance results of the ANOVA-Tukey tests with "a" the letter corresponding to the highest level of expression for each gene. Tibial bone, B; duodenum, D; kidney, K; liver, L; magnum, Ma; white isthmus, WI; red isthmus, RI; uterus, Ut. The gene accession numbers and primer sequences are compiled in Online Resource 1

		Tissues				Oviduct segments				
Function	**Gene**	**B**	**D**	**K**	**L**	**Ma**	**WI**	**RI**	**Ut**	**ANOVA p-value**
Calcium channel	***Anxa1***	0.205 ± 0.200^{cd}	0.002 ± 0.001^{d}	0.009 ± 0.004^{d}	0.001 ± 0.001^{d}	0.194 ± 0.066^{cd}	2.190 ± 0.749^{b}	3.338 ± 0.768^{a}	0.891 ± 0.320^{c}	**<0.001**
	Anxa2	0.307 ± 0.240^{cd}	0.521 ± 0.180^{cd}	0.006 ± 0.009^{d}	0.001 ± 0.002^{d}	0.543 ± 0.340^{cd}	1.208 ± 0.805^{bc}	2.884 ± 1.247^{a}	1.904 ± 0.459^{ab}	**<0.001**
	Anxa5	0.431±0.359	0.401±0.289	0.189±0.173	1.462±0.828	2.001±2.920	0.560±0.298	1.405±1.044	0.298±0.193	0.068
	Anxa6	2.116 ± 1.522^{ab}	0.446 ± 0.282^{b}	0.313 ± 0.163^{b}	1.473 ± 0.558^{ab}	1.328 ± 1.140^{ab}	0.478 ± 0.375^{ab}	0.347 ± 0.147^{b}	0.543 ± 0.437^{ab}	0.008
	Anxa7	0.206 ± 0.081^{cd}	1.436 ± 0.306^{b}	7.074 ± 1.170^{a}	0.191 ± 0.059^{d}	0.623 ± 0.330^{bcd}	0.676 ± 0.410^{bcd}	1.122 ± 0.284^{bc}	1.450 ± 0.526^{b}	<0.001
	Anxa8	0.026 ± 0.029^{d}	0.001 ± 0.001^{d}	0.001 ± 0.001^{d}	0.001 ± 0.001^{d}	1.669 ± 0.922^{bc}	2.513 ± 1.205^{ab}	3.958 ± 1.720^{a}	0.979 ± 0.344^{cd}	**<0.001**
	Anxa11	0.214±0.044	0.562±0.152	0.644±0.293	0.916±0.939	3.760±6.150	2.180±3.080	1.615±1.436	1.008±0.647	0.236
Bicarbonate supplier/ transporter	*Ca2*	21.440 ± 10.270^{a}	2.585 ± 1.127^{b}	1.633 ± 0.834^{b}	0.512 ± 0.157^{b}	0.763 ± 0.196^{b}	1.149 ± 0.297^{b}	0.561 ± 0.171^{b}	1.131 ± 0.394^{b}	<0.001
	Slc4a7	0.115 ± 0.039^{cd}	1.905 ± 0.665^{a}	0.069 ± 0.008^{cd}	0.012 ± 0.007^{d}	0.454 ± 0.149^{cd}	0.551 ± 0.287^{c}	1.078 ± 0.262^{b}	0.529 ± 0.120^{c}	<0.001
Membrane organizer	***Cd82***	0.634 ± 0.345^{cd}	0.769 ± 0.310^{bcd}	0.367 ± 0.241^{cd}	0.162 ± 0.141^{d}	1.598 ± 0.970^{ab}	0.943 ± 0.260^{abcd}	1.270 ± 0.403^{abc}	1.865 ± 0.834^{a}	**<0.001**
	Cd9	0.085 ± 0.100^{b}	0.258 ± 0.129^{b}	0.403 ± 0.168^{b}	0.053 ± 0.068^{b}	1.751 ± 1.255^{b}	12.900 ± 4.98^{a}	1.780 ± 0.323^{b}	1.617 ± 1.106^{b}	<0.001
Chaperone	*Hsp90b1*	2.427 ± 1.776^{a}	0.941 ± 0.672^{a}	3.230 ± 3.500^{a}	5.250 ± 3.920^{a}	4.560 ± 4.650^{a}	1.649 ± 0.760^{a}	1.627 ± 0.659^{a}	2.992 ± 0.840^{a}	0.039
	Hspa8	0.562 ± 0.125^{d}	0.840 ± 0.203^{bcd}	1.180 ± 0.334^{b}	0.404 ± 0.151^{d}	0.973 ± 0.249^{bc}	0.919 ± 0.287^{bc}	1.709 ± 0.399^{a}	1.084 ± 0.205^{b}	**<0.001**

Adhesion molecule	***Itgb1***	1.925±0.947^{a}	0.345±0.084^{bc}	0.671±0.491^{abc}	0.133±0.064^{c}	1.827±0.961^{a}	1.536±0.826^{ab}	1.783±1.054^{a}	1.396±0.504^{abc}	**<0.001**
	Edil3	0.019±0.017^{b}	0.000±0.000^{b}	0.001±0.003^{b}	0.000±0.000^{b}	0.000±0.000^{b}	0.825±0.303^{a}	1.101±0.737^{a}	0.737±0.464^{a}	**<0.001**
	Mfg8	0.514±0.380^{c}	0.114±0.078^{c}	0.856±0.208^{c}	4.373±1.223^{a}	0.029±0.063^{c}	0.803±0.399^{c}	2.139±1.194^{b}	0.381±0.385^{c}	**<0.001**
Intracellular trafficking	*Rab11a*	0.399±0.125^{d}	2.575±0.600^{a}	0.993±0.110^{b}	0.506±0.079^{cd}	1.110±0.201^{b}	0.703±0.130^{bcd}	0.952±0.076^{bc}	1.116±0.226^{b}	<0.001
	Rab27a	0.381±0.168^{c}	0.329±0.197^{c}	0.585±0.283^{c}	0.185±0.144^{c}	2.306±1.363^{a}	1.778±0.517^{ab}	1.090±0.485^{bc}	1.742±0.634^{ab}	**<0.001**
	Rab5a	0.525±0.353^{bc}	0.779±0.251^{bc}	0.784±0.324^{bc}	0.780±0.422^{bc}	1.701±0.881^{a}	1.337±0.500^{abc}	1.294±0.300^{abc}	1.649±0.596^{ab}	**<0.001**
	Rab7a	1.879±0.849	1.399±0.781	0.991±0.381	1.016±0.500	1.375±0.523	1.258±0.335	1.353±0.377	1.509±0.354	0.297
	Ralb	0.987±0.257^{ab}	1.034±0.658^{ab}	1.350±0.587^{a}	1.191±0.484^{ab}	0.679±0.939^{ab}	0.615±0.371^{ab}	0.644±0.438^{ab}	0.349±0.203^{b}	0.039
	Vcp	1.116±0.495^{ab}	0.414±0.136^{b}	0.707±0.259^{b}	2.129±0.802^{a}	1.379±1.746^{ab}	1.071±0.350^{ab}	1.229±0.469^{ab}	1.334±0.519^{ab}	0.027
	Arf6	0.597±0.141^{bc}	1.688±0.490^{a}	0.770±0.201^{bc}	0.702±0.360^{bc}	0.647±0.255^{bc}	0.453±0.194^{c}	0.949±0.305^{bc}	1.206±0.370^{ab}	<0.001
EV biogenesis	***Sdcbp***	0.581±0.203^{d}	0.920±0.225^{cd}	2.398±0.326^{ab}	0.546±0.210^{d}	2.585±1.130^{a}	2.506±0.629^{ab}	2.013±0.386^{ab}	1.567±0.422^{bc}	**<0.001**
	Tsg101	0.134±0.018^{e}	0.510±0.136^{cd}	0.764±0.180^{bc}	0.386±0.056^{de}	1.206±0.385^{a}	0.900±0.224^{ab}	1.088±0.134^{ab}	1.192±0.184^{a}	**<0.001**
	Vps26a	0.447±0.271^{de}	0.831±0.186^{cde}	1.078±0.147^{bcd}	0.466±0.183^{de}	1.203±0.419^{abcd}	1.754±0.338^{ab}	1.937±0.657^{a}	1.417±0.771^{abc}	**<0.001**
	Pdcd6ip	0.213±0.047^{e}	1.150±0.225^{bc}	0.727±0.156^{cde}	0.493±0.109^{de}	0.777±0.332^{cd}	0.842±0.303^{cd}	1.454±0.301^{b}	2.030±0.545^{a}	**<0.001**
EV release	***Vamp3***	0.199±0.060^{d}	0.575±0.088^{bc}	0.365±0.124^{cd}	0.156±0.080^{d}	0.682±0.190^{b}	0.751±0.122^{b}	1.117±0.253^{a}	0.749±0.134^{b}	**<0.001**
	Vamp7	0.439±0.224^{de}	0.590±0.281^{cde}	1.527±0.542^{ab}	1.088±0.258^{abcd}	0.911±0.258^{bcde}	1.198±0.242^{abc}	1.407±0.552^{ab}	1.704±0.373^{a}	**<0.001**
	Vps4b	0.014±0.010^{b}	0.041±0.020^{ab}	0.019±0.019^{b}	0.009±0.006^{b}	0.052±0.029^{ab}	0.028±0.022^{b}	0.029±0.017^{b}	0.090±0.069^{a}	**<0.001**
	Ap1g1	0.613±0.163^{ab}	0.649±0.154^{ab}	0.509±0.097^{ab}	0.334±0.185^{b}	0.824±0.539^{ab}	0.726±0.404^{ab}	1.063±0.260^{ab}	1.199±0.465^{ab}	0.030
Signalling protein	***Ywhah***	0.338±0.089^{abcd}	0.517±0.310^{abcd}	0.171±0.104^{cd}	0.111±0.098^{d}	0.970±0.339^{ab}	1.071±0.683^{ab}	1.089±0.562^{a}	0.872±0.568^{abc}	**<0.001**
	Ywhaz	0.485±0.200^{cd}	0.501±0.152^{cd}	0.507±0.131^{cd}	0.136±0.050^{d}	0.660±0.266^{c}	0.786±0.159^{bc}	1.192±0.291^{b}	2.121±0.394^{a}	**<0.001**

Table. 2 List of the 29 proteins identified by nanoLC-MS/MS analysis in uterine fluid EVs. The EV fraction was purified from uterine fluid (UF) collected at 9 h p.o.. Supplementary information on proteomic results are provided in Online Resource 5. Indicated accessions correspond to the GenBank accession number

#	Identified Proteins	Accession Number	GeneID	Theoretical molecular weight	Normalized weighted spectra	emPAI
1	Cluster of ovalbumin	AUD54558.1	396058	43 kDa	1 031.10	29.909
2	Cluster of ovotransferrin	P02789.2	396241	78 kDa	560	8.219
3	Cluster of ovomucin	NP_989992.1	395381	234 kDa	448.91	0.82205
4	Cluster of alpha-2-macroglobulin-like	XP_025007673.1	418254	158 kDa	288	0.89983
5	Cluster of ovomacroglobulin (ovostatin)	CAA55385.1	396151	164 kDa	215	0.47326
6	Ig mu chain C region	P01875.2	N/A	48 kDa	210	2.499
7	immunoglobulin alpha heavy chain	AAB22614.2	N/A	62 kDa	70	0.96212
8	Ig light chain	AAA48859.1	416928	25 kDa	63	0.88882
9	ovalbumin-related Y	BAM13279.1	420897	44 kDa	66	0.66086
10	polymeric immunoglobulin receptor	AAQ14493.1	419848	71 kDa	71	0.31136
11	ovoglobulinG2	BAM13270.1	395882	47 kDa	66	0.59817
12	Cluster of immunoglobulin light chain variable region	AJQ23663.1	N/A	11 kDa	42	0.87697
13	Cluster of anti-prostate specific antigen antibody immunoglobulin variable region	ALX37966.1	N/A	13 kDa	51	1.4661
14	Cluster of programmed cell death 6-interacting protein	XP_015137020.1	420725	97 kDa	46	0.16725
15	Cluster of immunoglobulin light chain variable region	AJQ23661.1	N/A	11 kDa	34	1.2195
16	Cluster of Lysozyme C	P00698.1	396218	16 kDa	41	1.2327
17	clusterin	NP_990231.1	395722	51 kDa	7	0.36338
18	Cluster of ovalbumin-related protein X	NP_001263315.1	420898	44 kDa	16	0.35247
19	carbonic anhydrase 4	XP_415893.1	417647	36 kDa	23	0.5467
20	Cluster of ezrin	NP_990216.1	395701	69 kDa	13	0.20218

21	uncharacterized protein LOC771972 (OCX25)	XP_001235178.3	771972	27 kDa	10	0.41449
22	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3	XP_424906.3	427326	54 kDa	12	0.2673
23	immunoglobulin heavy chain V-region	AAA48830.1	N/A	11 kDa	9	1.2444
24	Cluster of syntenin-1	NP_001026195.1	421136	32 kDa	11	0.21673
25	aminopeptidase N	ACZ95799.1	395667	109 kDa	6	0.060894
26	Cluster of immunoglobulin light chain variable region	AJQ23760.1	N/A	10 kDa	6	0.75959
27	prominin-1-A	XP_004942263.1	423849	88 kDa	3	0.075475
28	angiotensin-converting enzyme precursor	NP_001161204.1	419953	147 kDa	5	0.044662
29	vitelline membrane outer layer protein 1	NP_001161233.1	418974	20 kDa	4	0.35873

Table. 3 Proteins of the proposed ACC extracellular vesicle system detected by nanoLC-MS/MS analysis (Scaffold software) in uterine fluid EVs. The EV fraction was purified from uterine fluid (UF) collected at 9h p.o. The entire set of detected proteins is listed in Online Resource 5. Indicated accessions correspond to the GenBank accession number. ACC, amorphous calcium carbonate; HCO_3^-, bicarbonate ion. Vesiclepedia database (www.microvesicles.org) classifies the proteins that are frequently identified in EVs. EV localization was predicted using molecular function of proteins on Uniprot (https://www.uniprot.org/). References: [27,30-33,70-73,79-88]

Protein name	Accession number (GenBank)	Gene ID	Molecular weight	Hypothetical role in EV from UF	EV localization	Vesiclepedia rank	Bone/cartilage EV references	Eggshell/UF proteome references
CA4	XP_415893.1	417647	36 kDa	HCO_3^- supplier	membrane: glycosylphosphatidylinositol (GPI-anchored)	N/A	N/A	27, 70, 79, 85, 88
EDIL3	XP_424906.3	427326	54 kDa	targeting protein	membrane: phosphatidylserine-binding	N/A	32	27, 71, 73, 79, 81, 82, 83, 84, 86, 87
Ezrin	NP_990216.1	395701	69 kDa	membrane fusion (plasma membrane-cytoskeleton linker)	membrane: phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate-binding	30/100	31, 32, 33	70, 71, 85, 88
PDCD6IP	XP_015137020.1	420725	97 kDa	EV biogenesis	lumen: incorporation	1/100	30, 31	70, 87, 88
Syntenin-1	NP_001026195.1	421136	32 kDa	EV biogenesis	membrane: phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate-binding	19/100	30, 31, 32	70, 71, 72, 85, 86, 88
Ovalbumin	AUD54558.1	N/A	43 kDa	ACC stabilization	lumen: incorporation	N/A	N/A	27, 70, 71, 73, 79, 80, 81, 85, 86
Lysozyme C	P00698.1	396218	16 kDa	ACC stabilization	lumen: incorporation	N/A	32	27, 70, 71, 73, 79, 80, 81, 85, 86, 88

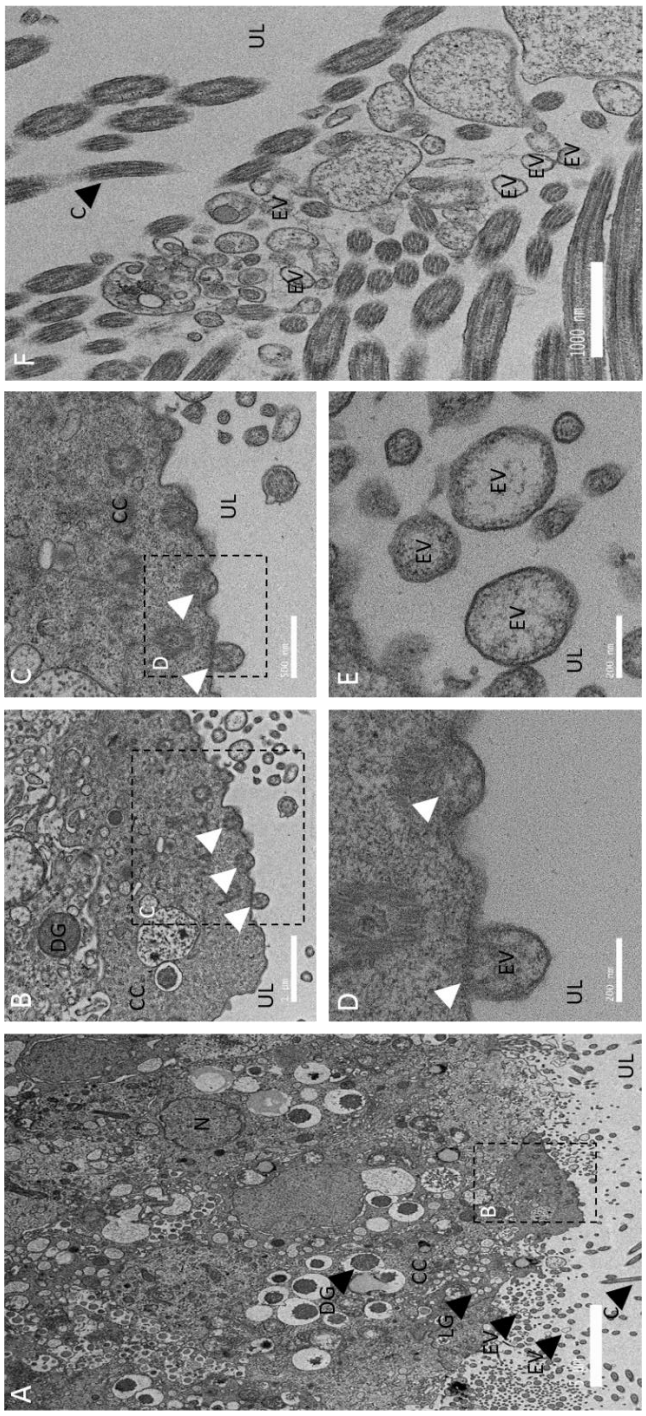


Fig. 1 Transmission electron microscopy (TEM) of uterine cells. **A** TEM micrograph of uterine epithelium showing secretory activity (16 h p.o.) **B, C, D** Higher magnification TEM micrographs of uterine cells showing examples of exocytosis activity. **E, F** TEM micrographs illustrating the presence of numerous EVs in the uterine lumen (UL) at 7 h **F** and 16 h p.o. **E** Thin sections of uterus were negatively stained with 2 % uranyl acetate. C: cilia, CC: ciliated cells, DG: dense granule, LG: light granule, EV: extracellular vesicle, N: nucleus, UL: uterine lumen. White arrowheads indicate vesicle budding. Bars: A= 5 µm, B and F= 1 µm, C= 500 nm, D and E= 200 nm

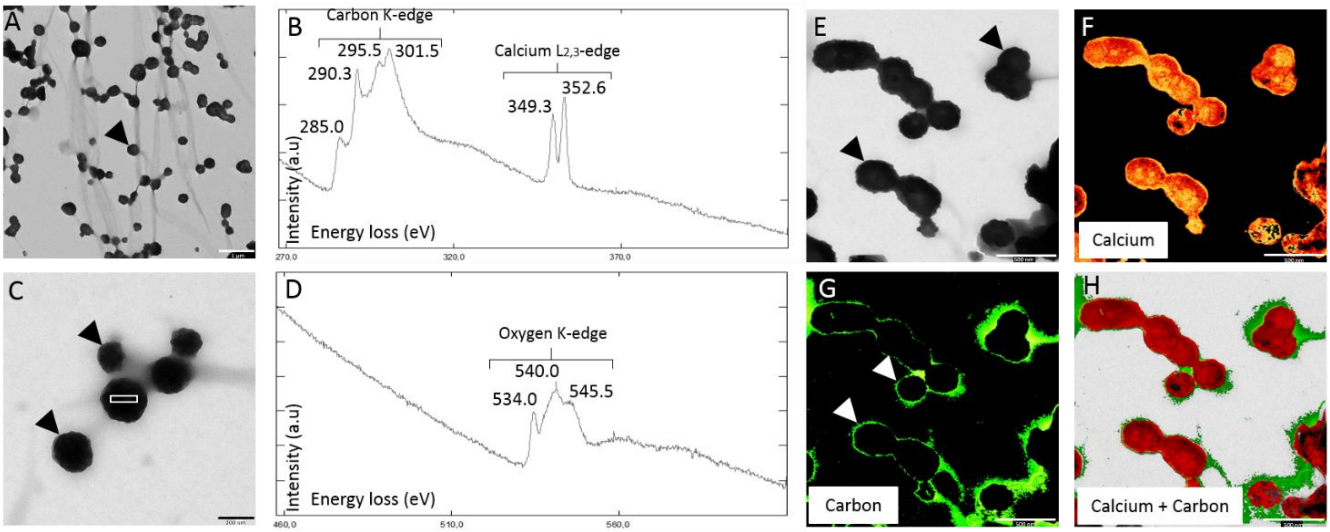


Fig. 2 Transmission electron microscopy (TEM) on uterine fluid (UF) and elemental analysis (EELS) **A, C** TEM micrograph of EVs observed in UF. Black arrowheads indicate the EVs. White boxes indicates EELS analysis area of **B** and **D** graphs. **B, D** EELS spectroscopy on EVs from UF. The carbon K-edge shows three major peaks at 290.3, 295.5 and 301.5 electron volts (eV), characteristic of $CaCO_3$. The peak at 285.0 from the carbon K-edge reflects the presence of organic material. The two peaks 349.3 and 352.6 eV define the calcium L2,3-edge of EELS. The oxygen K-edge displays a major peak at 540.0 specific to the carbonate group (CO_3^{2-}) and two other peaks at 534.0 and 545.5 indicate C=O bond. **E** TEM micrograph of EV, observed in UF with associated mapping of **F** calcium element (324-355 eV). **G** Organic phase carbon (280-290 eV) and **H** calcium + carbon combined elements detected by the EELS analysis. Bars A= 1 µm, C= 200 nm, E to H= 500 nm

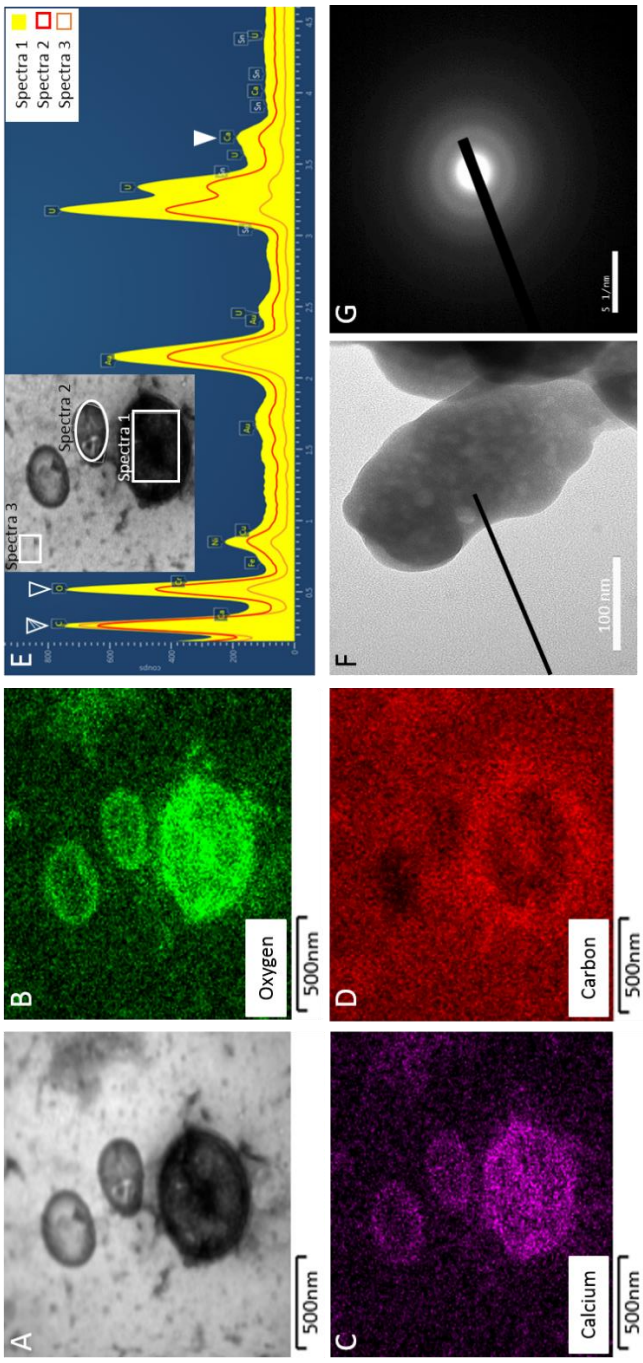


Fig. 3 Transmission electron microscopy (TEM) on uterine fluid (UF) fraction at 16 h p.o., energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) and selected area electron diffraction (SAED) analyses **A** TEM micrograph of EVs observed in UF with associated mapping of **B** oxygen element; **C** calcium element; and **D** carbon element; as detected by the Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) analysis. **E** EDS spectrum of the EVs observed in UF. Filled white arrowhead indicates the calcium peak (3.690 keV) of EV whereas striped and empty white arrowheads show carbon (0.277 keV) and oxygen (0.525 keV) peaks, respectively. Boxes point out the areas of EDS analysis. **F, G** SAED pattern of the mineral detected in EV of UF. Diffuse rings detected are characteristic of the ACC phase. Bars A to D= 500 nm, F= 1 µm, G= 5 1±nm

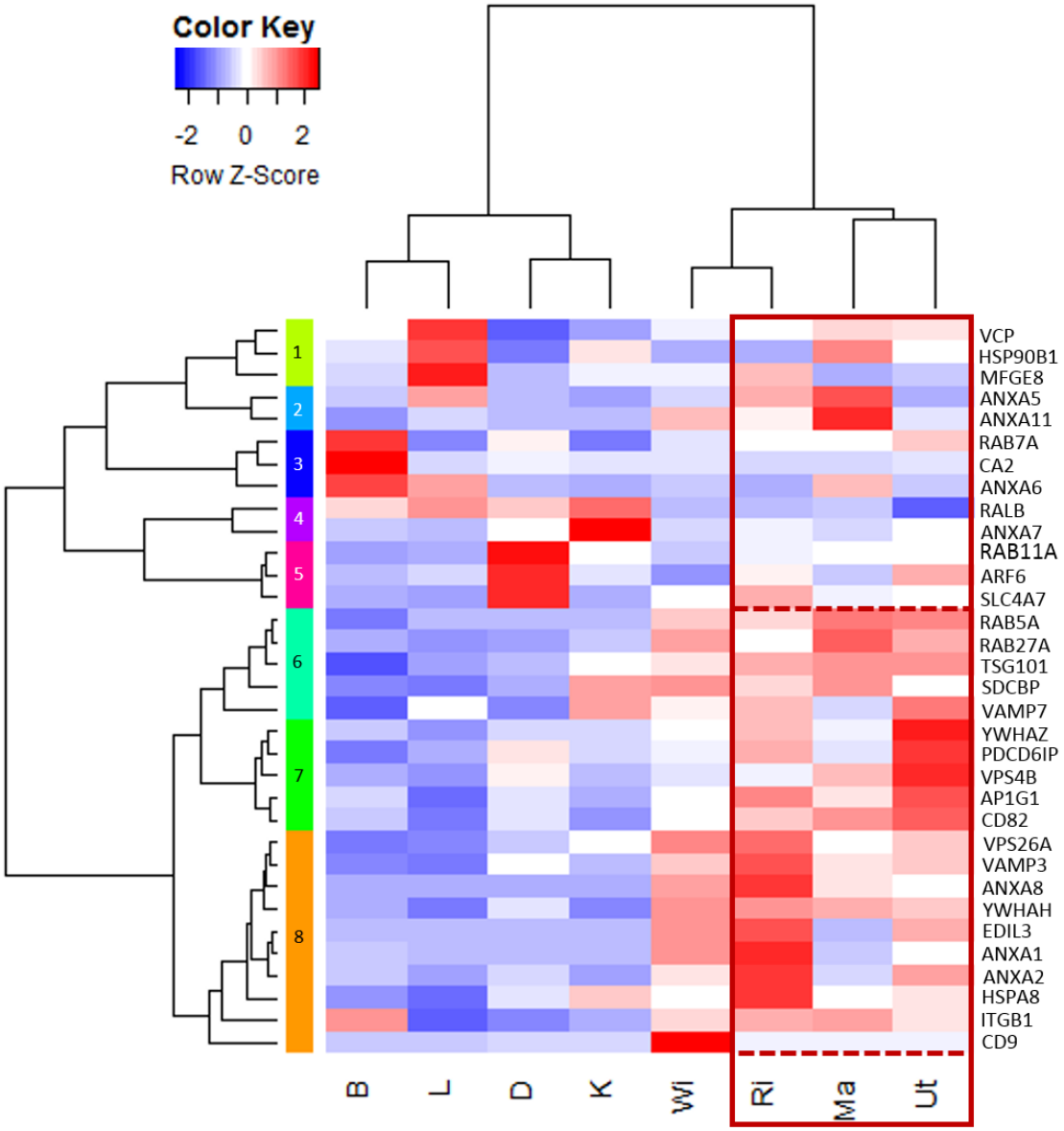


Fig. 4 Heatmap of vesicular gene expression in the four oviduct segments (Ma, magnum; WI, white isthmus; RI, red isthmus and Ut, uterus) and four tissues (B, bone; D, duodenum; K, kidney; L, liver). Z-score range was colored from blue (-2 Row Z-Score, low expression) to white (0 Row Z-Score, intermediate expression) and to red (2 Row Z-score, high expression). Gene accessions and primers are reported in Online Resource 1

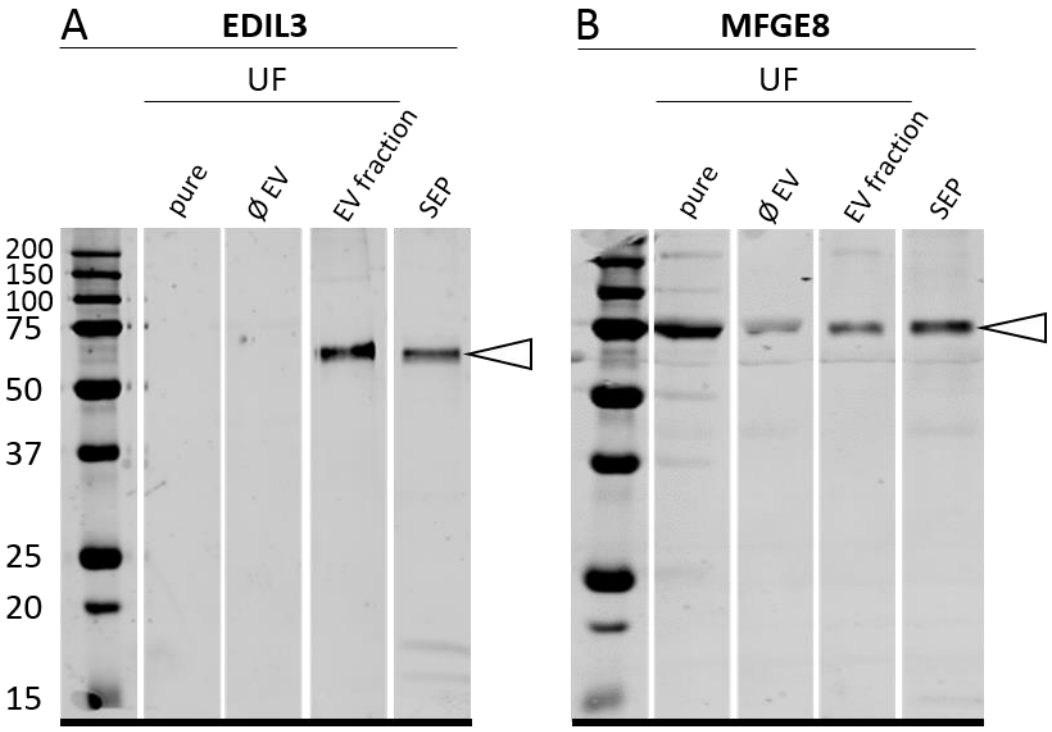


Fig. 5 Western blot analysis of EDIL3 and MFGE8 in uterine fluid (UF): unfractioned UF (pure), depleted UF (ØEV), EV fraction of UF (EV fraction) and soluble eggshell proteins (SEP). Proteins (15 µg) were subjected to 12.5 % SDS-page electrophoresis and blotted for analysis. The membranes were probed with **A** rabbit polyclonal anti-EDIL3 (1: 1,000, SAB2105802, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and **B** rabbit synthetic anti-MFGE8 peptide (1: 1,000, rabbit polyclonal; ProteoGenix, Schiltigheim).White arrowheads indicate the immunoreactive bands

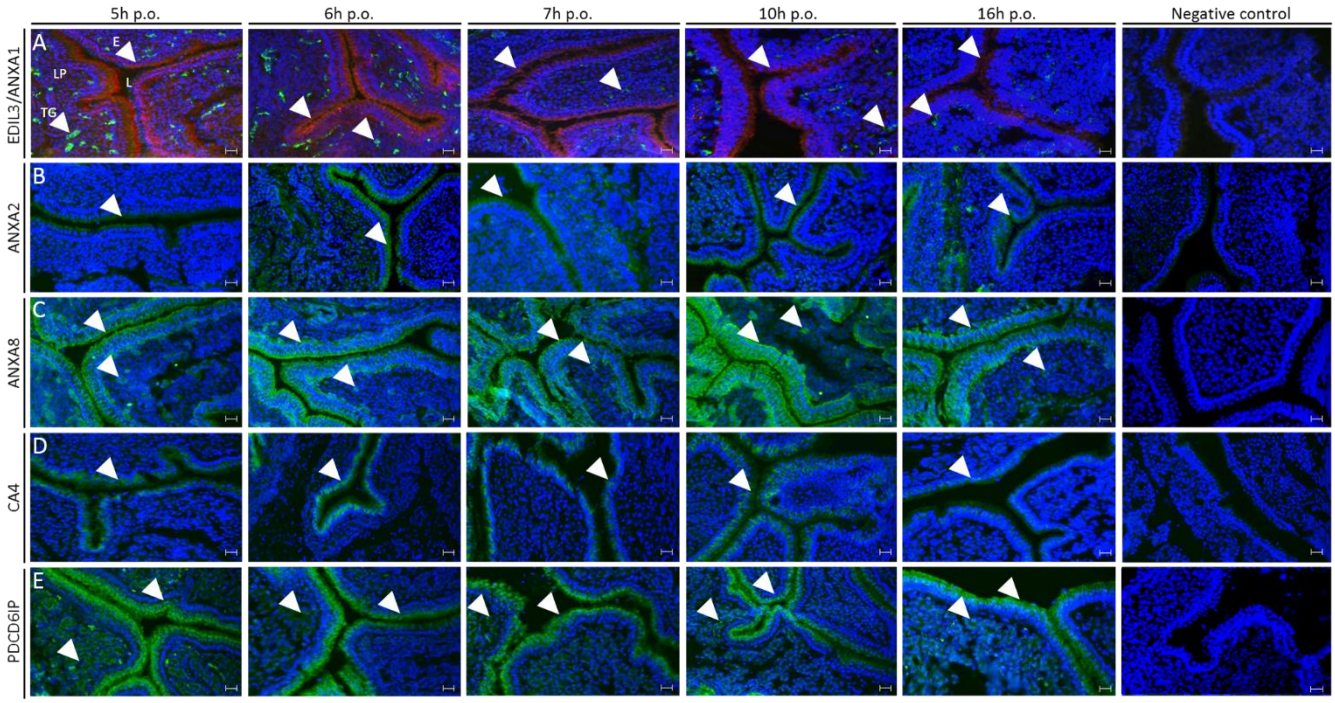


Fig. 6 Immunofluorescence of ANXA1, ANXA2, ANXA8, EDIL3, CA4 and PDCD6IP in chicken uterus. The respective rows correspond to **A** co-staining of ANXA1 (red) and EDIL3 (green), **B** staining of ANXA2 (green), **C** staining of ANXA8 (green), **D** staining of CA4 (green) and **E** staining of PDCD6IP (green). ANXA1, ANXA2 and CA4 were localized in the epithelium. ANXA8 and PDCD6IP signals were observed in both epithelium and tubular glands of lamina propria. EDIL3 was solely detected in tubular glands. E: ciliated and glandular epithelium, L: lumen, LP: lamina propria, TG: tubular glands. The primary and secondary antibodies are compiled in supplementary data S2. Bars= 100 µm. White arrowheads indicate positive signal in either tubular glands or epithelium

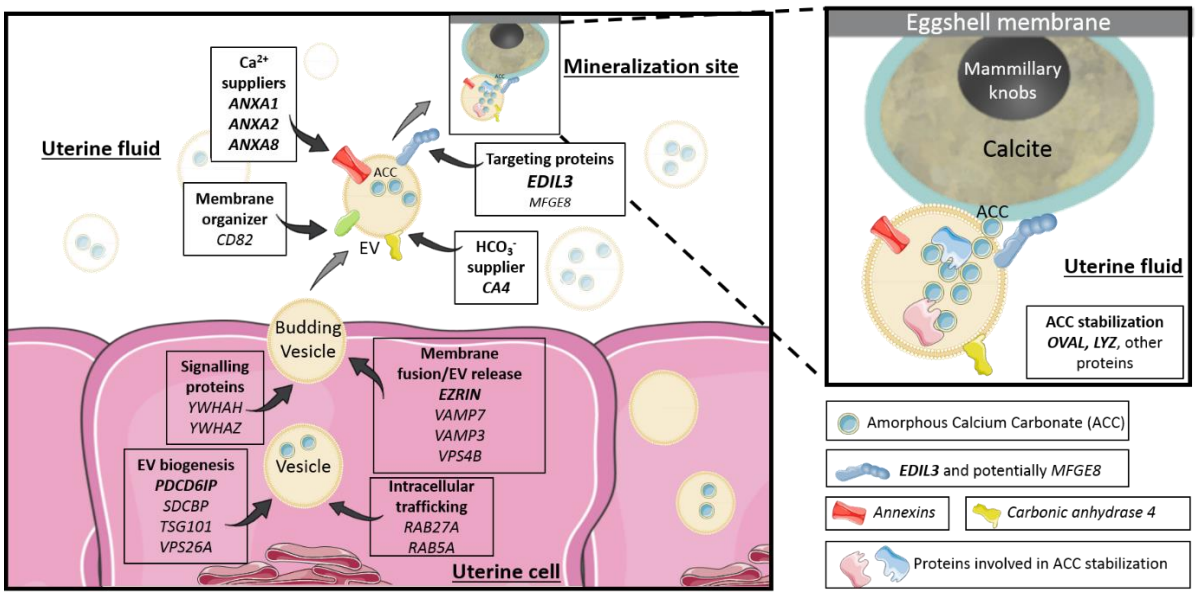


Fig. 7 Proposed vesicular function for the different genes and proteins investigated in the study. The extracellular vesicles (EVs) bud by exocytosis from the plasma membrane of the uterine ciliated cells. ANXA1, 2, 8 and CA4 supply calcium and bicarbonate ions, respectively (inside uterine cells or in the UF). The EVs transit the uterine fluid (UF) to deliver stabilized ACC (amorphous calcium carbonate) to the mineralization sites (MS). The passage of EV-encapsulated ACC avoids non-specific mineralization in the UF and provides stabilized ACC to the mineralization sites. OVA and LYZ stabilize ACC inside vesicles. EDIL3 (in bold), and to a lesser extent MFGE8, guide the EVs by targeting calcium to the mineralization front. The rest of the proteins are involved in EV formation mechanisms (biogenesis, intracellular transport and release). The genes in bold had their encoded proteins identified in our proteomic and/or immunofluorescence analyses. Elements were from Servier Medical Art (https://smart.servier.com/), licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License

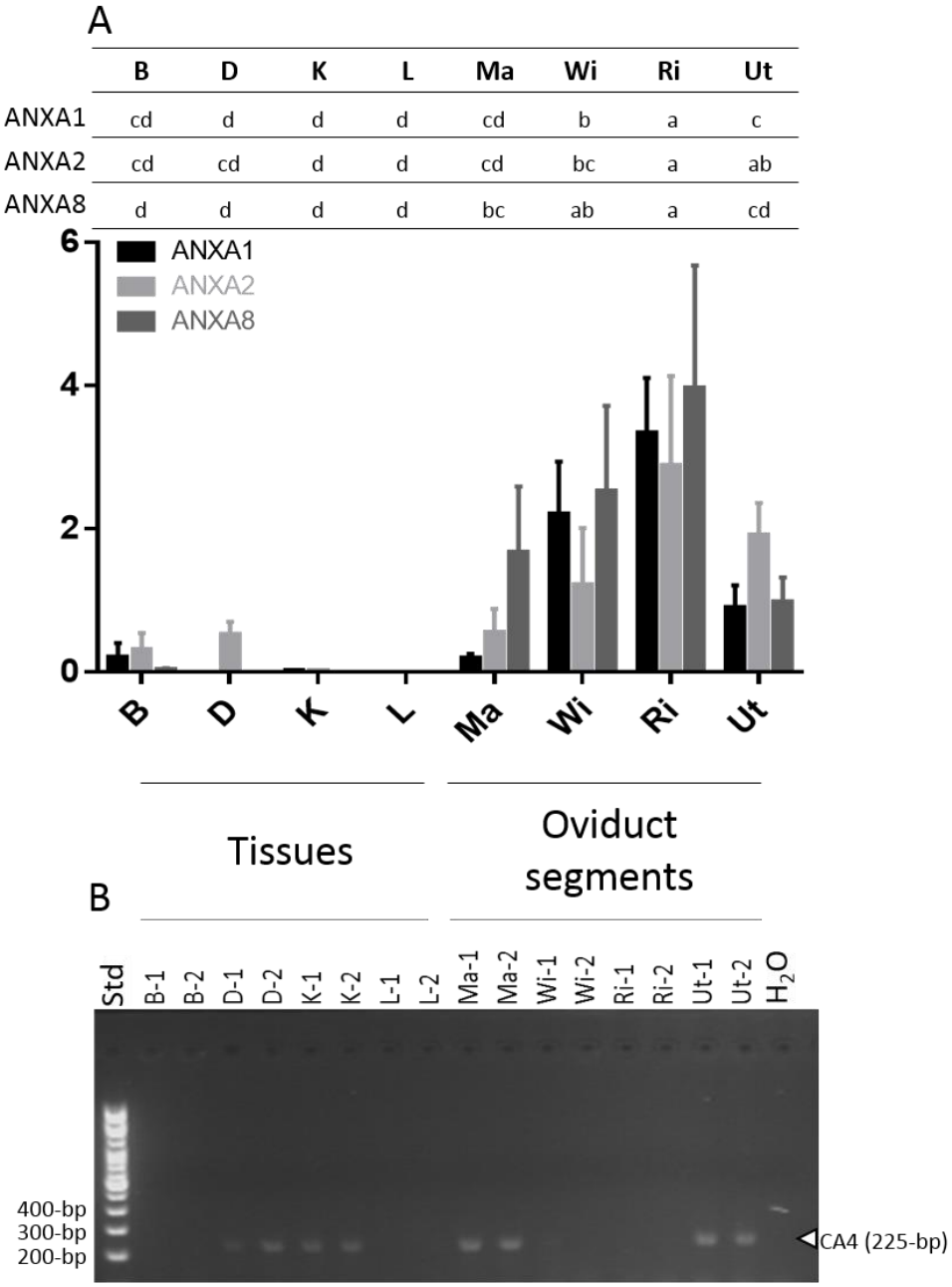


Fig. 8 Gene expression of ANXs and carbonic anhydrase 4. **A** *Anxa1*, *Anxa2* and *Anxa8* expression. Following reverse transcription, gene expression was quantified using the Biomark microfluidic system (BMK-M-96.96; Fluidigm). Relative quantification was normalized with eight housekeeping genes using GenNorm software. **B** *Ca4* reverse transcription-PCR (100-bp DNA ladder). Gene expression was assessed during the active growth phase of mineralization 10 h p.o. except for B at 18 h p.o.. Tibial bone, B; duodenum, D; kidney, K; Liver, L; Magnum, Ma; White isthmus, WI; Red isthmus, RI; Uterus, Ut; H_2O, negative control; Std, size (bp) of DNA ladder (100-bp). Letters at the top indicate statistical significant differences of ANXs expression between the tissues (ANOVA-Tukey). The gene accession numbers and primers are compiled in Online Resource 1. GraphPad Prism software was used for diagram representation

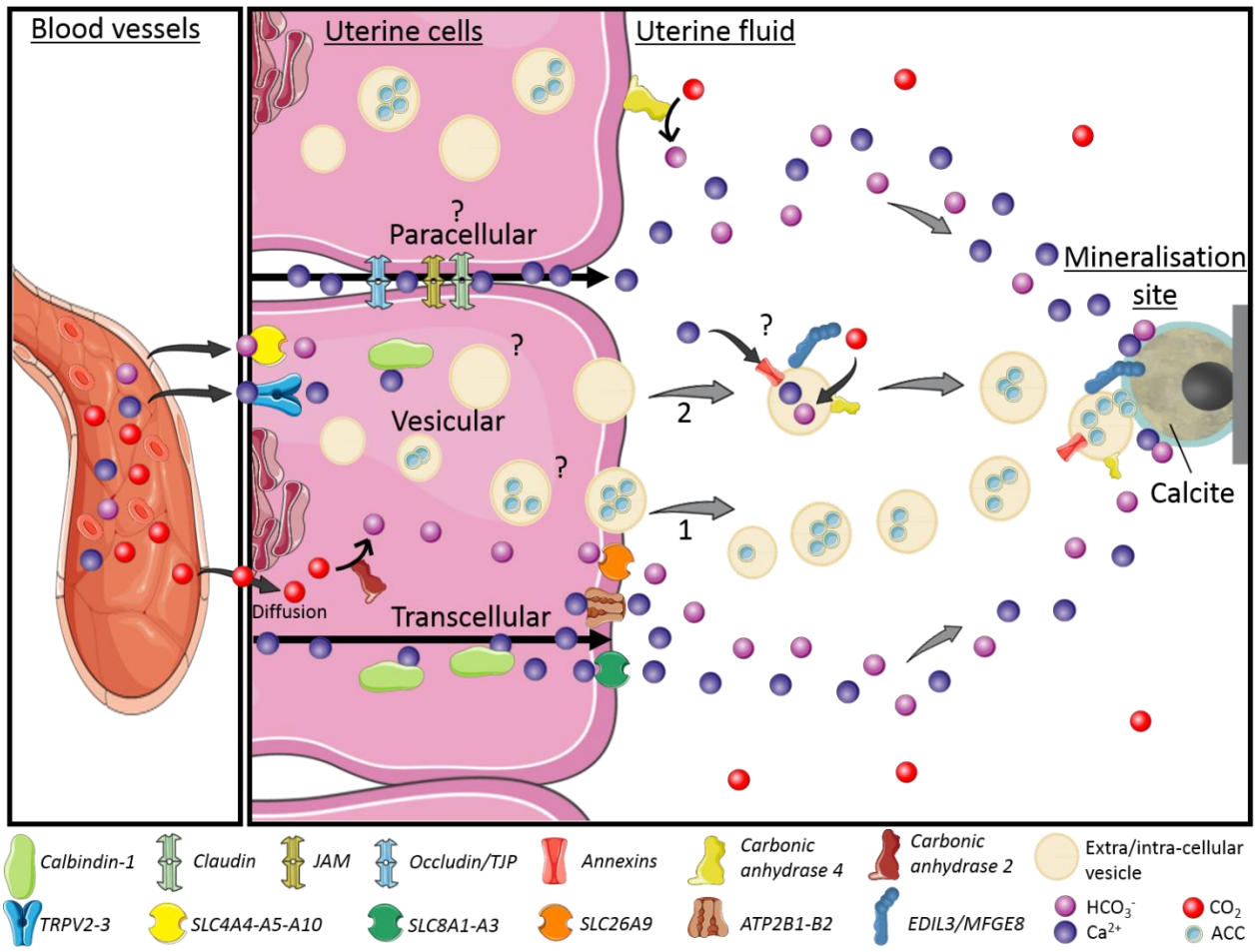


Fig. 9 Model of calcium transport to the uterine fluid during eggshell calcification. The three alternative pathways for ion transfer through uterine cells are transcellular, vesicular and potentially paracellular. They could function asynchronously or together. The major protein candidates of each pathway are indicated at the bottom of the figure. Elements were from Servier Medical Art (https://smart.servier.com/), licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License

Bibliography

1. Hincke MT, Da Silva M, Guyot N, Gautron J, McKee MD, Guabiraba-Brito R, Rehault-Godbert S (2019) Dynamics of Structural Barriers and Innate Immune Components during Incubation of the Avian Egg: Critical Interplay between Autonomous Embryonic Development and Maternal Anticipation. J Innate Immun 11 (2):111-124

2. Nys Y, Hincke MT, Arias JL, Garcia-Ruiz JM, Solomon SE (1999) Avian eggshell mineralization. Poult Avian Biol Rev 10 (3):143-166

3. Nys Y, Hincke MT, Hernandez-Hernandez A, Rodriguez-Navarro AB, Gomez-Morales J, Jonchere V, Garcia-Ruiz JM, Gautron J (2010) Eggshell ultrastructure, properties and the process of mineralization: involvement of organic matrix in the eggshell fabric. Prod Anim 23 (2):143-154

4. Arias JL, Fink DJ, Xiao SQ, Heuer AH, Caplan AI (1993) Biomineralization and eggshells: cell-mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix. Int Rev Cytol 145:217-250

5. Nys Y, Gautron J, Garcia-Ruiz JM, Hincke MT (2004) Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. Cr Palevol 3 (6-7):549-562

6. Nys Y, Guyot N (2011) Egg formation and chemistry. In: publishing W (ed) Improving the safety and quality of eggs and egg products, vol 1. pp 83-132

7. Gautron J, Hincke MT, Nys Y (1997) Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens. Connect Tissue Res 36 (3):195-210

8. 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

9. Addadi L, Raz S, Weiner S (2003) Taking advantage of disorder: Amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralization. Adv Mater 15 (12):959-970

10. Beniash E, Aizenberg J, Addadi L, Weiner S (1997) Amorphous calcium carbonate transforms into calcite during sea urchin larval spicule growth. P Roy Soc B-Biol Sci 264 (1380):461-465

11. Aizenberg J, Lambert G, Addadi L, Weiner S (1996) Stabilization of amorphous calcium carbonate by specialized macromolecules in biological and synthetic precipitates. Adv Mater 8 (3):222-226

12. Beniash E, Addadi L, Weiner S (1999) Cellular control over spicule formation in sea urchin embryos: A structural approach. J Struct Biol 125 (1):50-62

13. Weiner S, Dove PM (2003) An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. Rev Mineral Geochem 54:1-29

14. 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 (1):43-48

15. Ziegler A (1994) Ultrastructure and Electron Spectroscopic Diffraction Analysis of the Sternal

Calcium Deposits of Porcellio Scaber Latr (Isopoda, Crustacea). J Struct Biol 112 (2):110-116

16. Brecevic L, Nielsen AE (1989) Solubility of Amorphous Calcium-Carbonate. J Cryst Growth 98 (3):504-510

17. Aizenberg J, Lambert G, Weiner S, Addadi L (2002) Factors involved in the formation of amorphous and crystalline calcium carbonate: A study of an ascidian skeleton. J. Am. Chem. Soc 124 (1):32-39

18. Addadi L, Joester D, Nudelman F, Weiner S (2006) Mollusk shell formation: A source of new concepts for understanding biomineralization processes. Chem-Eur J 12 (4):981-987

19. Bahn SY, Jo BH, Choi YS, Cha HJ (2017) Control of nacre biomineralization by Pif80 in pearl oyster. Sci Adv 3 (8)

20. Mass T, Giuffre AJ, Sun CY, Stifler CA, Frazier MJ, Neder M, Tamura N, Stan CV, Marcus MA, Gilbert P (2017) Amorphous calcium carbonate particles form coral skeletons. Proc Natl Acad Sci 114 (37):E7670-E7678

21. Tester CC, Brock RE, Wu CH, Krejci MR, Weigand S, Joester D (2011) In vitro synthesis and stabilization of amorphous calcium carbonate (ACC) nanoparticles within liposomes. Crystengcomm 13 (12):3975-3978

22. Ihli J, Wong WC, Noel EH, Kim YY, Kulak AN, Christenson HK, Duer MJ, Meldrum FC (2014) Dehydration and crystallization of amorphous calcium carbonate in solution and in air. Nat Commun 5

23. Rodriguez-Navarro AB, Marie P, Nys Y, Hincke MT, Gautron J (2015) Amorphous calcium carbonate controls avian eggshell mineralization: A new paradigm for understanding rapid eggshell calcification. J Struct Biol 190 (3):291-303

24. Stapane L, Le Roy N, Hincke MT, Gautron J (2019) The glycoproteins EDIL3 and MFGE8 regulate vesicle - mediated eggshell calcification in a new model for avian biomineralisation. J Biol Chem

25. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Curr Protoc Cell Biol Chapter 3:Unit 3 22

26. Gautron J, Hincke MT, Panheleux M, Garcia-Ruiz JM, Boldicke T, Nys Y (2001) Ovotransferrin is a matrix protein of the hen eggshell membranes and basal calcified layer. Connect Tissue Res 42 (4):255-267

27. 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

28. Macias-Sanchez E, Willinger MG, Pina CM, Checa AG (2017) Transformation of ACC into aragonite and the origin of the nanogranular structure of nacre. Sci Rep 7

29. Klosowski MM, Friederichs RJ, Nichol R, Antolin N, Carzaniga R, Windl W, Best SM, Shefelbine SJ, McComb DW, Porter AE (2015) Probing carbonate in bone forming minerals on the nanometre scale. Acta Biomater 20:129-139

30. Balcerzak M, Malinowska A, Thouverey C, Sekrecka A, Dadlez M, Buchet R, Pikula S (2008) Proteome analysis of matrix vesicles isolated from femurs of chicken embryo. Proteomics 8 (1):192-205

31. Shapiro IM, Landis WJ, Risbud MV (2015) Matrix vesicles: Are they anchored exosomes? Bone 79:29-36

32. Rosenthal AK, Gohr CM, Ninomiya J, Wakim BT (2011) Proteomic analysis of articular cartilage vesicles from normal and osteoarthritic cartilage. Arthritis Rheum 63 (2):401-411

33. Thouverey C, Malinowska A, Balcerzak M, Strzelecka-Kiliszek A, Buchet R, Dadlez M, Pikula S (2011) Proteomic characterization of biogenesis and functions of matrix vesicles released from mineralizing human osteoblast-like cells. J Proteomics 74 (7):1123-1134

34. Colombo M, Raposo G, Thery C (2014) Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. Annu Rev Cell Dev Bi 30:255-289

35. Azoidis I, Cox SC, Davies OG (2018) The role of extracellular vesicles in biomineralisation: current perspective and application in regenerative medicine. J Tissue Eng 9

36. Hessvik NP, Llorente A (2018) Current knowledge on exosome biogenesis and release. Cell Mol Life Sci 75 (2):193-208

37. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G (2018) Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Nat Rev Mol Cell Bio 19 (4):213-228

38. Pathan M, Fonseka P, Chitti SV, Kang T, Sanwlani R, Van Deun J, Hendrix A, Mathivanan S (2019) Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. Nucleic Acids Res 47 (D1):D516-D519

39. Hasegawa T, Yamamoto T, Tsuchiya E, Hongo H, Tsuboi K, Kudo A, Abe M, Yoshida T, Nagai T, Khadiza N, Yokoyama A, Oda K, Ozawa H, de Freitas PHL, Li M, Amizuka N (2017) Ultrastructural and biochemical aspects of matrix vesicle-mediated mineralization. Jpn Dent Sci Rev 53 (2):34-45

40. Golub EE (2009) Role of matrix vesicles in biomineralization. Biochim Biophys Acta 1790 (12):1592-1598

41. Nys Y, Le Roy N (2018) Calcium Homeostasis and Eggshell Biomineralization in Female Chicken. In: Feldman D (ed) Vitamin D (Fourth Edition), vol Volume 1: Biochemistry, Physiology and Diagnostics. pp 361-382

42. 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

43. Gloux A, Le Roy N, Brionne A, Bonin E, Juanchich A, Benzoni G, Piketty ML, Prie D, Nys Y, Gautron J, Narcy A, Duclos MJ (2019) Candidate genes of the transcellular and paracellular calcium absorption pathways in the small intestine of laying hens. Poult Sci

44. Weiner S, Addadi L (2011) Crystallization Pathways in Biomineralization. Annu Rev Mater Res 41:21-40

45. Bottini M, Mebarek S, Anderson KL, Strzelecka-Kiliszek A, Bozycki L, Simao AMS, Bolean M, Ciancaglini P, Pikula JB, Pikula S, Magne D, Volkmann N, Hanein D, Millan JL, Buchet R (2018) Matrix vesicles from chondrocytes and osteoblasts: Their biogenesis, properties, functions and biomimetic models. Biochim Biophys Acta Gen Subj 1862 (3):532-546

46. Nys Y, Zawadzki J, Gautron J, Mills AD (1991) Whitening of brown-shelled eggs: mineral composition of uterine fluid and rate of protoporphyrin deposition. Poult Sci 70 (5):1236-1245

47. Kim CW, Lee HM, Lee TH, Kang CH, Kleinman HK, Gho YS (2002) Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin. Cancer Res 62 (21):6312-6317

48. Gho YS, Lee C (2017) Emergent properties of extracellular vesicles: a holistic approach to decode the complexity of intercellular communication networks. Mol Biosyst 13 (7):1291-1296

49. Gho YS, Lee J (2019) Special issue on the role of extracellular vesicles in human diseases. Exp Mol Med 51

50. Pomatto MAC, Gai C, Bussolati B, Camussi G (2017) Extracellular Vesicles in Renal Pathophysiology. Front Mol Biosci 4

51. Basso M, Bonetto V (2016) Extracellular Vesicles and a Novel Form of Communication in the Brain. Front Neurosci 10

52. Barreiro K, Holthofer H (2017) Urinary extracellular vesicles. A promising shortcut to novel biomarker discoveries. Cell Tissue Res 369 (1):217-227

53. Kalra H, Drummen GPC, Mathivanan S (2016) Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. Int J Mol Sci 17 (2)

54. Waqas MY, Yang P, Ahmed N, Zhang Q, Liu T, Li Q, Hu L, Hong C, Chen Q (2016) Characterization of the ultrastructure in the uterovaginal junction of the hen. Poultry Sci 95 (9):2112-2119

55. Hincke MT, Nys Y, Gautron J (2010) The Role of Matrix Proteins in Eggshell Formation. J Poult Sci 47 (3):208-219

56. Hincke MT, Nys Y, Gautron J, Mann K, Rodriguez-Navarro AB, McKee MD (2012) The eggshell: structure, composition and mineralization. Front Biosci (Landmark Ed) 17:1266-1280

57. Gautron J, Nys Y (2007) Function of Eggshell Matrix Proteins. In: Springer (ed) Bioactive Egg Compounds. pp 109-115

58. Gautron J (2019) Proteomics Analysis of Avian Eggshell Matrix Proteins: Toward New Advances on Biomineralization. Proteomics 19 (13)

59. 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. P Natl Acad Sci USA 111 (1):39-44

60. Vidavsky N, Masic A, Schertel A, Weiner S, Addadi L (2015) Mineral-bearing vesicle transport in sea urchin embryos. J Struct Biol 192 (3):358-365

61. Mahamid J, Sharir A, Gur D, Zelzer E, Addadi L, Weiner S (2011) Bone mineralization proceeds through intracellular calcium phosphate loaded vesicles: A cryo-electron microscopy study. J Struct Biol 174 (3):527-535

62. Gay CV, Schraer H, Hargest TE (1978) Ultrastructure of Matrix Vesicles and Mineral in Unfixed Embryonic Bone. Metab Bone Dis Relat 1 (2):105-108

63. Wu LN, Yoshimori T, Genge BR, Sauer GR, Kirsch T, Ishikawa Y, Wuthier RE (1993) Characterization of the nucleational core complex responsible for mineral induction by growth plate cartilage matrix vesicles. J Biol Chem 268 (33):25084-25094

64. Anderson HC, Garimella R, Tague SE (2005) The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. Front Biosci-Landmrk 10:822-837

65. Khalifa G, Kahil K, Addadi L, Weiner S (2018) Calcium Ion and Mineral Pathways in Biomineralization: A Perspective. In: Endo K, Kogure T, Nagasawa H (eds) Biomineralization. Springer, pp 97-103

66. Rojas E, Arispe N, Haigler HT, Burns AL, Pollard HB (1992) Identification of Annexins as Calcium Channels in Biological-Membranes. Bone Miner 17 (2):214-218

67. Wuthier RE, Lipscomb GF (2011) Matrix vesicles: structure, composition, formation and function in calcification. Front Biosci-Landmrk 16:2812-2902

68. Cao X, Genge BR, Wu LN, Buzzi WR, Showman RM, Wuthier RE (1993) Characterization, cloning and expression of the 67-kDA annexin from chicken growth plate cartilage matrix vesicles. Biochem Biophys Res Commun 197 (2):556-561

69. Arispe N, Rojas E, Genge BR, Wu LN, Wuthier RE (1996) Similarity in calcium channel activity of annexin V and matrix vesicles in planar lipid bilayers. Biophys J 71 (4):1764-1775

70. Mann K, Macek B, Olsen JV (2006) Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer. Proteomics 6 (13):3801-3810

71. Marie P, Labas V, Brionne A, Harichaux G, Hennequet-Antier C, Rodriguez-Navarro AB, Nys Y, Gautron J (2015) Quantitative proteomics provides new insights into chicken eggshell matrix protein functions during the primary events of mineralisation and the active calcification phase. J Proteomics 126:140-154

72. Sun C, Xu G, Yang N (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

73. Cordeiro CMM, Hincke MT (2016) Quantitative proteomics analysis of eggshell membrane proteins

during chick embryonic development. J Proteomics 130:11-25

74. Gerke V, Moss SE (2002) Annexins: from structure to function. Physiol Rev 82 (2):331-371

75. Hassan MI, Shajee B, Waheed A, Ahmad F, Sly WS (2013) Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. Bioorgan Med Chem 21 (6):1570-1582

76. Le Roy N, Jackson DJ, Marie B, Ramos-Silva P, Marin F (2014) The evolution of metazoan alpha-carbonic anhydrases and their roles in calcium carbonate biomineralization. Front Zool 11

77. Supuran CT (2008) Carbonic anhydrases - An overview. Curr Pharm Design 14 (7):603-614

78. Stechschulte DJ, Jr., Morris DC, Silverton SF, Anderson HC, Vaananen HK (1992) Presence and specific concentration of carbonic anhydrase II in matrix vesicles. Bone Miner 17 (2):187-191

79. Rose-Martel M, Smiley S, Hincke MT (2015) Novel identification of matrix proteins involved in calcitic biomineralization. J Proteomics 116:81-96

80. Rose-Martel M, Du JW, Hincke MT (2012) Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle. J Proteomics 75 (9):2697-2706

81. Kaweewong K, Garnjanagoonchorn W, Jirapakkul W, Roytrakul S (2013) Solubilization and identification of hen eggshell membrane proteins during different times of chicken embryo development using the proteomic approach. Protein J 32 (4):297-308

82. Miksik I, Sedlakova P, Lacinova K, Pataridis S, Eckhardt A (2010) Determination of insoluble avian eggshell matrix proteins. Anal. Bioanal. Chem 397 (1):205-214

83. Mann K, Mann M (2013) The proteome of the calcified layer organic matrix of turkey (Meleagris gallopavo) eggshell. Proteome Sci 11

84. Miksik I, Ergang P, Pacha J (2014) Proteomic analysis of chicken eggshell cuticle membrane layer. Anal Bioanal Chem 406 (29):7633-7640

85. Mann K (2015) The calcified eggshell matrix proteome of a songbird, the zebra finch (Taeniopygia guttata). Proteome Sci 13

86. Mann K, Mann M (2015) Proteomic analysis of quail calcified eggshell matrix: a comparison to chicken and turkey eggshell proteomes. Proteome Sci 13:22

87. Ahmed TA, Suso HP, Hincke MT (2017) In-depth comparative analysis of the chicken eggshell membrane proteome. J Proteomics 155:49-62

88. Zhu F, Zhang F, Hincke M, Yin ZT, Chen SR, Yang N, Hou ZC (2019) iTRAQ-Based Quantitative Proteomic Analysis of Duck Eggshell During Biomineralization. Proteomics:e1900011

89. Xiao Z, Camalier CE, Nagashima K, Chan KC, Lucas DA, de la Cruz MJ, Gignac M, Lockett S, Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Beck GR, Jr. (2007) Analysis of the extracellular matrix vesicle proteome in mineralizing osteoblasts. J Cell Physiol 210 (2):325-335

90. Blin G, Margeat E, Carvalho K, Royer CA, Roy C, Picart C (2008) Quantitative analysis of the binding of ezrin to large unilamellar vesicles containing phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate. Biophys. J 94 (3):1021-1033

91. Alberic M, Bertinetti L, Zou ZY, Fratzl P, Habraken W, Politi Y (2018) The Crystallization of Amorphous Calcium Carbonate is Kinetically Governed by Ion Impurities and Water. Adv Sci 5 (5)

92. Konrad F, Purgstaller B, Gallien F, Mavromatis V, Gane P, Dietzel M (2018) Influence of aqueous Mg concentration on the transformation of amorphous calcium carbonate. J Cryst Growth 498:381-390

93. Rodriguez-Blanco JD, Shaw S, Bots P, Roncal-Herrero T, Benning LG (2012) The role of pH and Mg on the stability and crystallization of amorphous calcium carbonate. J Alloy Compd 536:S477-S479

94. Gong YUT, Killian CE, Olson IC, Appathurai NP, Amasino AL, Martin MC, Holt LJ, Wilt FH, Gilbert PUPA (2012) Phase transitions in biogenic amorphous calcium carbonate. P Natl Acad Sci USA 109 (16):6088-6093

95. Falini G, Fermani S, Goffredo S (2015) Coral biomineralization: A focus on intra-skeletal organic matrix and calcification. Semin Cell Dev Biol 46:17-26

96. Politi Y, Mahamid J, Goldberg H, Weiner S, Addadi L (2007) Asprich mollusk shell protein: in vitro experiments aimed at elucidating function in CaCO3 crystallization. Crystengcomm 9 (12):1171-1177

97. Miksik I, Eckhardt A, Sedlakova P, Mikulikova K (2007) Proteins of insoluble matrix of Avian (Gallus Gallus) eggshell. Connect Tissue Res 48 (1):1-8

98. Hincke MT, Gautron J, Panheleux M, Garcia-Ruiz J, McKee MD, Nys Y (2000) Identification and localization of lysozyme as a component of eggshell membranes and eggshell matrix. Matrix Biol 19 (5):443-453

99. Lakshminarayanan R, Loh XJ, Gayathri S, Sindhu S, Banerjee Y, Kini RM, Valiyaveettil S (2006) Formation of transient amorphous calcium carbonate precursor in quail eggshell mineralization: An in vitro study. Biomacromolecules 7 (11):3202-3209

100. Voinescu AE, Touraud D, Lecker A, Pfitzner A, Kunz W, Ninham BW (2007) Mineralization of CaCO3 in the presence of egg white lysozyme. Langmuir 23 (24):12269-12274

101. Wang XQ, Sun HL, Xia YQ, Chen CX, Xu H, Shan HH, Lu JR (2009) Lysozyme mediated calcium carbonate mineralization. J Colloid Interf Sci 332 (1):96-103

102. Wolf SE, 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 (32):12642-12649

103. Dombre C, Guyot N, Moreau T, Monget P, Da Silva M, Gautron J, Rehault-Godbert S (2017) Egg serpins: The chicken and/or the egg dilemma. Semin Cell Dev Biol 62:120-132

104. Hincke MT (1995) Ovalbumin is a component of the chicken eggshell matrix. Connect Tissue Res 31 (3):227-233

105. Pipich V, Balz M, Wolf SE, 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 (21):6879-6892

106. Schwahn D, Balz M, Tremel W (2004) Crystallization of the CaCO(3) mineral in the presence of the protein ovalbumin. Physica B 350 (1-3):E947-E949

107. Wang XQ, Wu CM, Tao K, Zhao K, Wang JQ, Xu H, Xia DH, Shan HH, Lu JR (2010) Influence of Ovalbumin on CaCO3 Precipitation during in Vitro Biomineralization. J Phys Chem B 114 (16):5301-5308

108. Wang X, Kong R, Pan X, Xu H, Xia D, Shan H, Lu JR (2009) Role of ovalbumin in the stabilization of metastable vaterite in calcium carbonate biomineralization. J Phys Chem B 113 (26):8975-8982

109. Mann K, Mann M (2008) The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. Proteomics 8 (1):178-191

110. Guérin-Dubiard C, Anton M, Gautron J, Nys Y, Nau F (2010) Composition de l'oeuf. In: Lavoisier (ed) Science et technologie de l'oeuf, vol 2. pp 1-169

111. Mann K, Gautron J, Nys Y, McKee MD, Bajari T, Schneider WJ, Hincke MI (2003) Disulfide-linked heterodimeric clusterin is a component of the chicken eggshell matrix and egg white. Matrix Biol 22 (5):397-407

112. Gautron J, Nys Y (2007) Eggshell matrix proteins. In: Springer (ed) Bioactive egg compounds. pp 103-108

113. Hodges RD, Lörcher K (1967) Possible Sources of the Carbonate Fraction of Egg Shell Calcium Carbonate. Nature 216:609-610

114. Zhu XL, Sly WS (1990) Carbonic anhydrase IV from human lung. Purification, characterization, and comparison with membrane carbonic anhydrase from human kidney. J Biol Chem 265 (15):8795-8801

115. Sah N, Kuehu DL, Khadka VS, Deng Y, Peplowska K, Jha R, Mishra B (2018) RNA sequencing-based analysis of the laying hen uterus revealed the novel genes and biological pathways involved in the eggshell biomineralization. Sci Rep 8 (1):16853

116. Yin Z, Lian L, Zhu F, Zhang ZH, Hincke M, Yang N, Hou ZC (2019) The transcriptome landscapes of ovary and three oviduct segments during chicken (Gallus gallus) egg formation. Genomics

117. Wu LN, Genge BR, Sauer GR, Wuthier RE (1996) Characterization and reconstitution of the nucleational complex responsible for mineral formation by growth plate cartilage matrix vesicles. Connect Tissue Res 35 (1-4):309-315

118. Kirsch T, Claassen H (2000) Matrix vesicles mediate mineralization of human thyroid cartilage. Calcif Tissue Int 66 (4):292-297

119. Kirsch T, Harrison G, Golub EE, Nah HD (2000) The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage. J Biol Chem 275 (45):35577-35583

120. Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL, McNair R, Jones GT, Sidibe A, Schurgers LJ, Skepper JN, Proudfoot D, Mayr M, Shanahan CM (2011) Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. Circ Res 109 (1):e1-12

121. Cui L, Houston DA, Farquharson C, MacRae VE (2016) Characterisation of matrix vesicles in skeletal and soft tissue mineralisation. Bone 87:147-158

122. Davies OG, Cox SC, Williams RL, Tsaroucha D, Dorrepaal RM, Lewis MP, Grover LM (2017) Annexin-enriched osteoblast-derived vesicles act as an extracellular site of mineral nucleation within developing stem cell cultures. Sci Rep 7

123. Yang KT, Lin CY, Liou JS, Fan YH, Chiou SH, Huang CW, Wu CP, Lin EC, Chen CF, Lee YP, Lee WC, Ding ST, Cheng WTK, Huang MC (2007) Differentially expressed transcripts in shell glands from low and high egg production strains of chickens using cDNA microarrays. Anim Reprod Sci 101 (1-2):113-124

V. *Discussion et perspectives*

« Le passé est un œuf cassé, l'avenir est un œuf couvé »

Paul Eluard

1. Discussion générale

1.1. Rappels du contexte de mon travail de thèse

Mes recherches ont eu lieu dans un laboratoire de l'INRA au sein d'une équipe qui s'intéresse aux mécanismes de formation de l'œuf de poule, à la fonction des composants de l'œuf, et à la variabilité de leurs constituants et de leurs activités biologiques. Mon travail a porté sur l'étude du mécanisme de formation de la coquille d'œuf de poule. Ce processus de biominéralisation qui permet l'élaboration d'un biomatériau composite aux propriétés mécaniques remarquables (Nys *et al.* 2004, Hincke *et al.* 2012), se produit en plusieurs étapes *via* des interactions entre les précurseurs minéraux et organiques de la coquille, sécrétés dans le fluide utérin (Nys *et al.* 1991, Nys *et al.* 2010).

La solidité de la coquille est un sujet important pour les producteurs (6-8 % d'œufs déclassés) et pour les consommateurs (protection physique et barrière antimicrobienne). La nutrition optimisée et les progrès en terme de génétique des poules ont permis des gains importants sur la qualité de coquille en terme de masse. Toutefois, à masse et poids d'œufs équivalents, les coquilles peuvent présenter des propriétés mécaniques différentes. Dans la revue bibliographique de ce manuscrit, nous avons rappelé les paramètres prépondérants de la qualité de coquille (Nys *et al.* 2010), telles que l'épaisseur et la quantité de coquille qui expliquent environ 60 % de la variabilité de sa solidité (Richards et Swanson 1965). Toutefois, la variabilité des paramètres de qualité de coquille est également liée à la microstructure (Rodriguez-Navarro *et al.* 2002, Rodriguez-Navarro *et al.* 2007, Nys *et al.* 2010), et associée à une modification de la proportion de certaines protéines de la matrice (Panheleux *et al.* 1999a, Rodriguez-Navarro et Romanek 2002, Ahmed *et al.* 2005). La matrice organique joue un rôle prépondérant dans ce processus de formation de la coquille d'œuf de poule (Nys *et al.* 2001, Nys *et al.* 2004, Gautron et Nys 2007a, Gautron et Nys 2007b). Dans la revue bibliographique, nous avons vu que la matrice organique sélectionne le type polymorphique et modifie la taille, le nombre et la morphologie des cristaux qui composent la coquille (Dominguez-Vera *et al.* 2000, Panheleux *et al.* 2000, Nys *et al.* 2004, Hernandez-Hernandez *et al.* 2008a, Hernandez-Hernandez *et al.* 2008c, Hincke *et al.* 2012). Une amélioration des paramètres mécaniques de la coquille nécessite désormais des études mécanistiques approfondies sur ces acteurs moléculaires du processus de biominéralisation, qui constituent des marqueurs biologiques de la solidité de la coquille.

Dans le but d'explorer le rôle de la matrice organique dans le processus de minéralisation de la coquille, de nombreuses études ont permis l'identification de ses constituants. Les premières analyses qui étaient basées sur des méthodes moléculaires et biochimiques ont conduit à l'identification de 11 protéines de la matrice organique (Gautron et Nys 2007a, Gautron et Nys 2007b, Rose et Hincke 2009). Les analyses à haut débit ont ensuite considérablement accéléré l'identification des protéines de la matrice organique de la coquille (Gautron *et al.* 2010). Les différentes couches de la coquille ont ainsi été explorées afin de caractériser leur constituants protéiques (Mann *et al.* 2006, Mann *et al.* 2007, Miksik *et al.* 2010, Rose-Martel *et al.* 2012, Kaweewong *et al.* 2013, Sun *et al.* 2013, Miksik *et al.* 2014, Marie *et al.* 2015b, Cordeiro et Hincke 2016, Ahmed *et al.* 2017). Au total, environ 900 protéines non-redondantes ont été identifiées dans la matrice organique de coquille d'œuf de poule (Gautron 2019). De manière à dépasser l'étape de criblage moléculaire et afin de hiérarchiser les protéines de la matrice organique, les études qualitatives ont été complétées par des études quantitatives et prédictives des fonctions de ces protéines dans le processus de formation de la coquille.

1.2. Les protéines EDIL3 / MFGE8 dans la coquille d'œuf de poule

Une étude de protéomique quantitative a évalué l'abondance des protéines de la matrice organique de la coquille aux différents stades clefs du processus de minéralisation (Marie *et al.* 2015b). Cette étude a notamment mentionné 22 protéines clefs du processus de minéralisation de la coquille, dont l'analyse des prédictions fonctionnelles ont permis un classement en 2 groupes : (1) les protéines qui interviennent directement dans le processus de minéralisation et (2) les protéines qui interviennent indirectement dans le processus de minéralisation en régulant l'activité des protéines minéralisantes (Marie *et al.* 2015b). Parmi les protéines du 1er groupe, EDIL3 et MFGE8 sont deux protéines, rapportées dans la majorité des études à haut débit (Mann *et al.* 2006, Miksik *et al.* 2010, Rose-Martel *et al.* 2012, Kaweewong *et al.* 2013, Sun *et al.* 2013, Miksik *et al.* 2014, Marie *et al.* 2015b, Ahmed *et al.* 2017). EDIL3 est la 6ème protéine de la matrice organique en terme d'abondance et son gène est trois fois plus exprimé que la moyenne des gènes utérins impliqués dans la minéralisation. De son côté MFGE8 est la 34ème protéine de la matrice organique en terme d'abondance et son gène est deux fois plus exprimé que la moyenne des gènes utérins (Marie *et al.* 2015b). Une étude comparative a également révélé la surabondance de la protéine MFGE8 dans le protéome des coquilles de bonne qualité par comparaison à des coquilles de faible qualité (Sun *et al.* 2013).

Le travail conduit dans cette thèse a permis de confirmer la présence des protéines EDIL3 et MFGE8 dans la matrice organique de la coquille, le fluide utérin et l'utérus de la poule. Il a été complété par des études d'expression montrant une surexpression du gène *Edil3* au niveau des segments de l'oviducte responsables de la formation de la coquille par comparaison aux autres tissus explorés. Ce gène est aussi surexprimé à 6 h et 7 h post-ovulation, lorsque le carbonate de calcium amorphe se transforme en calcite, le polymorphe cristallin de la coquille (Rodriguez-Navarro *et al.* 2015). Ce résultat est en accord avec la forte abondance de la protéine EDIL3 repérée à 6 h et 7 h post-ovulation au niveau de la matrice organique de coquille en formation (Marie *et al.* 2015b). La protéine EDIL3 semble jouer un rôle central au moment de l'initiation de la minéralisation, lorsque l'ACC se transforme en calcite. Toutefois, la protéine a également été rapportée durant la phase active de minéralisation (3ème protéine à 16 h p.o.), ce qui laisse suggérer un rôle pour cette protéine tout au long du processus. Ces observations sont confortées par une analyse des résultats de données de RNA-Seq et de protéomique (Gautron 2017a) qui indiquent une forte expression d'*Edil3* dans l'utérus au cours du processus de minéralisation.

L'analyse d'expression de *Mfge8* n'a pas montré une expression spécifique dans les segments responsables de la minéralisation de la coquille pour ce gène. En effet, une surexpression de *Mfge8* dans le foie a été retrouvée chez la poule. Aucune variation d'expression n'a été identifiée pour *Mfge8* dans l'isthme rouge et l'utérus à tous les stades de la minéralisation. Chez les mammifères, MFGE8 est impliquée dans l'adhésion entre le spermatozoïde et la zone pellucide (Raymond *et al.* 2009). Dans l'œuf d'oiseau, la membrane vitelline qui entoure le jaune contient des protéines de la zone pellucide qui proviennent du foie (Nys et Guyot 2011). Par conséquent, MFGE8 pourrait jouer un rôle dans l'adhésion du spermatozoïde comme c'est le cas chez les mammifères. Par western blot, MFGE8 est retrouvée dans l'utérus, mais aussi dans le duodénum qui est impliqué dans l'absorption du calcium alimentaire afin de fournir les ions nécessaires à la formation de la coquille et de l'os (Nys *et al.* 1986, Nys et Le Roy 2018).

Ces études d'expression des gènes et d'abondance des protéines conduites au cours de cette thèse, ont confirmé la sécrétion et l'accumulation de MFGE8 et EDIL3 lors de la biominéralisation de la coquille. Toutefois, nos études indiquent clairement une abondance et une expression d'EDIL3 spécifiquement dans les tissus et organes impliqués dans la biominéralisation. MFGE8 semble plus ubiquitaire et par conséquent, son rôle dans la coquille apparait comme étant moins central, par rapport à celui d'EDIL3. Si leur importance dans la coquille est clairement démontrée, leur rôle fonctionnel dans le processus de minéralisation

restait jusqu'ici essentiellement spéculatif. Ainsi, la suite de mon travail de thèse a été de mieux caractériser ces 2 protéines et leur rôle dans la formation de la coquille des œufs.

1.3. EDIL3 et MFGE8 possèdent une histoire évolutive commune

Les protéines EDIL3 et MFGE8 des mammifères présentent un fort degré d'homologie (Hanayama *et al.* 2004a, Oshima *et al.* 2014). Nous avons réalisé une analyse des séquences nucléotidiques et protéiques d'EDIL3 et MFGE8 de la poule, qui a confirmé que ces deux protéines étaient apparentées (54 % d'identité et 69 % de similarité). Chez les oiseaux, nous avons observé que le gène *Edil3* est situé sur le chromosome Z et le gène *Mfge8* est localisé sur un chromosome non sexuel. Ces 2 gènes sont nichés dans des clusters synténiques contenant *Hapln1* (hyaluronan and proteoglycan link protein 1) et *Vcan* (versicane) pour *Edil3* et *Hapln3* (hyaluronan and proteoglycan link protein 3) et *Acan* (aggrécane) pour *Mfge8.* De manière intéressante, les protéines HAPLN3 et HAPLN1 ont aussi été identifiées dans la coquille d'œuf de poule (Marie *et al.* 2015b, Cordeiro et Hincke 2016). De plus, des QTLs affectant la qualité de coquille ont précédemment été repérés sur le chromosome Z de la poule (Tuiskula-Haavisto *et al.* 2002, Ankra-Badu et Aggrey 2005, Tuiskula-Haavisto *et al.* 2011, Rome et Le Roy 2016). Par ailleurs, les protéines HAPLN1, ACAN et VCAN correspondent également à des protéines de la matrice cartilagineuse (Kiani *et al.* 2002, Shibata *et al.* 2003, Matsumoto *et al.* 2006). L'ensemble des gènes de chaque cluster est alors impliqué dans un phénomène de minéralisation.

L'analyse phylogénétique des protéines EDIL3 et MFGE8 chez les eumétazoaires a permis d'identifier une distinction entre *Edil3* et *Mfge8* des vertébrés émergeant il y a environ 480 millions d'années, qui a conduit à une divergence/diversification des séquences des gènes *Edil3* et *Mfge8* des vertébrés (**Figure 41**). Cet évènement de duplication s'est produit avant l'apparition de l'œuf amniotique qui a eu lieu, il y a environ 350 millions d'années, lors de la divergence des amphibiens (œufs non calcifiés) et des reptiles (œufs amniotiques calcifiés) (Romer 1957, Packard et Seymour 1997).

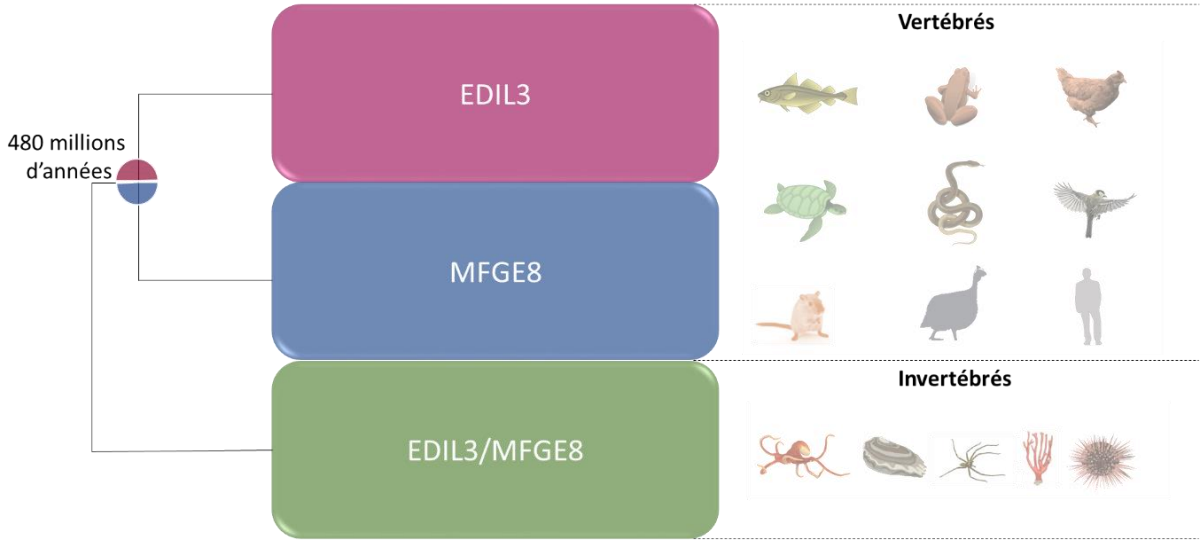


Figure 41. Arbre phylogénétique simplifié retraçant l'histoire évolutive des protéines EDIL3 et MFGE8. L'arbre initial a été généré *via* les méthodes de maximum de vraisemblance et bayésienne, en combinaison (**Article 1**).

1.4. Analyse structurale des domaines fonctionnels d'EDIL3 et MFGE8

A travers notre étude de synténie, nous avons montré que ces deux clusters de gènes (*Edil3* et *Mfge8*), impliqués dans la calcification, sont hautement conservés chez les vertébrés. D'autres clusters de gènes sont connus pour avoir un rôle clef dans la biominéralisation des bactéries ou des vertébrés (Barabesi *et al.* 2007, Kawasaki 2009, Kawasaki et Amemiya 2014). C'est le cas des gènes de la famille SCPP (Secretory Calcium-binding PhosphoProtein). Les protéines codées par cette famille de gènes possèdent des capacités de liaison au calcium et sont impliquées dans la minéralisation de l'os et de la dentine chez les vertébrés (Kawasaki et Weiss 2003). Chez l'homme, les gènes encodant les SCPPs sont regroupés en deux clusters situés sur le même chromosome, alors que chez les sauropsidés (reptiles et oiseaux), les deux clusters résident sur des chromosomes différents (Kawasaki *et al.* 2004, Al-Hashimi *et al.* 2010, Kawasaki et Amemiya 2014). Les événements de duplication de génome qui ont eu lieu très tôt dans la lignée des vertébrés, en combinaison avec des duplications de gènes en tandem, ont permis la diversification et l'évolution de cette famille (Kawasaki *et al.* 2004). Ces gènes ont ainsi été recrutés à la suite de duplications successives d'un gène ancestral.

Dans la revue bibliographique, nous avons décrits les domaines fonctionnels connus des protéines MFGE8 et EDIL3. Ces deux protéines sont composées de domaines EGF-like du côté N-terminal et de domaines F5/8C du côté C-terminal (Stubbs *et al.* 1990, Larocca *et al.* 1991, Hanayama *et al.* 2004a). A travers notre analyse des domaines fonctionnelles qui composent les protéines EDIL3 et MFGE8, nous avons confirmé que le nombre de domaines EGF-like et

F5/8C varient en fonction des espèces (Podlaha *et al.* 2006, Oshima *et al.* 2014). Chez les mammifères, les protéines EDIL3 et MFGE8 présentent une capacité de se lier aux intégrines *via* un motif RGD situé dans le second EGF-like, ainsi qu'un domaine de liaison au calcium *via* leur troisième EGF-like. Par ailleurs, un site de liaison aux phospholipides (PS-binding) a été décrit uniquement pour les séquences mammaliennes *via* leur second F5/8C (Andersen *et al.* 1997, Ensslin et Shur 2003, Hanayama *et al.* 2004a, Schurpf *et al.* 2012, Ye *et al.* 2013). Ce domaine de liaison aux phospholipides permet ainsi à la protéine MFGE8 des mammifères de se lier aux lipides des membranes des vésicules (Thery *et al.* 1999, Oshima *et al.* 2002, Otzen *et al.* 2012). Au cours de cette thèse, nous avons conduit une analyse structurale des protéines EDIL3 et MFGE8 de *Gallus gallus*, afin de caractériser leurs domaines fonctionnels et déterminer leurs capacités de liaisons moléculaires (**Chapitre 1**). Chez la poule, les protéines EDIL3 et MFGE8 contiennent trois domaines EGF-like et deux domaines F5/8C (**Figure 42**). L'analyse *in silico* des bases de données confirme le site de liaison au calcium *via* le second domaine EGF-like (**Figure 42**). Ce motif est composé d'environ 40 acides aminés avec 6 résidus cystéines qui forment 3 ponts disulfures, correspondant ainsi à la séquence consensus : nxnnC-x(3,14)-C-x(3,7)-CxxbxxxxaxC-x(1,6)-C-x(8,13)-Cx. Ce motif de liaison au calcium se trouve respectivement en positions 119-143 et 109-133 pour EDIL3 et MFGE8. EDIL3 et MFGE8 présentent aussi des capacités de liaison aux intégrines *via* des motifs RGD. Ces motifs se trouvent dans les domaines EGF-like 1 et 2 d'EDIL3 (22-24 and 96-98), tandis que ce motif est seulement présent dans le second domaine EGF-like pour MFGE8 (position 86-88). Chez les mammifères un site de liaison aux phospholipides (phosphatidylserine–binding ; PS-binding) est également décrit. Toutefois, ce motif n'est pas retrouvé dans les bases de données *in silico* chez les autres espèces animales. Nous avons donc effectué une recherche manuelle de ces motifs dans les séquences protéiques de MFGE8 et EDIL3 chez la poule. Les résidus suivants (K24, W26, F31, K45, Q76, R79, F81, R146), ont été décrits chez la souris comme étant ceux impliqués dans la liaison aux phospholipides (Ye *et al.* 2013). Ces mêmes résidus sont observés en positions 338, 340, 345, 359, 390, 393, 395 and 453 du second domaine F5/8C de MFGE8 chez *Gallus gallus*, tandis que la protéine EDIL3 expose des résidus identiques (R-FKQKFR) en positions 342, 349, 363, 394, 397, 399 and 466 (Figure 5 de **l'article 1** présenté page 132 de ce manuscrit). De plus, l'étude de l'organisation structurale des protéines a permis de confirmer la proximité spatiale des acides aminés impliqués dans les fonctions moléculaires, confortant leur activité. Nos résultats suggèrent donc que les domaines des deux protéines sont fonctionnels. Ainsi, ces deux protéines auraient aussi la capacité de se lier aux phospholipides des membranes chez *Gallus gallus* (**Figure 42**).

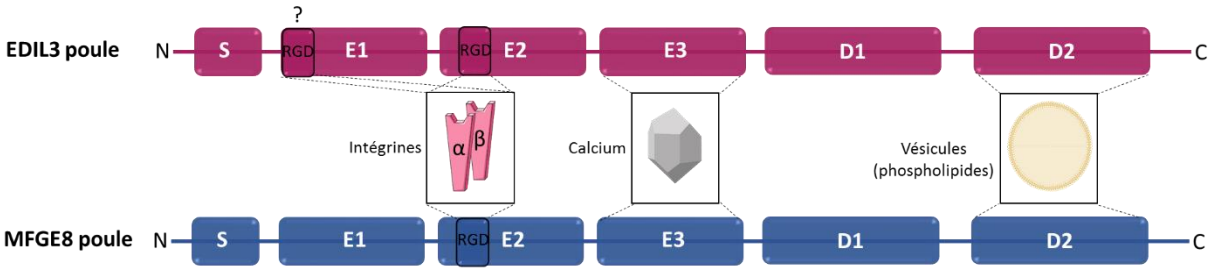


Figure 42. Organisation et fonctions moléculaires des domaines des protéines EDIL3 et MFGE8 de la poule.

1.5. Hypothèse de l'implication d'EDIL3 et MFGE8 dans un transport vésiculaire

Dans la revue bibliographique de ce manuscrit, nous avons décrit la participation des vésicules dans la minéralisation osseuse/cartilagineuse (Anderson 1969, Xiao *et al.* 2007, Golub 2009, Hasegawa *et al.* 2017). En effet, des vésicules contenant du minéral ont été observées dans des cellules osseuses (Mahamid *et al.* 2011, Kerschnitzki *et al.* 2016a). Des vésicules ont également été identifiées dans le système circulatoire et le milieu extracellulaire durant le développement des os longs de l'embryon de poulet (Kerschnitzki *et al.* 2016b). EDIL3 et MFGE8 sont aussi retrouvées dans des vésicules présentes dans le cartilage et/ou les os des mammifères (Rosenthal *et al.* 2011, Shapiro *et al.* 2015). HAPLN1, ACAN et VCAN, qui sont encodées par des gènes adjacents à EDIL3 et MFGE8, sont également identifiées dans ces vésicules (Balcerzak *et al.* 2008, Rosenthal *et al.* 2011, Shapiro *et al.* 2015). MFGE8 est aussi rapportée comme abondante dans les vésicules minéralisantes du fémur d'embryon de poulet (Balcerzak *et al.* 2008).

Chez la poule pondeuse, plusieurs gènes vésiculaires sont identifiés comme fortement exprimés dans l'utérus par une analyse RNA-seq (Gautron 2017a). Plusieurs études rapportent la présence de structures sphériques de type vésiculaire dans la coquille d'œuf (Dennis *et al.* 1996, Fraser *et al.* 1998, Nys *et al.* 1999) et observées au niveau de la matrice organique de coquilles décalcifiées *via* des études de microscopie électronique (**Figure 43A et B**) (Dennis *et al.* 1996, Fraser *et al.* 1998, Hincke *et al.* 2008). Ces structures sont repérées dans toute la couche palissadique et dans la partie supérieure des noyaux mamillaires. De nombreuses structures vides de forme sphérique ont également été remarqués dans l'ensemble de la couche palissadique de coquille calcifiée (**Figure 43C**) (Hincke *et al.* 2008, Chien *et al.* 2009). Ces vides sphériques pourraient être les traces de vésicules préalablement piégées dans le minéral.

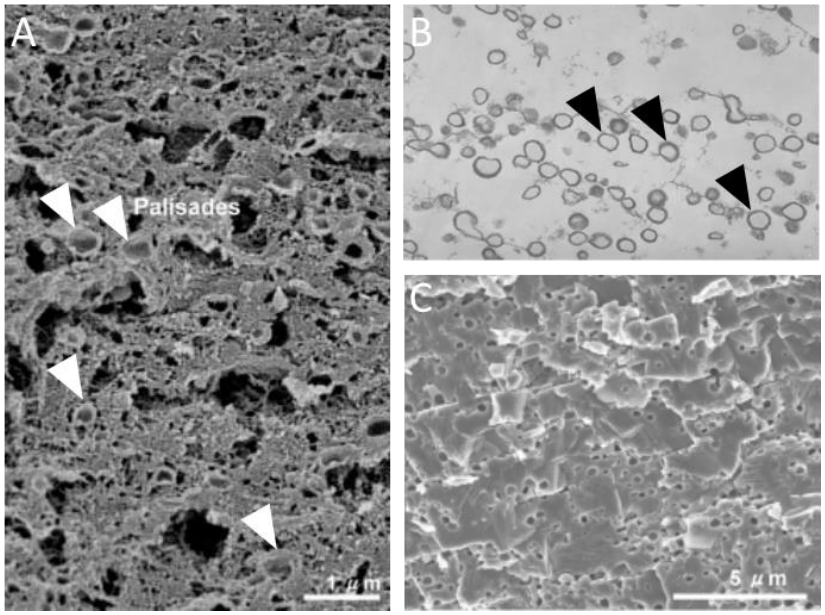


Figure 43. Observations de la couche palissadique de la coquille d'œuf de poule en microscopie électronique. Coquilles décalcifiées **A.** en microscopie à balayage et **B.** en microscopie à transmission. **C.** coquille non décalcifiée en microscopie à balayage. Les flèches blanches indiquent les traces de potentielles vésicules dans la matrice organique et les flèches noires pointent les vésicules identifiées. (Fraser *et al.* 1998, Hincke *et al.* 2008).

Des vésicules intracellulaires contenant de l'ACC ont aussi été observées dans les cellules épithéliales de l'oursin (Beniash *et al.* 1999, Vidavsky *et al.* 2014, Vidavsky *et al.* 2015). De la même manière, du phosphate de calcium amorphe a été observé dans des vésicules intracellulaires d'ostéoblastes de souris (Mahamid *et al.* 2011). Dans la partie bibliographique, nous avons également exposé le rôle du carbonate de calcium amorphe (ACC) lors de la minéralisation de la coquille. Cette phase transitoire permet une minéralisation rapide en condition physiologique (Brecevic et Nielsen 1989, Addadi *et al.* 2003). Au niveau de la coquille d'œuf, l'ACC est massivement déposé sur les membranes coquillières avant de s'accumuler sur les noyaux mamillaires pour former la calcite (Rodriguez-Navarro *et al.* 2015). L'ACC est très instable en condition physiologique. Par conséquent, les potentielles vésicules pourraient stabiliser cette forme amorphe et la transporter sur le site de la minéralisation. En effet, des études *in vitro* ont montré que des vésicules de type liposome peuvent stabiliser l'ACC et retarder sa cristallisation (Tester *et al.* 2011, Ihli *et al.* 2014). Ainsi, un transport de l'ACC *via* des vésicules permettrait d'éviter une éventuelle minéralisation non-spécifique dans le fluide utérin (milieu supersaturé, (Nys *et al.* 1991)), comme cela est proposé au niveau des vaisseaux sanguins lors de la minéralisation osseuse chez le poulet (Kerschnitzki *et al.* 2016b).

Toutes ces évidences nous ont conduit à une hypothèse de vésicules extracellulaires qui seraient impliquées dans la formation de la coquille d'œuf de poule (**Chapitre 1**). Au vu des données bibliographiques et des résultats obtenus, nous avons donc proposé un modèle dans lequel les protéines EDIL3 et MFGE8 adresseraient des vésicules extracellulaires, contenant de l'ACC, sur le site de minéralisation. EDIL3 et MFGE8 seraient liées aux vésicules *via* leur domaine de liaison aux phospholipides (F5/8C) et elles interagiraient avec le calcium du site de minéralisation *via* leur domaine de liaison au calcium (EGF-like) pour adresser les vésicules (**Figure 44**). Ces vésicules proviendraient des cellules épithéliales de l'utérus, elles transiteraient dans le fluide utérin, dans lequel les protéines EDIL3 et MFGE8 ont été identifiées et se lieraient sur le site de minéralisation, *via* le site de liaison au calcium des protéines, pour délivrer le précurseur minéral.

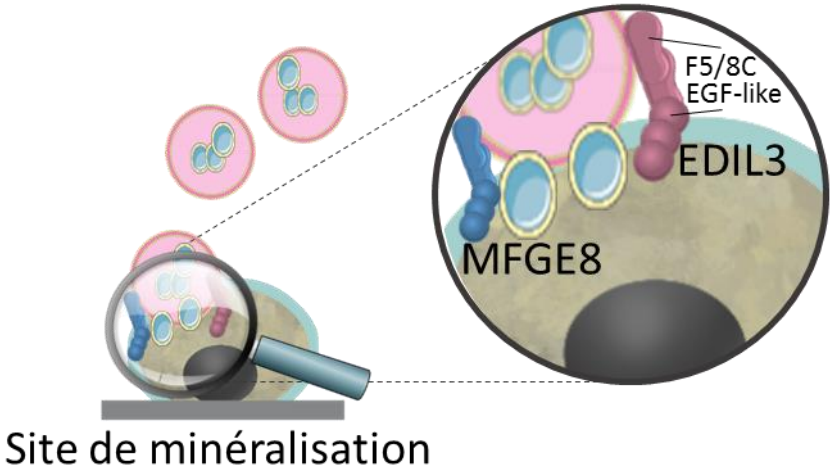


Figure 44. Mécanisme potentiel de liaison des protéines EDIL3 et MFGE8 permettant l'adressage des vésicules sur le site de la minéralisation. Le second domaine F5/8C des protéines est attaché aux vésicules (liaison aux phospholipides) et le troisième domaine EGF-like (liaison au calcium) est lié au site de minéralisation.

1.6. Des vésicules transportent de l'ACC dans les cellules utérines et le fluide utérin

Après avoir proposé cette hypothèse d'un transport vésiculaire associé à la minéralisation de la coquille, la suite de ma thèse a consisté à mettre en place des expérimentations pour démontrer la présence de vésicules transportant du carbonate de calcium (**Chapitre 2**).

Dans un premier temps des analyses de microscopie électronique à transmission conduites sur des coupes de tissu utérin, nous ont permis de mettre en évidence des vésicules dans les cellules utérines ainsi que de nombreux évènements d'exocytose par bourgeonnement de la membrane plasmique des cellules épithéliales de l'utérus de poule. Ces bourgeonnements permettent la libération de vésicules dans le fluide utérin, également visualisées en microscopie électronique dans ce milieu. Trois catégories principales de vésicules extracellulaires sont connues : les exosomes (30-150 nm), les corps apoptotiques (50-5000 nm) et les microvésicules ou ectosomes (100-1000 nm) (Kalra *et al.* 2016). La taille des vésicules extracellulaires observées dans le fluide utérin (100 à 400 nm) et leur bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique ont suggéré que celles-ci correspondaient à des ectosomes. Une activité vésiculaire, associée à la fertilisation de l'ovocyte, a déjà été observée dans l'oviducte de poule au niveau de la jonction utéro-vaginale (Wyburn *et al.* 1973, Waqas *et al.* 2016). Les résultats de notre étude confirment cette activité vésiculaire en accord avec une importante activité sécrétoire des cellules de la muqueuse utérine précédemment soulignée (Breen et De Bruyn 1969).

Par la suite, dans le cadre d'une coopération mise en place avec la plateforme de microscopie de l'université de Tours et le département de minéralogie de l'université de Grenade, nous avons recherché les éléments chimiques présents à l'intérieur de ces vésicules, par des analyses de microscopie électronique couplées à des techniques de spectroscopie (spectroscopie des pertes d'énergie ; EELS et spectroscopie de rayons-X à dispersion d'énergie ; EDS). Ces techniques sont souvent utilisées pour l'analyse de biominéraux tels que l'os et les coquilles de mollusques et d'œufs de poule (Klosowski *et al.* 2015, Rodriguez-Navarro *et al.* 2015, Macias-Sanchez *et al.* 2017). Les éléments calcium, oxygène et carbone ont été retrouvés au sein des vésicules en utilisant ces deux techniques différentes (EELS et EDS), validant ainsi la présence de carbonate de calcium dans les vésicules. La minéralisation de la coquille résulte de l'assemblage de particules d'ACC qui se transforment en calcite permettant un processus contrôlé et rapide de biominéralisation (Arias *et al.* 1993, Rodriguez-Navarro *et al.* 2015). Les mesures de diffraction des électrons, sont des techniques

classiquement utilisées pour observer les biominéraux des vertébrés ou invertébrés (Mahamid *et al.* 2010, Mahamid *et al.* 2011, Vidavsky *et al.* 2015, Kerschnitzki *et al.* 2016a). Cette méthode, réalisée sur les vésicules extracellulaires du fluide utérin, a confirmé la forme amorphe du carbonate de calcium séquestré. Des études préalables effectuées sur un autre système de biominéralisation au carbonate de calcium (oursin), ont montré que l'ACC était présent dans les vésicules intracellulaires (Beniash *et al.* 1999, Vidavsky *et al.* 2014). De la même manière, du phosphate de calcium amorphe a été observé dans des vésicules intracellulaires d'ostéoblastes de souris (Mahamid *et al.* 2011). Dans notre étude, les analyses de spectroscopie n'ont pas été réalisées sur les vésicules présentes dans les cellules utérines, car cela nécessitait des techniques de cryo-préservation et de cryo-microscopie, non disponibles. Par conséquent, l'ACC séquestré n'a pu être observé que dans les vésicules extracellulaires du fluide. Au vu des données de la littérature mentionnés ci-dessus, on peut penser que l'ACC serait inclus dans les cellules utérines. Toutefois, des expériences supplémentaires seront nécessaires pour le démontrer (**perspective 2.2**).

1.7. Les acteurs moléculaires clefs du transport vésiculaire impliqué dans la minéralisation de la coquille des oiseaux

Après avoir confirmé que des vésicules extracellulaires transportaient l'ACC, les principaux acteurs moléculaires de ce transport ont fait l'objet de la suite de mon travail de thèse. Ces résultats ont été décrits dans le **chapitre 2**.

Les acteurs moléculaires des vésicules extracellulaires impliquées dans la minéralisation osseuse/cartilagineuse ont été présentés dans la revue bibliographique (**3.6.2**). Les principaux acteurs de ces vésicules décrits dans la littérature, agissent en association pour incorporer les précurseurs et former le minéral au sein de la vésicule. Ainsi, PHOSPHO1, NPP1 et TNAP assure la régulation du phosphate dans les vésicules, alors que les phospholipides et les protéines annexines collaborent pour introduire le calcium (Balcerzak *et al.* 2003, Anderson *et al.* 2005, Golub 2009, Cui *et al.* 2016, Hasegawa *et al.* 2017, Bottini *et al.* 2018). En effet, les annexines ont la capacité de former des canaux calciques au niveau de la membrane des vésicules en présence de phosphatidylsérines (Genge *et al.* 1992, Rojas *et al.* 1992, Kirsch *et al.* 2000, Golub 2009, Hasegawa *et al.* 2017). En se basant sur les acteurs moléculaires connus du transport vésiculaire osseux et cartilagineux ainsi que ceux du transport vésiculaire en général contenus dans la base vesiclepedia (Pathan *et al.* 2019) et la littérature, nous avons établi une liste de 33 candidats au transport vésiculaire utérin dont l'expression a été explorée

dans l'oviducte de poule. Les résultats de notre analyse d'expression indiquent une forte expression de 20 gènes au niveau des segments de l'oviducte responsables de la formation de la coquille d'œuf. Parmi eux, 7 gènes codent pour des protéines qui sont présentes dans la base de données « Vesiclepedia », qui répertorie les marqueurs vésiculaires (Pathan *et al.* 2019). Par ailleurs, 12 gènes encodent des protéines précédemment détectées dans les vésicules extracellulaires impliquées dans la formation osseuse/cartilagineuse (Xiao *et al.* 2007, Balcerzak *et al.* 2008, Rosenthal *et al.* 2011, Thouverey *et al.* 2011, Shapiro *et al.* 2015). En complément de l'analyse d'expression de gènes, des westerns blots sur les vésicules et des marquages d'immunofluorescence sur des coupes d'utérus ont permis de valider certains acteurs clefs du transport vésiculaire. De plus, une étude protéomique a permis d'identifier 29 protéines au niveau des vésicules extracellulaires du fluide utérin.

Nous décrirons ci-après ces acteurs moléculaires selon leurs fonctions dans les vésicules.

1.7.1 Les acteurs moléculaires du fonctionnement général des vésicules extracellulaires

La première catégorie d'acteurs moléculaires identifiés dans les vésicules extracellulaires du fluide concerne le fonctionnement général des vésicules (formation/transport). Les gènes *Pdcd6ip, Sdcbp, Tsg101* et *Vps26a* qui encodent des protéines impliquées dans la biogénèse des vésicules (Colombo *et al.* 2014, Shapiro *et al.* 2015, Azoidis *et al.* 2018, Hessvik et Llorente 2018, Van Niel *et al.* 2018), sont fortement exprimés dans les segments de l'oviducte responsables de la formation de la coquille. Il en est de même pour les gènes *Rab5a, Rab27a, Vamp7, Vamp3 et Vps4b* qui participent à la libération des vésicules (Colombo *et al.* 2014, Shapiro *et al.* 2015, Azoidis *et al.* 2018, Van Niel *et al.* 2018), les gènes *Ywhah* et *Ywhaz* codant pour des protéines de signalisation (Shapiro *et al.* 2015), ainsi que les gènes *Hspa8* et *Cd82* qui encodent respectivement une protéine chaperonne et une protéine impliquée dans l'organisation des membranes des vésicules (Shapiro *et al.* 2015, Azoidis *et al.* 2018, Van Niel *et al.* 2018). De plus, les protéines PDCD6IP et Syntenin-1 (encodée par le gène *Sdcbp*) ont été retrouvées dans les vésicules du fluide utérin *via* l'analyse de protéomique. Le marquage d'immunofluorescence confirme la présence de la protéine PDCD6IP dans les cellules utérines durant la minéralisation. De plus, Ezrin, une protéine répertoriée dans la base de données Vesiclepedia qui serait impliquée dans la libération des vésicules (Blin *et al.* 2008, Pathan *et al.* 2019), a été identifiée dans notre analyse protéomique. Nos résultats sont conformes à l'identification des protéines PDCD6IP, Ezrin et Syntenin-1 dans les vésicules extracellulaires osseuses/cartilagineuses (Balcerzak *et al.* 2008, Rosenthal *et al.* 2011, Shapiro *et al.* 2015). En

outre, ces 3 protéines font partie de la liste des 64 protéines communes aux coquilles des œufs de poule, de caille, de canard et de dinde (Zhu *et al.* 2019). Par conséquent, les protéines **PDCD6IP**, **Ezrin** et **Syntenin-1** semblent être des acteurs clefs du fonctionnement général des vésicules du fluide. Notre analyse *in silico* des domaines protéiques suggère que les protéines Syntenin-1 et Ezrin seraient attachées à la membrane des vésicules *via* leurs sites de liaisons au phosphatidylinositol 4,5 biphosphate, alors que la protéine PDCD6IP serait incorporée dans la lumière des vésicules.

1.7.2. Les acteurs moléculaires impliqués dans l'apport des ions calcium

La seconde catégorie identifiée correspond aux acteurs moléculaires qui assureraient l'entrée du calcium dans la vésicule. Les gènes *Anxa1*, *Anxa2* et *Anxa8* codent pour des annexines qui peuvent jouer le rôle de canaux calciques au niveau de la membrane vésiculaire *via* une interaction avec les phospholipides (Rojas *et al.* 1992, Kirsch *et al.* 2000, Golub 2009, Wuthier et Lipscomb 2011). Ces gènes sont fortement exprimés dans les segments responsables de la minéralisation de la coquille. Dans notre étude d'immunofluorescence, les protéines ANXA1 et ANXA2 ont été localisées dans l'épithélium de l'utérus alors que la protéine ANXA8 a été repérée aussi bien dans l'épithélium que dans les glandes tubulaires de l'utérus. Les protéines ANXA1 et ANXA2 ont précédemment été identifiées dans de nombreuses études sur les vésicules extracellulaires associées à la formation osseuse/cartilagineuse (Balcerzak *et al.* 2008, Rosenthal *et al.* 2011, Thouverey *et al.* 2011, Shapiro *et al.* 2015). De plus, ANXA2 fait partie des protéines communes aux coquilles des œufs de poule, de caille, de canard et de dinde (Zhu *et al.* 2019). De leurs côtés, les protéines **ANXA1** et **ANXA8** (Cordeiro et Hincke 2016) ont également été identifiées dans la coquille d'œuf de poule (Mann *et al.* 2006). Ainsi, ces 3 annexines, et plus particulièrement l'**ANXA2,** semblent être des acteurs principaux qui permettraient l'entrée du calcium dans les vésicules extracellulaires.

1.7.3. Les acteurs moléculaires impliqués dans l'apport des ions bicarbonates

La troisième catégorie d'acteurs moléculaires est celle des protéines qui participent à l'apport des ions bicarbonates dans les vésicules. Dans notre étude, nous avons testé l'expression des gènes *Slc4a7* et *Ca2* qui qui encodent respectivement un transporteur de bicarbonate et une métalloprotéine capable de catalyser l'hydratation du CO_2 en HCO_3^- (Stechschulte *et al.* 1992, Sauer *et al.* 1994, Hassan *et al.* 2013, Sedlyarov *et al.* 2018), mais aucun n'a été retrouvé comme fortement exprimé dans les segments responsables de la

formation de la coquille d'œuf. Notre analyse de protéomique, a rapporté la présence de la protéine CA4, une autre anhydrase carbonique ayant la capacité de catalyser l'hydratation du CO_2 en HCO_3^- (Hassan *et al.* 2013). En effet, le fluide utérin possède une importante pression partielle en gaz carbonique (100 mm Hg), qui est deux fois plus élevée que celle du plasma sanguin (Arad *et al.* 1989, Nys *et al.* 1991). Ainsi, l'enzyme CA4 catalyserait l'hydratation du CO_2 du fluide utérin. L'analyse en PCR point final nous a permis de confirmer l'expression du gène *Ca4* dans le tissu utérin. De plus, l'analyse d'immunofluorescence réalisée a permis de valider la présence de cette protéine dans l'épithélium de l'utérus. Ces résultats sont également soutenus par les précédentes identifications de cette enzyme dans les différents protéomes des coquilles d'œufs de poule, de caille, de dinde et de canard (Zhu *et al.* 2019). CA4 possède un domaine GPI-link lui permettant de se lier aux membranes (Hassan *et al.* 2013, Le Roy *et al.* 2014). Ainsi, la protéine **CA4** serait localisée sur la membrane des vésicules et assurerait l'apport des ions bicarbonates dans les vésicules.

1.7.4. Les acteurs moléculaires impliqués dans l'adressage des vésicules extracellulaires

La quatrième catégorie concerne les gènes *Edil3* et *Mfge8*. Dans notre première étude, nous avons proposé un rôle d'adressage des vésicules extracellulaires du fluide utérin pour les protéines EDIL3 et MFGE8, abondantes dans la coquille (Marie *et al.* 2015b) (**Chapitre 1**). Dans la coquille d'œuf, le minéral se forme par accumulation de l'ACC sur les sites de la minéralisation (noyaux mamillaires). De par leur domaine de liaison, EDIL3 et MFGE8, permettraient de guider les vésicules jusqu'au site de minéralisation pour délivrer l'ACC. Notre analyse d'expression a permis de confirmer la forte expression d'*Edil3* dans les segments responsables de la minéralisation de la coquille. *Mfge8*, de son côté, est fortement exprimé dans l'isthme rouge mais plus majoritairement dans le foie. De plus, les analyses de Western blot ont rapporté la présence des deux protéines dans les vésicules du fluide utérin. Toutefois, seule la protéine EDIL3 a été identifiée *via* l'analyse protéomique des vésicules. Cette protéine a aussi été localisée par immunofluorescence au niveau des glandes tubulaires de l'utérus. Dans le **chapitre 1**, nous avons montré que les protéines EDIL3 et MFGE8 ont la capacité de se lier aux membranes vésiculaires. La protéine EDIL3 serait alors sécrétée dans le fluide utérin dans lequel elle se lierait aux vésicules extracellulaires. En outre, ces deux protéines ont précédemment été identifiées au niveau des vésicules extracellulaires impliquées dans la minéralisation osseuse/cartilagineuse (Balcerzak *et al.* 2008, Rosenthal *et al.* 2011, Shapiro *et*

al. 2015). Nous pensons que ces deux protéines assureraient l'adressage des vésicules sur le site de la minéralisation pour éviter une minéralisation ectopique du carbonate de calcium dans l'utérus. Les analyses d'immunofluorescence et de protéomique confortent le rôle d'**EDIL3**, alors que celui de MFGE8 n'a pu être confirmé par ces techniques. Toutefois, il faut noter que MFGE8 fait également partie des protéines communes aux protéomes de coquilles d'œufs de poule, de dinde, de caille et de canard, qui pourraient avoir un rôle central dans le processus de minéralisation (Zhu *et al.* 2019).

1.7.5. Les acteurs moléculaires pouvant stabiliser l'ACC dans les vésicules

Dans ce transport vésiculaire impliqué dans la biominéralisation de la coquille d'œuf de poule, les vésicules extracellulaires contiennent de l'ACC stabilisé. Nous avons vu que cette forme de carbonate de calcium est très instable en condition physiologique et que la présence de composés inorganiques ou organiques et de molécules d'eau constitutives est corrélée à sa stabilisation (Gal *et al.* 2012, Alberic *et al.* 2018, Konrad *et al.* 2018, Meic *et al.* 2018, Albéric *et al.* 2019). Ainsi, deux hypothèses principales peuvent expliquer la stabilisation de l'ACC à l'intérieur des vésicules du fluide utérin :

- La première suggère que l'encapsulation de l'ACC dans les vésicules est suffisante pour assurer la stabilisation des nanoparticules, comme c'est le cas *in vitro* dans des liposomes (Tester *et al.* 2011, Ihli *et al.* 2014). Cela permet d'éviter que l'ACC soit au contact de molécules d'eau libres, lui permettant de se déshydrater en une forme plus stable. En effet, une augmentation du contenu en eau dans le milieu où se trouve l'ACC accélère sa cristallisation (Alberic *et al.* 2018, Konrad *et al.* 2018). De plus, des études ont suggéré que les ions magnésium et phosphate augmentent le temps de stabilité de l'ACC, retardant ainsi sa cristallisation (Rodriguez-Blanco *et al.* 2012, Alberic *et al.* 2018, Konrad *et al.* 2018). Par conséquent, les conditions physico-chimiques des vésicules extracellulaires du fluide utérin pourraient avoir un rôle clef dans la stabilisation de l'ACC.

- La seconde hypothèse concerne la stabilisation des particules d'ACC par des molécules additionnelles. En effet, chez les invertébrés, plusieurs études suggèrent que leurs matrices organiques pourraient stabiliser la forme amorphe de carbonate de calcium (Ma *et al.* 2007, Politi *et al.* 2007, Gong *et al.* 2012a, Rao *et al.* 2013). Dans le transport vésiculaire impliqué dans la minéralisation de la coquille d'œuf de poule, certaines protéines incluses dans les vésicules pourraient alors stabiliser l'ACC. Dans notre première étude, nous avions proposé trois protéines de la coquille (LYZ, OC17 et OVA), comme candidats pouvant assurer le rôle

de stabilisation de l'ACC dans les vésicules (Voinescu *et al.* 2007, Pipich *et al.* 2008, Freeman *et al.* 2010) (**Chapitre 1**). Finalement, notre analyse protéomique, a permis de confirmer la présence des protéines ovalbumine (OVA) et lysozyme (LYZ) dans les vésicules extracellulaires du fluide utérin, mais pas celle de l'OC-17. Ovalbumine est une protéine faisant partie de la famille des serpines, qui a précédemment été identifiée dans la matrice organique de la coquille (Marie *et al.* 2015b, Dombre *et al.* 2017). Sa capacité de stabilisation des phases de carbonate de calcium instables a été explorée *via* des expériences *in vitro* (Wang *et al.* 2009a, Wang *et al.* 2010). De plus, un schéma du rôle de l'ovalbumine dans la minéralisation du carbonate de calcium a été proposé (Pipich *et al.* 2008). Les ions calciums seraient liés à la protéine *via* les groupements phosphates, ce qui permettrait un réarrangement protéique. Ainsi, l'ACC serait formé puis cristalliserait en une phase cristalline (Schwahn *et al.* 2004). Le rôle du lysozyme dans la stabilisation de l'ACC a été exploré, mais reste controversé. En effet, une phase métastable d'ACC a été obtenue *in vitro* en présence du lysozyme du blanc d'œuf (Voinescu *et al.* 2007, Wang *et al.* 2009b). Le lysozyme diminuerait également le diamètre des particules métastables d'ACC (Voinescu *et al.* 2007). Toutefois, une autre étude a montré que le lysozyme serait inefficace dans la stabilisation de l'ACC (Wolf *et al.* 2011). Les protéines lysozyme et ovalbumine seraient, par conséquent, les deux candidats principaux pour assurer le rôle de stabilisateur d'ACC dans les vésicules extracellulaires du fluide utérin. L'étude protéomique a également mis en évidence d'autres protéines dont la fonction dans les vésicules n'est pas connue. Ces protéines pourraient aussi être impliquées dans la stabilisation de l'ACC. Pour répondre à cela, des expériences supplémentaires devront être réalisées pour analyser leur activité.

1.7.6. Le transport vésiculaire au cours de la minéralisation de la coquille d'œuf de poule

La **figure 45** résume les acteurs moléculaires majeurs du transport vésiculaire identifiés dans cette thèse. La localisation des acteurs clefs au niveau de la vésicule a été déterminée en se basant sur les capacités moléculaires des protéines.

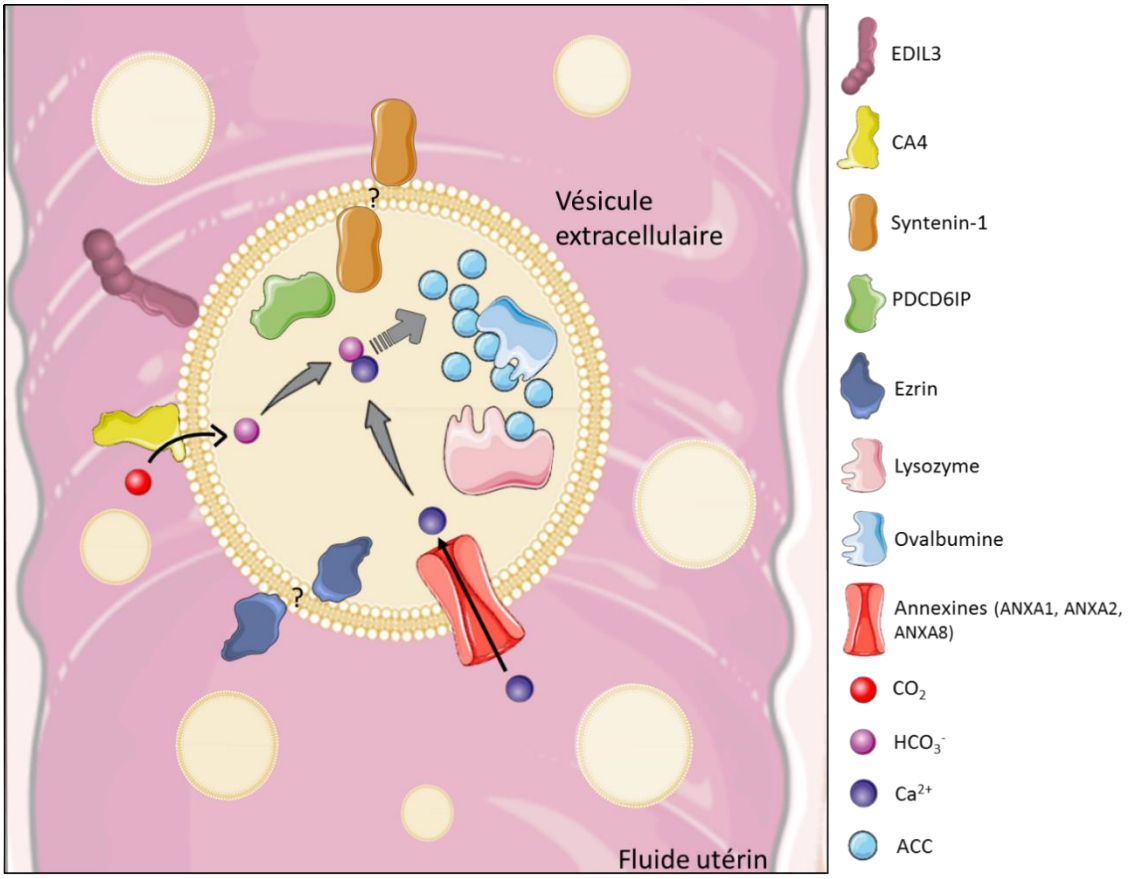


Figure 45. Localisation des acteurs moléculaires clefs au niveau des vésicules extracellulaires impliquées dans transport de l'ACC durant la minéralisation de la coquille d'œuf de poule. Les différents acteurs assureraient la biogénèse de la vésicule extracellulaire (Ezrin, Syntenin-1 et PDCD6IP), l'entrée des ions calcium (ANXA1, ANXA2 et ANXA8) et bicarbonates (CA4) nécessaires à la formation du carbonate de calcium amorphe (ACC) dans la vésicule, la stabilisation de l'ACC dans la vésicule (Lysozyme et Ovalbumine) et l'adressage de la vésicule (EDIL3).

L'analyse d'immunofluorescence sur coupe d'utérus a permis de repérer les variations d'abondance des acteurs moléculaires clefs du transport vésiculaire, au cours de la minéralisation. Ainsi, la protéine EDIL3, qui serait impliquée dans l'adressage des vésicules apparaît plus abondante durant la phase d'initiation de la minéralisation (entre 5 h et 7 h post-ovulation). Son gène est également surexprimé à 7 h post-ovulation. Ces résultats sont en accord avec les données de protéomique quantitative qui rapportaient une surabondance de la protéine EDIL3 autour de 6-7 h post-ovulation (Marie *et al.* 2015b).

ANXA1 et ANXA2, impliquées dans l'apport du calcium, se révèlent plus abondantes durant l'initiation de la minéralisation aussi, tandis qu'ANXA8 est présente durant toute la minéralisation et de manière plus abondante au début de la phase de croissance rapide (10 h post-ovulation). La protéine CA4, impliquée dans l'apport des ions bicarbonates, est présente dans l'utérus durant toute la minéralisation avec une surabondance de 5 h à 10 h post-ovulation.

Pour finir, la protéine PDCD6IP, une protéine impliquée dans la biogénèse des vésicules, manifeste une abondance constante tout au long de la minéralisation, selon notre analyse d'immunofluorescence. Ces résultats donnent par conséquent, une idée globale de l'implication du transport vésiculaire au cours du mécanisme de minéralisation.

Les acteurs du transport vésiculaire sont plus abondants lors des phases de l'initiation de la minéralisation (5 h-10 h post ovulation). Ainsi, la **figure 46** présente un schéma de ce transport au cours de l'initiation du processus de calcification de la coquille d'œuf de poule.

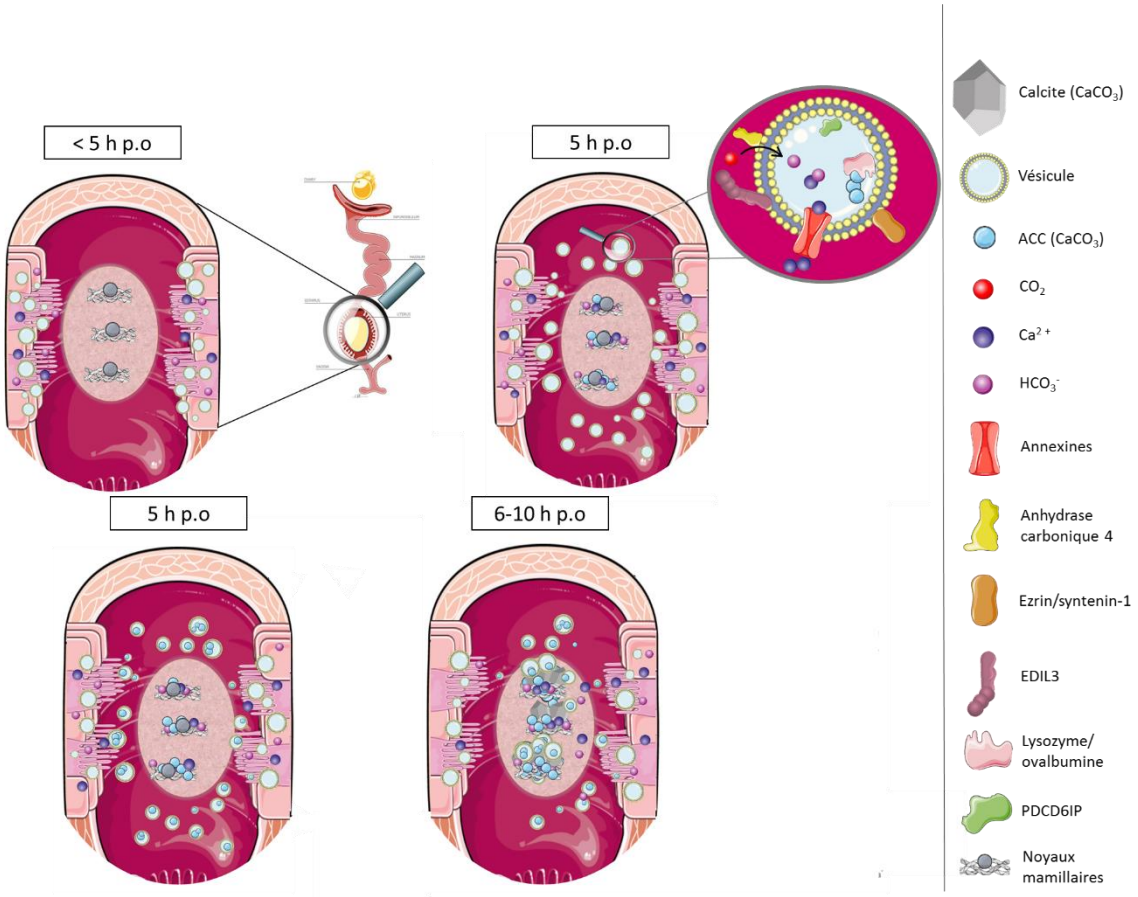


Figure 46. Représentation schématique de l'implication du transport vésiculaire de l'ACC durant la phase d'initiation de la minéralisation de la coquille d'œuf de poule. Les acteurs moléculaires clefs mis en évidence dans notre étude ont été reportés sur ce schéma. Les vésicules bourgeonnent des cellules utérines pour rejoindre le fluide utérin afin de délivrer le carbonate de calcium amorphe (ACC) sur le site de minéralisation.

1.8. Modèle global du transport minéral nécessaire à la formation de la coquille

La calcification de la coquille compte parmi les processus de minéralisation biogénique les plus rapides sur terre (Arias *et al.* 1993, Nys *et al.* 2004). Ce processus nécessite un apport considérable de carbonate de calcium. En effet, la poule exporte chaque jour 10 % du total de son calcium corporel (2g) (Nys et Guyot 2011). Un tel effort métabolique nécessite une importante homéostasie calcique chez la poule (Nys et Le Roy 2018). Les organes principaux de ce métabolisme calcique sont : l'intestin, l'utérus, l'os et les reins. Dans la revue bibliographique, nous avons vu que la source de calcium est toujours d'origine alimentaire. En effet, deux semaines avant la production du premier œuf, la capacité d'absorption intestinale est augmentée de 6 fois par une stimulation des métabolites de la vitamine D au niveau des reins (Nys et Le Roy 2018). Toutefois, du fait d'une désynchronisation entre l'apport alimentaire diurne et la formation de la coquille nocturne, une part importante des ions calciums qui composent la coquille (30-40%) provient de l'os médullaire (Nys et Guyot 2011). Cet os labile facilite la solubilisation du calcium qui atteint ensuite la circulation sanguine. Le gaz carbonique sanguin constitue la source de carbonates nécessaire à la formation de la calcite. Aucun de ces deux éléments minéraux précurseurs (Ca^{2+} et HCO_3^-) n'est stocké dans les cellules utérines. Ils sont fournis au fluide utérin *via* la circulation sanguine, lors de la formation de la coquille (Hodges et Lörcher 1967). Au moment de la maturité sexuelle, l'utérus de la poule acquiert également la capacité de transférer de grande quantité d'ions calcium et bicarbonates afin d'approvisionner le fluide utérin en précurseurs minéraux nécessaires à la formation de la coquille (Nys et Le Roy 2018).

Avant la réalisation de ce travail de thèse, seule la voie transépithéliale du transfert des ions calcium du sang au fluide utérin *via* les cellules glandulaires utérines avait été étudiée en détail (Fullmer *et al.* 1976, Eastin et Spaziani 1978, Nys *et al.* 1989, Wasserman *et al.* 1991, Nys *et al.* 1992, Lavelin *et al.* 2001, Jonchere *et al.* 2012, Brionne *et al.* 2014, Nys et Le Roy 2018). Notre étude est la première à démontrer l'implication d'un transport vésiculaire dans la minéralisation de la coquille d'œuf. Ces vésicules extracellulaires permettent l'apport en carbonate de calcium amorphe nécessaire à la minéralisation rapide de la coquille. De plus, une récente étude a mis en évidence l'implication de la voie paracellulaire dans le transfert du calcium au niveau de l'intestin chez la poule pondeuse en période de ponte (Gloux *et al.* 2019). Un tel mécanisme pourrait également exister au niveau de l'utérus de la poule pour transférer

le calcium du sang vers le fluide utérin, bien que le gradient de concentration ne semble pas favorable. Afin de résumer ces trois voies de transfert des ions (potentielle ou démontrée), nous avons proposé un nouveau modèle global et cohérent du transport des précurseurs minéraux (ions calcium et bicarbonates), de la circulation sanguine jusqu'au site de minéralisation (**Figure 47** issue de **l'article 2**).

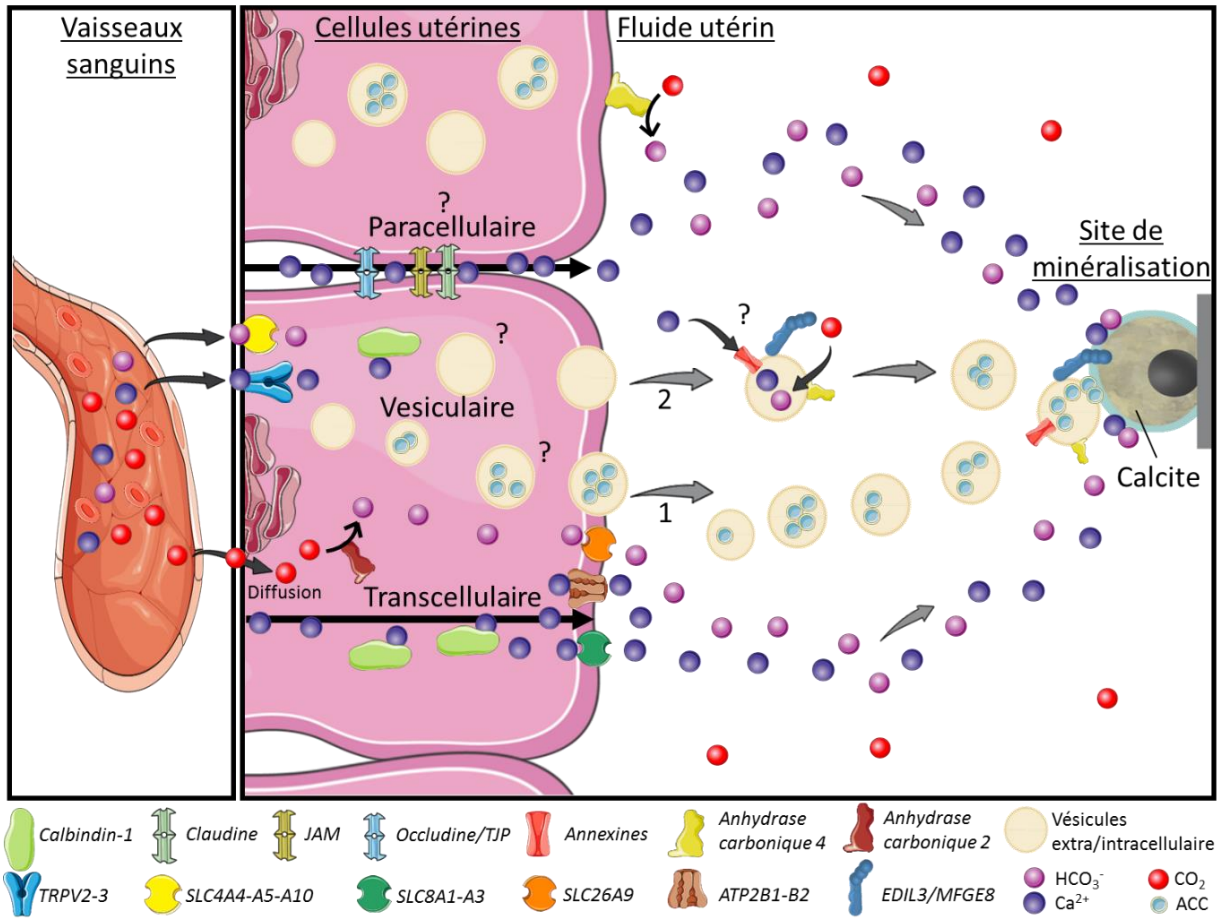


Figure 47. Schéma du modèle global des différentes voies qui assureraient le transport du minéral durant la biominéralisation de la coquille d'œuf de poule. La voie transcellulaire a été décrite dans plusieurs études antérieures alors que la voie vésiculaire a été mise en évidence au cours de ce travail de thèse. La voie paracellulaire utérine nécessite des preuves expérimentales et reste jusqu'ici hypothétique. Les différents acteurs moléculaires des voies respectives ont été reportés sur ce schéma.

Dans ce modèle, le CO_2 est passivement diffusé dans les cellules utérines (Hodges et Lörcher 1967). L'hydratation du CO_2 est ensuite catalysée par l'anhydrase carbonique 2 (CA2) dans les cellules utérines (Bernstein *et al.* 1968, Brionne *et al.* 2014, Nys et Le Roy 2018). Alternativement, les ions bicarbonates peuvent être transférés activement dans les cellules utérines par les co-transporteurs $Na^{2+}/HCO3^-$ (SLC4A4, SLC4A5, SLC4A10) (Nys et Le Roy 2018). Les ions bicarbonates sont ensuite extrudés des cellules par l'échangeur HCO_3^-/Cl^- (SLC26A9) et se retrouvent dans le fluide utérin (Nys et Le Roy 2018). De manière complémentaire, des ions bicarbonates sont formés directement dans le fluide utérin, par

catalyse de l'hydratation du CO_2, *via* l'anhydrase carbonique 4 qui possède son site actif dans le milieu extracellulaire (Zhu et Sly 1990). Concernant la voie transcellulaire du calcium, les canaux calciques TRPVs (TRPV2, TRPV3 et de manière moins certaine TRPV6) permettent l'entrée du calcium dans les cellules utérines. Les ions calciums sont alors pris en charge par la Calbindine-1 dans les cellules glandulaires, puis extrudés dans le fluide utérin par des pompes à calcium (ATP2B1 et ATP2B2) et des échangeurs Ca^{2+}/Na^{+} (SLC8A1 et SLC8A3) (Nys et Le Roy 2018).

Nous suggérons qu'une voie paracellulaire participerait au transfert des ions calcium *via* les jonctions des cellules utérines. Ce transport paracellulaire a récemment été mis en évidence au niveau de l'intestin chez la poule pondeuse en période de ponte (Gloux *et al.* 2019). En effet, chez la poule, l'absorption du calcium se produit dans l'intestin et augmente principalement dans le duodénum et le jéjunum durant la formation de la coquille (Hurwitz et Bar 1965, Hurwitz et Bar 1968). La voie active *via* l'absorption du calcium de manière transcellulaire a été décrite dans des études antérieures (Wasserman et Taylor 1966, Yang *et al.* 2011, Jonchere *et al.* 2012). Une récente étude a confirmé l'expression de certains candidats majeurs de cette voie, au niveau de l'intestin de la poule pondeuse (TRPC1, TRPM7, CALB1, ATP2B1 et ATP2B2). En se basant sur le mécanisme du transport passif du calcium des mammifères, cette étude a également permis de mettre en évidence l'implication de la voie paracellulaire dans l'absorption du calcium au niveau de l'intestin des poules pondeuses (Gloux *et al.* 2019). En effet, des gènes codant pour des protéines de jonctions intercellulaires, potentiellement impliqués dans le transfert du calcium, ont été quantifiés dans les segments d'intestin de poules pondeuses immatures et matures. Ainsi, des protéines Claudines (CLDN), des protéines « junctional adhesion molecule » (JAM), des protéines « tight junction » (TJP) et des protéines occludins (OCLN) ont été proposées comme acteurs clefs du transport paracellulaire du calcium dans l'intestin. Dans l'utérus, le gradient de concentration ne semble pas favorable à cette voie. Toutefois, à travers notre analyse des données de RNA-Seq du tissu utérin de la poule pondeuse (Gautron 2017a, Gautron *et al.* en cours), nous avons repéré une forte expression des gènes *Tjp1, Cldn3, Cldn1, Cldn10, Ocln* et *Jam2* correspondant à des acteurs potentiels majeurs du transport paracellulaire du calcium mis en évidence dans l'intestin. Cela suggère une implication de ce transport paracellulaire dans l'apport du calcium au niveau du fluide utérin *via* les jonctions des cellules épithéliales de l'utérus de poule lors de la formation de la coquille. Toutefois, la contribution de ce dernier type transport est à définir car le gradient de concentration est opposé à cette voie (**perspective 2.4**).

Au cours de cette thèse, un transport vésiculaire du minéral a été mis en évidence. Ce transport correspond à la troisième voie du transport du minéral durant la minéralisation de la coquille. Dans ce mécanisme, les protéines ANXs permettraient l'entrée des ions calcium dans la vésicule et l'enzyme anhydrase carbonique 4 permettrait l'apport en ions bicarbonates. Ainsi, une phase amorphe de carbonate de calcium (ACC) se formerait à l'intérieur des vésicules. Les conditions physico-chimiques de la vésicule, en complément de protéines spécifiques (lysozyme, ovalbumine…), permettraient de stabiliser l'ACC. Ce dernier serait ensuite adressé directement sur le site de minéralisation *via* la protéine EDIL3 et potentiellement la protéine MFGE8. Les particules d'ACC libérées s'agrégeraient pour se transformer ensuite en calcite, qui est le polymorphe stable de la coquille. Dans plusieurs processus de minéralisation, les ions sont stockés temporairement sous une forme instable de minéral séquestré dans des membranes (Weiner et Dove 2003, Weiner et Addadi 2011, Addadi et Weiner 2014, Khalifa *et al.* 2018). Des vésicules contenant du minéral ont précédemment été observées au niveau des os (Mahamid *et al.* 2011, Kerschnitzki *et al.* 2016a) et des vaisseaux sanguins des vertébrés (Kerschnitzki *et al.* 2016b), chez l'oursin (Beniash *et al.* 1999), ainsi que chez les coccolitophores (Sviben *et al.* 2016). Cependant, c'est la première fois qu'un transport vésiculaire du minéral est démontré dans un mécanisme de minéralisation carbonatée chez les vertébrés.

Au final, trois voies pourraient permettre l'approvisionnement des précurseurs minéraux nécessaires à la formation de la coquille d'œuf de poule. Ces différentes voies doivent agir simultanément ou à tour de rôle pour assurer l'apport de la grande quantité de minéral nécessaire à la formation de la coquille. Toutefois, des analyses complémentaires sont nécessaires pour évaluer la part d'implication de chacune des voies (**perspective 2.4**).

Cette étude sur le transport vésiculaire impliqué dans la calcification de la coquille permettra de compléter les connaissances actuelles sur le transport vésiculaire en biominéralisation déjà démontré dans d'autres systèmes (Beniash *et al.* 1999, Mahamid *et al.* 2010, Mahamid *et al.* 2011, Vidavsky *et al.* 2015, Kerschnitzki *et al.* 2016a, Sviben *et al.* 2016, Hasegawa *et al.* 2017).

Plusieurs questions restent toutefois à élucider. Comment se forment les vésicules dans les cellules utérines ? A quel niveau le minéral est incorporé dans les vésicules ? Dans les cellules, le calcium est connu pour être stocké au niveau du réticulum endoplasmique, et des mitochondries (Khalifa *et al.* 2018). Les vésicules des cellules utérines contenant le minéral

pourraient potentiellement se former au niveau de ces organelles avant de rejoindre le milieu extracellulaire. Finalement, une fois dans le milieu extracellulaire, comment les vésicules libèrent-elles le minéral séquestré, lorsqu'elles atteignent le site de la minéralisation ? Est-ce que des phospholipases participent à cette libération ? Ces différentes pistes de recherches et leurs perspectives sont discutées dans la partie suivante.

2. Perspectives

Mes recherches ont été initiées autour du rôle des protéines EDIL3 et MFGE8 dans le processus de minéralisation de la coquille d'œuf de poule et ont mis en évidence leur implication dans un transport vésiculaire du carbonate de calcium. Ce transport vésiculaire est décrit pour la première fois au cours d'une biominéralisation carbonatée chez des vertébrés. Il permet un transport vésiculaire du carbonate de calcium sous forme amorphe jusqu'au site de la minéralisation. Son identification constitue une avancée importante sur le mécanisme de stabilisation et d'adressage de l'ACC lors de la minéralisation de la coquille. La mise en lumière de ce transport vésiculaire nous a conduit à l'élaboration d'un modèle global du transport des précurseurs minéraux lors de la calcification de la coquille. Ainsi, les perspectives développées dans cette thèse, s'articuleront autour de plusieurs axes principaux (**Figure 48**) :

→ **Caractériser et localiser les acteurs moléculaires du transport vésiculaire** impliqués dans la minéralisation de la coquille d'œuf de poule. Il s'agit de localiser au sein des vésicules, les acteurs moléculaires rapportés dans cette étude et notamment, EDIL3/MFGE8 au niveau des membranes.

→ **Analyser le lien fonctionnel entre les vésicules et la biominéralisation de la coquille**. L'origine du calcium vésiculaire devra être recherchée. Le rôle du transport vésiculaire sur la qualité de la coquille l'œuf sera déterminé par des techniques d'invalidation de gènes et l'analyse des données génomiques polymorphiques en relation avec les données phénotypiques de la qualité de la coquille.

→ **Quantifier l'évolution du transport vésiculaire aux différents stades de calcification de la coquille.** En effet, notre étude a permis d'identifier le transport vésiculaire comme étant principalement impliqué dans l'initiation de la minéralisation et notamment lors du dépôt massif d'ACC sur l'œuf et sa transformation en calcite. Toutefois, l'ACC est délivré à tous les stades sur le front de minéralisation.

→ **Analyser les implications respectives des différentes voies qui assurent l'apport du minéral** au cours de la calcification de la coquille.

→ **Discuter de la transposition du modèle vésiculaire de l'utérus de la poule dans d'autres systèmes biologiques** et notamment pour l'absorption intestinale du calcium, la formation du squelette de l'embryon chez la poule, mais aussi pour la formation de la coquille chez d'autres espèces d'oiseaux.

Enfin, pour terminer, nous analyserons des perspectives à long terme et les retombées des résultats de cette thèse en **terme de connaissances** et **d'applications potentielles** (**Figure 56**).

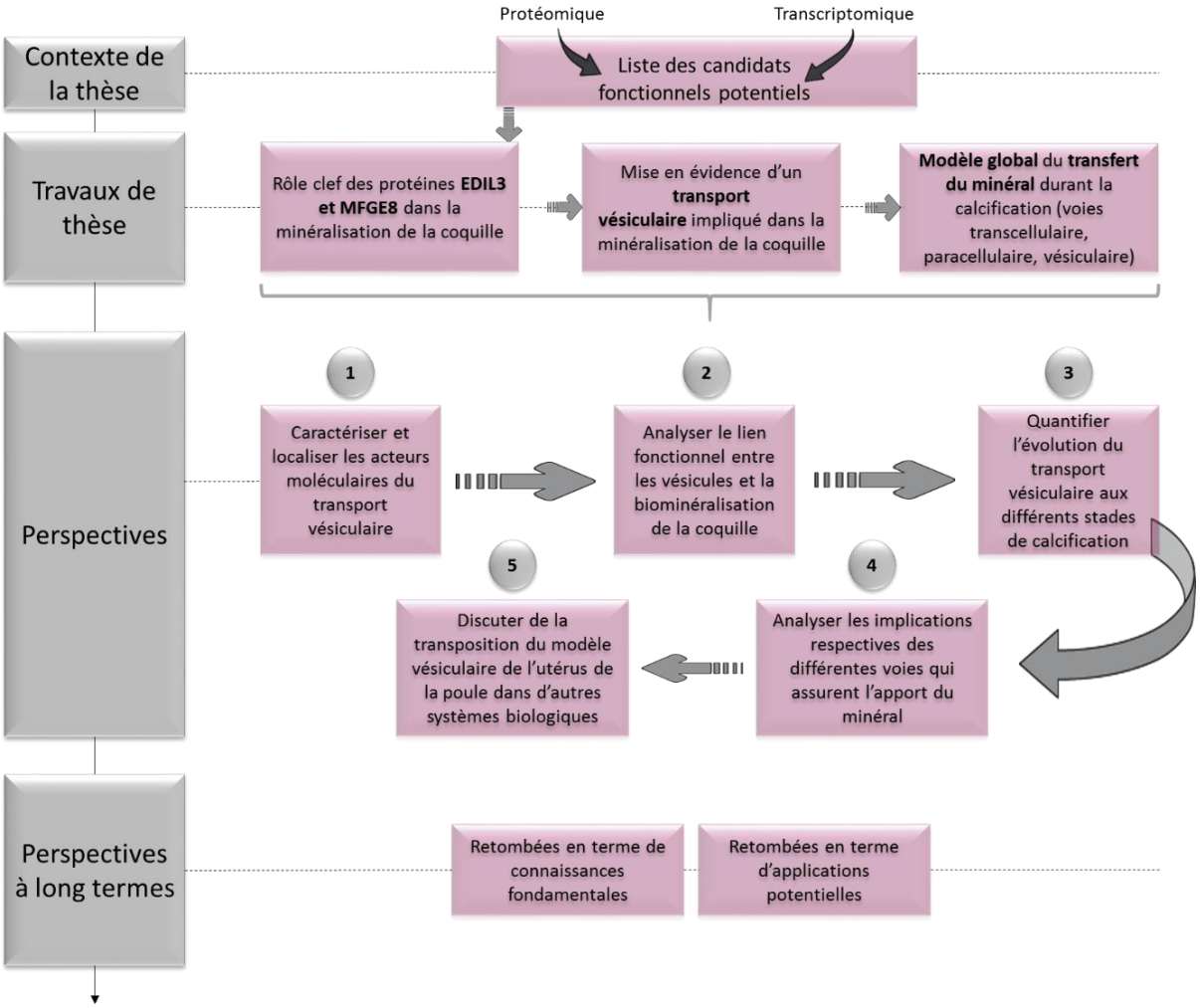


Figure 48. Schéma de l'organisation des perspectives de ce travail de thèse. Après avoir confirmé le rôle des protéines EDIL3 et MFGE8 dans la minéralisation de la coquille d'œuf, nous avons mis en évidence un transport vésiculaire du minéral impliqué dans ce processus. Au final, nous avons proposé un modèle global et cohérent du transfert du minéral durant la calcification de la coquille. Ainsi, ce travail ouvre de nombreuses perspectives organisées en 5 axes majeurs (1 à 5 sur le schéma). De plus, les résultats de cette thèse ont contribué à l'apport de nouvelles connaissances aussi bien fondamentales que pour le développement de potentielles applications pour la filière œuf.

2.1. Caractérisation et localisation des acteurs moléculaires du transport vésiculaire impliqué dans la minéralisation de la coquille d'œuf de poule

Le travail effectué dans cette thèse a permis de mettre en évidence 29 protéines au niveau des vésicules extracellulaires du fluide utérin. Cette identification a été complétée par des Western blots sur les vésicules et une analyse d'immunofluorescence des acteurs clefs dans le tissu utérin. Ces résultats ont été obtenus dans un premier temps grâce aux mesures d'expression. Ces dernières seront à compléter par une analyse des autres acteurs vésiculaires potentiellement présents dans l'utérus de poule. Pour ce faire, nous pourrons nous appuyer sur les données de séquençage des ARN messagers de l'utérus, réalisés durant le projet IMPACT (Gautron 2017a). Il s'agira d'exploiter la liste des milliers d'ARN séquencés dans cet organe, pour identifier ceux correspondants à des gènes codant des protéines vésiculaires, dont l'expression pourra être mesurée par RT-qPCR (**Figure 49**).

Une migration complète en gel d'électrophorèse des vésicules purifiées permettrait d'obtenir plusieurs bandes qui seraient excisées du gel pour une identification protéomique. Cette méthode permettrait d'identifier un plus grand nombre de protéines présentes dans les vésicules par rapport à l'analyse réalisée pour cette thèse. En effet, cette dernière a été faite après migration en bande unique des vésicules purifiées, qui limite l'identification aux protéines majeures de la bande. Afin de caractériser en profondeur le transport vésiculaire du minéral mis en évidence au cours de cette thèse, différentes approches pourront être développées.

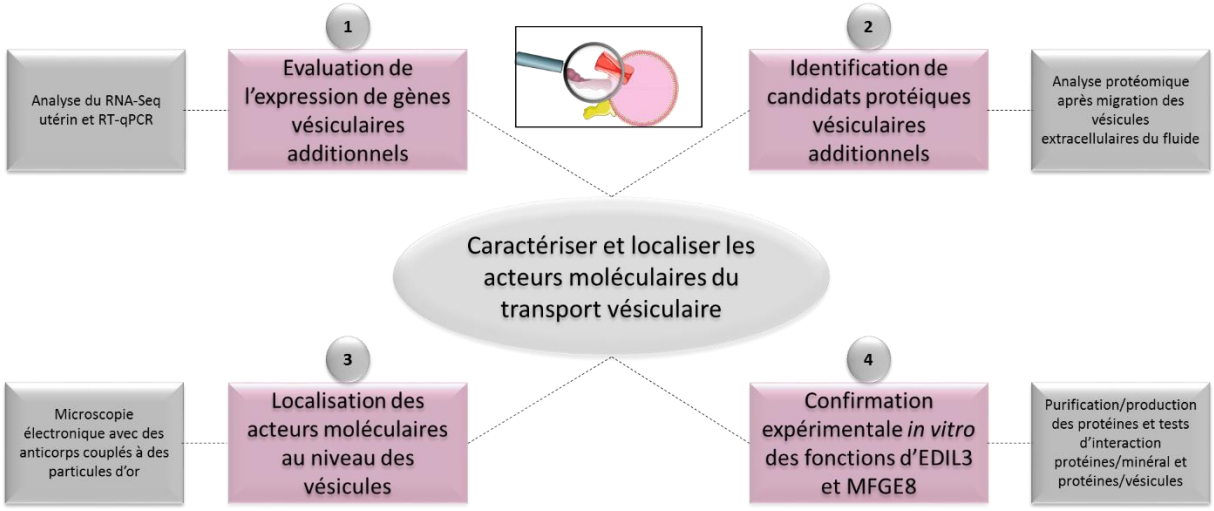


Figure 49. Schéma des objectifs et réalisations techniques de l'axe 1 des perspectives.

Une fois l'identification des protéines complétée, il s'agira alors de localiser les protéines clefs du transport vésiculaire au niveau des vésicules. Cette localisation pourra être effectuée avec des anticorps spécifiques. Au vu de la taille des vésicules, l'utilisation du microscope confocal ne sera pas possible pour obtenir une localisation au sein des vésicules. Aussi, nous envisageons l'utilisation d'anticorps spécifiques couplés à des particules d'or et incubés sur des coupes de tissus utérins et des vésicules extracellulaires du fluide, avant d'être visualisées au microscope électronique. Des analyses similaires, démontrant sa faisabilité, ont déjà été menées avec d'autres protéines (ostéopontine, OCX-32 et OC-116) de la coquille d'œuf de poule (**Figure 50**) (Hincke *et al.* 1999, Gautron *et al.* 2001a, Hincke *et al.* 2008).

Les résultats qui seront obtenus permettront de confirmer la présence des protéines clefs du transport vésiculaire (ANX, CA4, EDIL3, PDCD6IP et les autres nouvellement identifiées), au niveau des vésicules utérines et extracellulaires. Cette étude permettrait de localiser les protéines au sein des vésicules, afin notamment, de confirmer la localisation membranaire des annexines, d'EDIL3 ou de MFGE8. Par ailleurs, des structures ressemblant à des vésicules ont été mises en évidence dans la coquille décalcifiée (**Figures 43** et **50**) (Dennis *et al.* 1996, Fraser *et al.* 1998, Hincke *et al.* 1999, Hincke *et al.* 2008). Nous avons posé l'hypothèse que ces structures correspondraient aux vésicules extracellulaires du fluide utérin, qui seraient incorporées dans la structure minérale. Aussi, l'utilisation d'anticorps spécifiques couplés à des particules d'or sera étendue à des coupes de coquilles décalcifiées, afin de valider cette hypothèse (**Figure 50**).

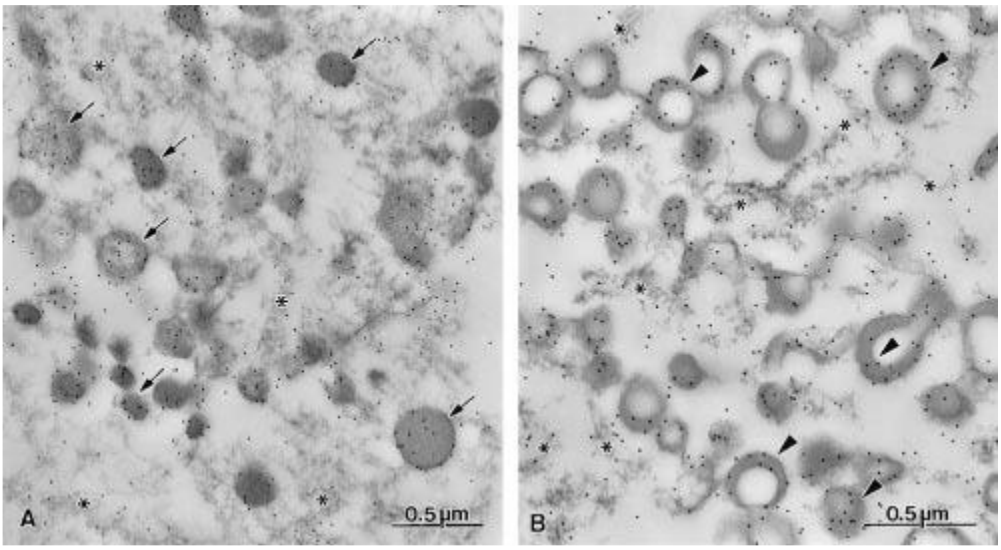


Figure 50. Microphotographies (MET) de coquille décalcifiée après incubation avec un anticorps (anti-OC-116) couplé à des particules d'or. Un signal positif intense est observable au niveau des vésicules. **A.** partie supérieure des noyaux mammillaires **B.** couche palissadique. Les flèches noires indiquent les vésicules (Hincke *et al.* 1999).

Notre étude structurale des protéines EDIL3 et MFGE8 nous a permis de prédire une interaction entre ces protéines et le minéral du site de minéralisation de la coquille. Ainsi, dans notre modèle de transport vésiculaire, les protéines EDIL3 et MFGE8 interagissent avec les phospholipides des vésicules et le calcium du site de minéralisation pour adresser les vésicules. Ces deux protéines pourraient être purifiées afin de confirmer leurs fonctions de manière expérimentale. Différentes protéines de la matrice organique de la coquille ont déjà été purifiées (OC-17, OC-116, OCX-32) (Hincke *et al.* 1995, Hincke *et al.* 1999, Gautron *et al.* 2001a). De plus, chez le bovin, l'orthologue de la glycoprotéine MFGE8 a été purifié grâce à une combinaison de systèmes chromatographiques, à partir des globules gras du lait (Kim *et al.* 1992, Hvarregaard *et al.* 1996). Ce système de purification est basé sur une chromatographie d'affinité Concanavalin-A-agarose qui permet la purification des glycoprotéines, comme MFGE8. En effet, la Concanavalin-A est une protéine de la famille des lectines, isolée du haricot, qui a la capacité de fixer des glucides. Ce type de chromatographie pourrait permettre de purifier la protéine MFGE8 et son homologue EDIL3. Les difficultés seront d'obtenir les protéines en quantité suffisante pour réaliser les tests *in vitro* et de conserver la structure et la fonctionnalité des protéines purifiées. Ces protéines étant des protéines majeures de la matrice organique de la coquille, elles devraient toutefois être présentes en quantité assez importante. Cependant, nous avons vu dans les objectifs de cette thèse, qu'il est difficile de purifier les protéines inclues dans la coquille. Les protéines pourraient donc être purifiées à partir du fluide utérin, dans lequel elles sont retrouvées (Marie *et al.* 2015a). En alternative, des productions de protéines recombinantes à partir des séquences des gènes *Edil3* et *Mfge8* du poulet pourraient être envisagées dans l'organisme *Pischia pastoris*, si les purifications ne permettent pas d'obtenir les protéines désirées en quantité suffisante. Cet organisme hôte permettra ainsi de conserver les modifications post-traductionnelles des protéines qui pourraient participer aux fonctions moléculaires. Des expériences préliminaires ont été réalisées dans notre laboratoire afin de produire une autre protéine de la matrice organique de la coquille (OCX-32). Après cette étape de purification, les fonctions des protéines pourront être explorées *via* des tests *in vitro*. La capacité d'interaction avec le minéral des protéines pourra alors être validée *via* des tests d'interaction protéine / minéral (Dominguez-Vera *et al.* 2000, Jimenez-Lopez *et al.* 2003). En complément, leur capacité d'interaction avec les vésicules pourra être évaluée avec des tests d'interaction entre les protéines purifiées et des liposomes de phospholipides. Des tests d'interaction *in vitro* avec des vésicules ont déjà été réalisés pour la protéine MFGE8 du bovin (Shao *et al.* 2008, Otzen *et al.* 2012). Ils pourraient servir de base pour l'élaboration des tests à effectuer.

2.2. Validation fonctionnelle du lien entre les vésicules extracellulaires et la biominéralisation de la coquille

Une des questions restées en suspens à l'issue de cette thèse, est l'origine du calcium vésiculaire. Le calcium est-il introduit dans les vésicules lorsque celles-ci se trouvent encore dans les cellules utérines, ou existe-t-il une entrée de calcium au niveau extracellulaire ? Pour ce faire, il faudra réaliser des analyses de cryo-microscopie électronique à transmission, afin de repérer la présence de carbonate de calcium dans les vésicules intracellulaires des cellules utérines. En effet, dans notre étude, nous avons démontré la présence de vésicules extracellulaires dans le fluide et nous avons observé la présence de vésicule intracellulaire dans le tissu utérin. Toutefois, les analyses de spectroscopie n'ont pas été réalisées sur les vésicules présentes dans les cellules utérines car cela nécessite des techniques de cryo-microscopie (cryo-préservation des tissus et cryo-fracture). Ces techniques ont préalablement été utilisées pour étudier les phases minérales de certains vertébrés et invertébrés (Mahamid *et al.* 2010, Mahamid *et al.* 2011, Vidavsky *et al.* 2015, Kerschnitzki *et al.* 2016a). Chez l'oursin, des vésicules intracellulaires contenant de l'ACC ont ainsi été observées dans les cellules épithéliales (Beniash *et al.* 1999, Addadi et Weiner 2014, Vidavsky *et al.* 2014, Vidavsky *et al.* 2015). Par conséquent, l'étude des cellules utérines *via* des techniques de cryo-microscopie pourrait permettre de savoir si l'ACC, qui est retrouvé dans les vésicules extracellulaires, est inclus à l'intérieur des cellules ou dans le milieu extracellulaire (fluide utérin) (**Figure 51**).

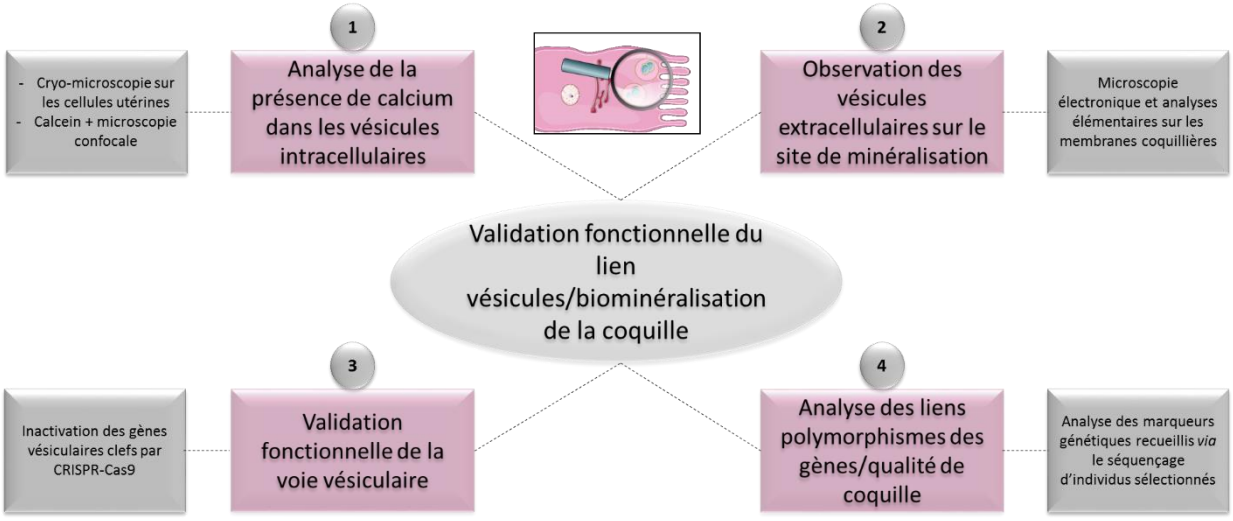


Figure 51. Schéma des objectifs et réalisations techniques de l'axe 2 des perspectives.

De plus, il pourrait être intéressant d'utiliser un indicateur du calcium fluorescent tels que la calceine ou le Fluo-3 pour traquer le calcium cellulaire et vésiculaire au niveau de

l'épithélium et du fluide utérin. Ces types de marquage ont été utilisés pour étudier la répartition du calcium en microscopie confocale dans l'embryon d'oursin (Vidavsky *et al.* 2014, Vidavsky *et al.* 2015). Cela nécessitera plusieurs étapes de mises au point mais pourrait apporter des éléments de réponse sur l'origine des vésicules du fluide utérin contenant du minéral. En complément, les connaissances sur le magnum (segment de l'oviducte synthétisant les constituants du blanc) pourraient également apporter des informations à ce niveau (Nys et Guyot 2011). En effet, les protéines synthétisées dans le magnum sont stockées dans des granules adjacents à la lumière de l'oviducte et sécrétées au moment du passage de l'œuf. Les protéines produites au niveau du réticulum endoplasmique sont encapsulées dans une membrane trilamellaire au niveau de l'appareil de Golgi. Les vésicules formées sont ensuite assemblées en granules plus larges qui sont extrudés par fusion avec la membrane plasmique (Nys et Guyot 2011). La biogénèse des vésicules utérines contenant du minéral pourrait contenir des homologies avec le mécanisme vésiculaire du magnum.

Dans notre étude, nous avons observé des vésicules extracellulaires qui contiennent de l'ACC dans le fluide utérin. Au niveau de la coquille d'œuf, l'ACC est massivement déposé sur les membranes coquillières avant de s'accumuler sur les noyaux mamillaires pour former la calcite (Rodriguez-Navarro *et al.* 2015). Dans notre modèle du transport vésiculaire, les vésicules délivrent l'ACC directement sur le site de minéralisation. Ainsi, des observations des membranes coquillières, prélevées sur des œufs en cours de formation (5-10 h post-ovulation), pourraient être envisagées pour soutenir nos résultats. Cela permettrait de repérer les vésicules extracellulaires au niveau des noyaux mamillaires. Pour cela, des observations en microscopie électronique à balayage ou à transmission, sur des coupes de membranes coquillières cryo-préservées, pourraient être effectuées. En complément, des analyses élémentaires (EDS, EELS) pour détecter la présence de $CaCO_3$ dans ces vésicules pourraient être réalisées.

Afin de valider fonctionnellement la voie vésiculaire, les gènes clefs de ce transport pourront être inactivés *via* la technique CRISPR-Cas9. Un programme « Crisp'chick » est actuellement en cours au sein de notre unité « Biologie des oiseaux et aviculture », afin de mettre au point cette nouvelle technique d'édition du génome chez le poulet. Cette technique de biologie moléculaire est fondée sur un complexe CRISPR-cas9 formé de deux éléments : d'un côté le brin d'ARN, homologue du gène à inactiver et de l'autre l'enzyme endonucléase Cas9. Dans la cellule, l'enzyme Cas9, guidée par l'ARN qui reconnait la séquence homologue d'ADN du gène cible, excise l'ADN complémentaire. Le gène se retrouve ainsi inactivé dans la cellule. Chez le poulet, cette manipulation est réalisée sur de cellules germinales primordiales

(CGPs) en culture qui seront ensuite injectées à l'embryon au cours du développement précoce. Ainsi, le phénotype lié à l'inactivation du gène cible pourra être évalué. Dans le programme « Crisp'chick », l'inactivation d'un gène encodant une protéine majeure de la matrice organique de la coquille (OCX-32) sera testée. Lorsque cette méthode sera au point, les gènes clefs du transport vésiculaire pourront être inactivés à leur tour. Les qualités des coquilles (résistance à la rupture, dureté, élasticité, rigidité), des œufs pondus par les poules qui auront des gènes du transport vésiculaire inactivés, seront évaluées *via* le testeur numérique d'œuf DET-6000 ou l'Instron®, disponibles dans notre unité. De cette manière, l'implication du transport vésiculaire pourra être déterminée.

Actuellement, la sélection génomique est utilisée afin de sélectionner des poules qui pondent des œufs aux coquilles plus résistantes. Cette sélection est basée sur l'association de marqueurs génétiques (single nucleotide polymorphism, SNP et quantitative trait locus, QTL) à un phénotype (qualité de coquille). Plusieurs études ont permis de repérer des SNPs associés à la qualité de coquille (Tuiskula-Haavisto *et al.* 2002, Ankra-Badu et Aggrey 2005, Dunn *et al.* 2009a, Takahashi *et al.* 2009, Jiang *et al.* 2010, Takahashi *et al.* 2010, Yao *et al.* 2010, Liu *et al.* 2011, Tuiskula-Haavisto *et al.* 2011, Rome et Le Roy 2016). Dans le cadre d'une collaboration entre mon équipe d'accueil, une équipe de généticiens de l'INRA de Rennes et un sélectionneur avicole (Novogène), les gènes codant pour les protéines impliquées dans la minéralisation ont été localisés sur les génomes de grands parentaux sélectionnés pour la ponte. Ces différents reproducteurs étant séquencés, les polymorphismes des animaux existants sur ces gènes ou leurs régions régulatrices seront recherchés. La conséquence de ces polymorphismes sur la qualité des œufs issus de ces animaux sera mesurée et les allèles favorables seront établis. Parmi la liste des gènes ciblés, ceux impliqués dans le transport vésiculaire seront analysés dans ce dispositif.

2.3. Analyse de la variation du transport vésiculaire au cours de la biominéralisation de la coquille

Notre étude a permis d'identifier le transport vésiculaire comme étant principalement impliqué dans l'initiation de la minéralisation et notamment lors du dépôt massif d'ACC sur l'œuf et sa transformation en calcite. Toutefois, l'ACC est délivré à tous les stades sur le front de minéralisation. Aussi, il sera important d'analyser l'évolution du transport vésiculaire au cours de la minéralisation de la coquille (**Figure 52**). Pour ce faire, une première méthode consisterait à doser les phospholipides dans le fluide utérin récolté à différents stades de la

minéralisation (5 h, 6 h, 7 h, 10 h, 16 h et 22 h). En effet, la membrane des vésicules impliquées dans la biominéralisation est composée principalement de phospholipides qui proviennent de la membrane plasmique des cellules (Golub 2009, Hasegawa *et al.* 2017, Bottini *et al.* 2018). Le dosage des phospholipides pourrait être réalisé sur le fluide utérin avec une méthode colorimétrique enzymatique. La quantité de phospholipides serait alors proportionnelle à la quantité de vésicules extracellulaires dans le fluide. Ainsi, l'évolution du transport vésiculaire au cours de la minéralisation pourra être déduite. La seconde méthode consisterait à quantifier par RT-qPCR l'expression des gènes codant pour les protéines clefs du transport vésiculaire (EDIL3, PDCD6IP, CA4, ANXs) dans le tissu utérin, à différents stades de la minéralisation. Ces résultats pourront être confrontés aux données de RNA-Seq du tissu utérin réalisé à différents stades de la minéralisation (Gautron 2017a, Gautron *et al.* en cours). La troisième méthode pourrait être le dosage des protéines clefs du transport vésiculaire dans le fluide utérin, récolté à différents stades de la minéralisation. Pour cela, des dosages quantitatifs ELISA par compétition, développés pour d'autres protéines de la matrice organique de coquille (Panheleux *et al.* 2000), ou des analyses de Western Blots semi-quantitatifs, également utilisées pour des protéines de la matrice organique de coquille (Hincke *et al.* 1999, Hincke *et al.* 2000, Gautron *et al.* 2001a, Gautron *et al.* 2007a), pourraient être employés. Toutefois, pour être fiables, ces méthodes demandent une technique d'extraction complète et reproductible des protéines de la matrice organique. De plus, les dosages ELISA précédemment réalisés par mon équipe ont nécessité une dilution importante des protéines de la matrice organique, ce qui peut entrainer une perte de précision de la méthode. Ces résultats seront donc confrontés aux résultats de protéomique quantitative précédemment obtenus sur des coquilles à différents stades de la minéralisation (Marie *et al.* 2015a). En complément, une analyse de protéomique de fluides utérins recueillis à différents stades de la minéralisation (5 h, 6 h, 7 h, 10 h et 16 h) pourrait être effectuée (Marie *et al.* 2015a). Ainsi, les abondances des protéines clefs du transport vésiculaire au cours du processus de minéralisation seront connues. Ces différentes méthodes pourront alors permettre d'évaluer de manière précise l'évolution du transport vésiculaire au cours du processus.

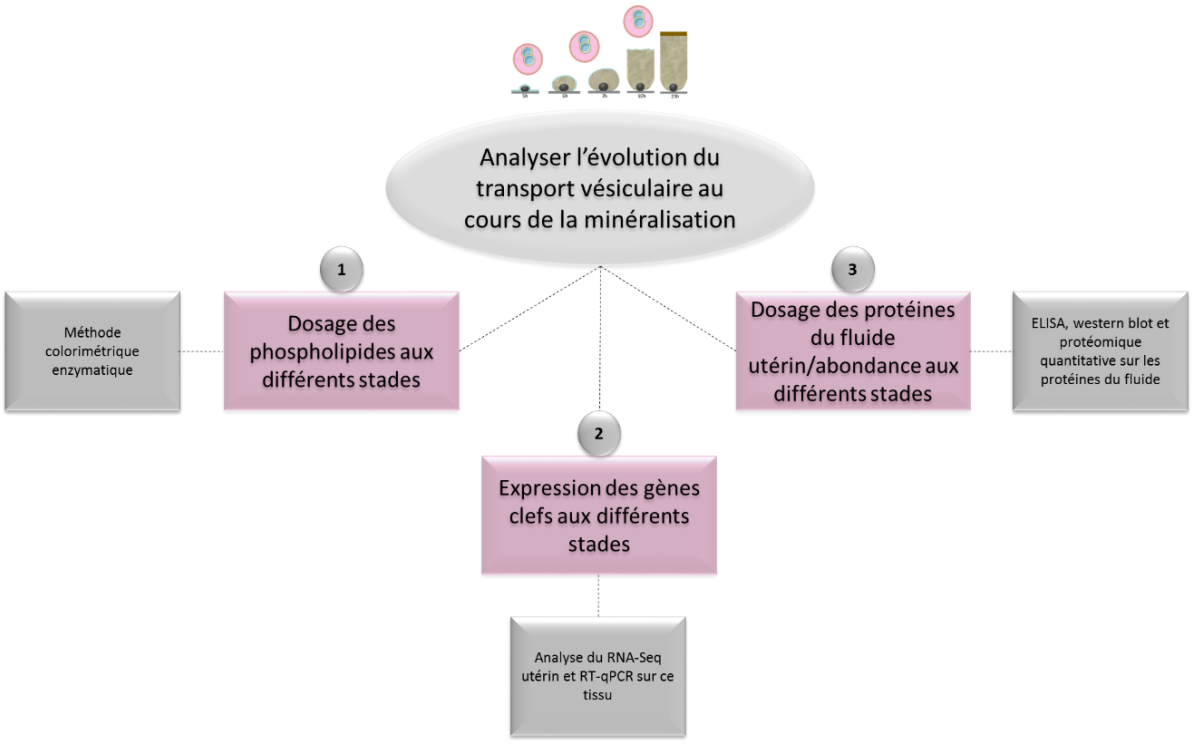


Figure 52. Schéma des objectifs et réalisations techniques de l'axe 3 des perspectives.

2.4. Implications respectives des différentes voies de transport du minéral nécessaire à la minéralisation de la coquille d'œuf de poule

Après avoir caractérisé en profondeur le transport vésiculaire impliqué dans la minéralisation, l'implication des différentes voies de transport du minéral proposées dans notre étude pourra être évaluée (**Figure 53**).

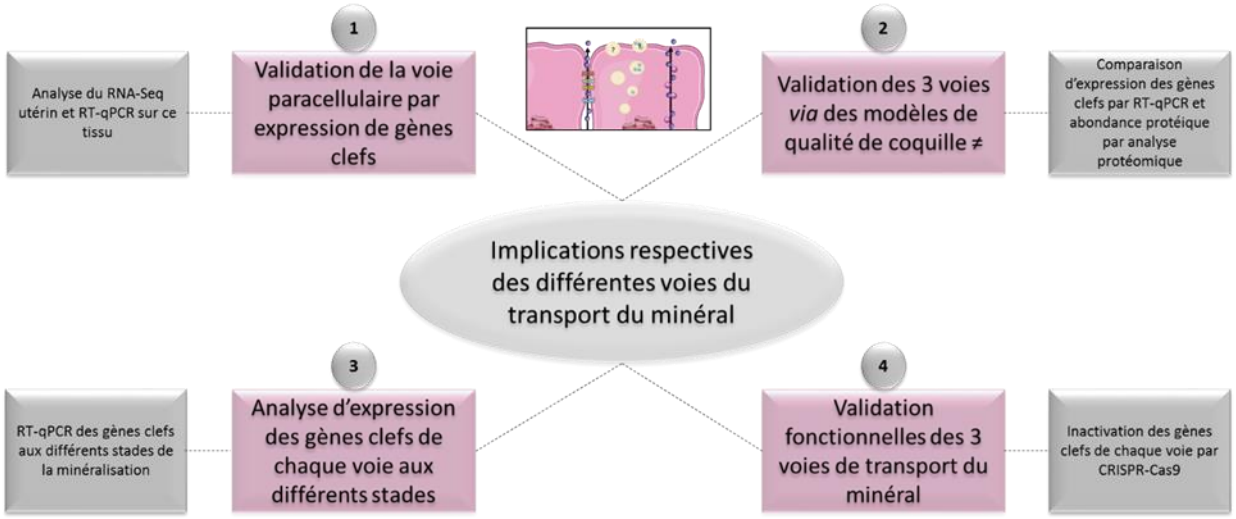


Figure 53. Schéma des objectifs et réalisations techniques de l'axe 4 des perspectives.

Dans la discussion nous avons proposé l'implication de 3 voies alternatives assurant l'apport des précurseurs minéraux sur le site de la minéralisation. La voie transcellulaire a été décrite dans plusieurs études (Jonchere *et al.* 2012, Brionne *et al.* 2014, Nys et Le Roy 2018), alors que la voie vésiculaire a été mise en évidence durant cette thèse. De plus, nous avons proposé l'implication de la voie paracellulaire au niveau de l'utérus, qui correspondrait à une voie alternative de l'apport en calcium dans le fluide utérin au cours de la minéralisation. Chez la poule, cette voie a été démontrée dans l'intestin en période de ponte (Gloux *et al.* 2019). Les principaux acteurs moléculaires du transport paracellulaire ont été déterminés (CLN, OCLN, JAM, TJP). Dans l'utérus, le gradient de concentration ne semble pas favorable à cette voie. Toutefois, les acteurs moléculaires de cette voie étant retrouvés au niveau de ce tissu, il apparait important d'évaluer son implication. Afin de déterminer l'implication de cette voie au niveau de l'utérus, des analyses d'expression des gènes clefs pourront être effectuées par RT-qPCR. Les résultats obtenus pourront être validés par comparaison avec les données RNA-Seq du tissu utérin (Gautron 2017a). Les expressions de ces gènes dans l'utérus pourront également être comparées entre des poules immatures ou matures et/ou entre des poules jeunes et des poules âgées.

Une fois les acteurs de ces 3 voies connus, nous proposons de comparer l'expression des gènes et l'abondance de leurs protéines entre des individus dont la qualité de coquille diffère (coquilles fragiles contre coquilles solides). Ainsi, les comparaisons d'expression de gènes ou d'abondances protéiques entre les différents groupes de qualités de coquilles permettraient

d'observer une éventuelle corrélation entre les 3 voies de transport et la qualité de coquille et de hiérarchiser l'implication de chacune de ces voies.

Les modèles proposés utiliseraient des poules provenant de la même lignée, mais dont la qualité des coquilles varierait en fonction de l'âge, de la mue, ou suite à une sélection sur des critères mécaniques comme cela a été fait auparavant (Panheleux *et al.* 2000, Ahmed *et al.* 2005, Sun *et al.* 2013). Actuellement, notre équipe participe à un programme qui a pour objectif de mettre en lien la qualité de la coquille avec la qualité osseuse des poules (Bone strength quality, BSQ). Ainsi, une analyse de protéomique différentielle entre des lots de coquilles fragiles et solides (Low breaking strength, LBS et High breaking strength, HBS) provenant d'individus sélectionnés (grands parentaux) est en cours. Dans ce projet, les œufs proviennent 1) de poules d'âge identique ayant des œufs avec des qualités de coquilles différentes ou 2) de poules d'âges différents.

Après cette étape, les 3 voies alternatives assurant le transport des précurseurs minéraux nécessaires à la formation de la coquille pourront être quantifiées aux différents stades clefs de la minéralisation (5 h, 6 h, 7 h, 10 h et 16 h). Pour cela, les expressions des gènes clefs de chaque voie seront comparées par RT-qPCR. Les données du RNA-Seq du tissu utérin aux différents stades de la minéralisation pourront également être analysées (Gautron 2017a). Ainsi, les contributions respectives des trois voies, au cours du processus de minéralisation, seront déterminées. A ce niveau, deux hypothèses sont envisageables. Dans la première hypothèse, les trois voies fonctionnent en concert durant tout le processus de minéralisation. Dans la deuxième hypothèse, les trois voies ne sont pas actives aux mêmes stades de la minéralisation, c'est-à-dire que l'une prendrait le relais d'une précédente. Les résultats d'expression permettront de trancher entre ces deux hypothèses. Un modèle global de la synchronisation des différentes voies du transport du minéral au cours du processus de minéralisation pourra alors être établi.

Finalement, l'implication des trois voies dans le mécanisme de biominéralisation pourra être validée fonctionnellement par inactivation des acteurs clefs. De la même manière que pour la voie vésiculaire (**perspectives 1.2**), les acteurs clefs des voies transcellulaire et paracellulaire pourront être inactivés. Pour cela, la méthode CRISPR-Cas9 sera utilisée pour inactiver les gènes codant pour les protéines clefs des différents transports. Ainsi, les phénotypes de coquilles obtenus permettront de valider fonctionnellement l'implication des différentes voies dans le processus de minéralisation de la coquille d'œuf de poule.

2.5. Transposition du modèle du transport vésiculaire du minéral à d'autres systèmes biologiques

Le transport vésiculaire mis en évidence dans l'utérus de la poule au cours de cette thèse pourrait potentiellement être transposé au niveau d'autres systèmes impliquant un transfert du minéral (**Figure 54**).

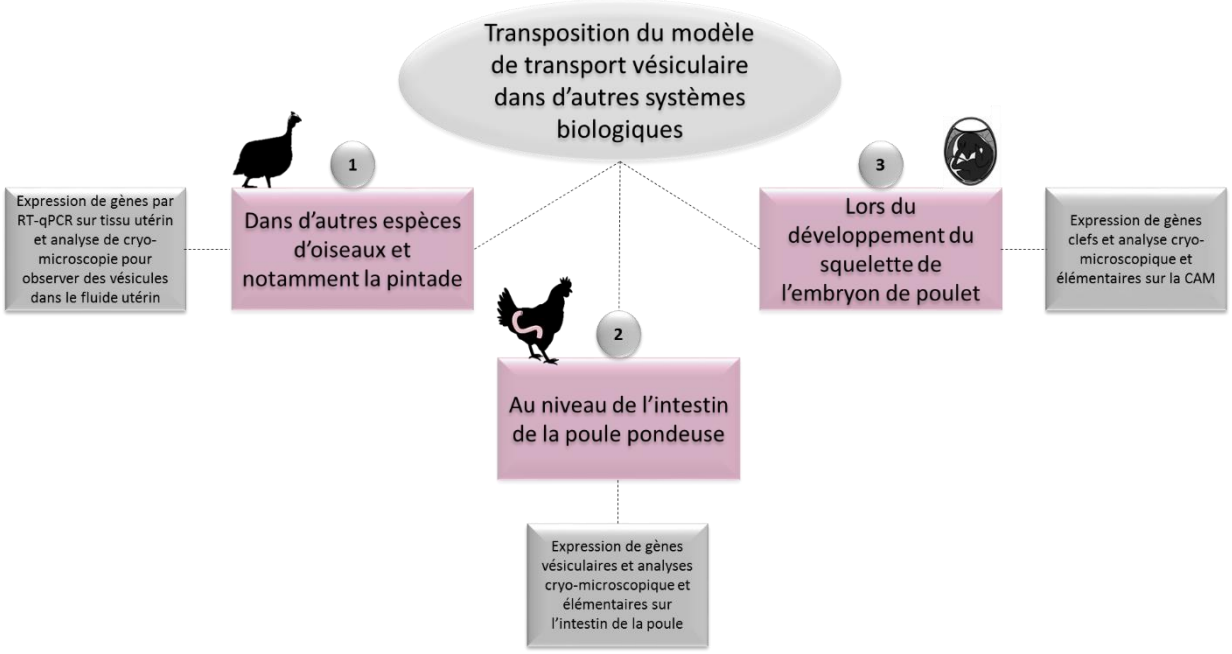


Figure 54. Schéma des objectifs et réalisations techniques de l'axe 5 des perspectives. L'image du poussin en développement est issue de (Da Silva *et al.* 2017).

La structure globale des coquilles d'oiseaux est similaire, malgré quelques spécificités structurales selon les espèces (Panheleux *et al.* 1999a, Rodriguez-Navarro 2007, Nys *et al.* 2010). Le processus de formation des différentes coquilles d'oiseaux semble basé sur un mécanisme ancestral partagé qui a dû subir des arrangements spécifiques en fonction des espèces. Une récente étude a également rapporté la présence de protéines de la matrice organique de la coquille d'œuf de poule dans la coquille d'œuf de pintade (Le Roy *et al.* 2019). De plus, l'étude de Zhu et ses collaborateurs a permis de souligner qu'une soixantaine de protéines impliquées dans la minéralisation de la coquille était partagée entre quatre espèces d'oiseaux (poule, dinde, canard et caille) (Zhu *et al.* 2019). Parmi celles-ci, plusieurs participent au transport vésiculaire mis en évidence dans l'utérus de poule (ANXA2, CA4, EZR, LYZ, MFGE8, PDCD6IP, Syntenin-1). Par conséquent, il serait intéressant d'explorer l'implication

du transport vésiculaire dans la minéralisation des coquilles chez d'autres espèces d'oiseaux (caille, dinde, canard). Pour cela, une analyse de microscopie à transmission du fluide utérin (semblable à celle réalisée pour la poule) de ces espèces d'oiseaux pourraient être envisagée. En complément, une analyse d'expression des gènes codant pour les acteurs moléculaires clefs du transport vésiculaire (EDIL3, CA4, ANX, PDCD6IP) pourra être effectuée sur les tissus utérins des différentes espèces d'oiseaux. Par ailleurs, il sera particulièrement intéressant de transposer ce modèle à la pintade. En effet, cette espèce pond des œufs particulièrement solides et on assiste à une modification de la taille et de l'orientation des cristaux à environ 1/3 de l'épaisseur de la coquille de pintade (Panheleux *et al.* 1999b, Le Roy *et al.* 2019). La nouvelle couche cristalline est formée sous l'action d'évènements de nucléation secondaires médiés par la matrice organique (Rodríguez-Navarro *et al.* soumis). Le profil protéique associé à ces modifications chez la pintade, met en évidence des protéines nouvelles et d'autres surabondantes lors de ce changement de phases cristallines. Par conséquent, il serait important d'analyser le rôle du transport vésiculaire dans ces mécanismes.

Dans la discussion, nous avons décrit des similarités entre le transfert du calcium qui se déroule dans l'utérus et celui de l'intestin de la poule pondeuse. En effet, au niveau de la voie transcellulaire, certains transporteurs de calcium sont impliqués dans les deux tissus. ATP2B1, ATP2B2, TRPV2, CALB1 en sont des exemples (Nys et Le Roy 2018, Gloux *et al.* 2019). De plus, au niveau de la voie paracellulaire récemment mise en évidence dans l'intestin de la poule pondeuse (Gloux *et al.* 2019), certaines similarités semblent également exister avec l'utérus. L'analyse des données RNA-Seq du tissu utérin a permis de repérer une forte expression de plusieurs gènes codant pour des protéines étant des candidats potentiels majeurs du transport du calcium réalisé *via* la voie paracellulaire (*Tjp1, Cldn3, Cldn1, Cldn10, Ocln* et *Jam2).* De ce fait, il est également possible qu'un transport vésiculaire proche de celui mis en évidence dans l'utérus de la poule pondeuse puisse être impliqué dans le transfert du calcium au niveau de l'intestin. Des études précédentes ont démontré la contribution d'un transport vésiculaire dans l'absorption du fer au niveau des entérocytes humains (Linder *et al.* 2006, Moriya et Linder 2006). En effet, des activités d'endocytose au niveau de la bordure en brosse et d'exocytose au niveau de la membrane basolatérale participeraient au transport du fer de l'intestin vers le sang. Un transport vésiculaire du calcium a également été proposé au niveau de l'intestin chez la poule (Nemere et Norman 1988, Larsson et Nemere 2002). Dans ce système, des vésicules contenant du calcium seraient formées dans la partie apicale des cellules et certaines d'entre elles fusionneraient avec des lysosomes. Ces vésicules/lysosomes seraient transportées par les

microtubules et fusionneraient avec la membrane basale pour extruder par exocytose le calcium dans le milieu extracellulaire (Nemere et Norman 1988, Larsson et Nemere 2002). La vitamine D3 stimulerait ce transport. Ces données soutiennent l'implication d'un transport vésiculaire du calcium dans l'intestin. Afin de confirmer cette voie de transfert du calcium au niveau de l'intestin des poules pondeuses, une analyse d'expression de gènes impliqués dans les mécanismes d'endocytose et d'exocytose pourrait être effectuée. En complément, une analyse de cryo-microscopie électronique de l'intestin de la poule pondeuse pourrait être réalisée pour évaluer son activité vésiculaire et observer de potentielles vésicules contenant du calcium (spectroscopies EDS et EELS).

Lors du développement du squelette de l'embryon de poulet, des vésicules extracellulaires impliquées dans la minéralisation ont été retrouvées (Balcerzak *et al.* 2008). Chez l'oiseaux, la coquille de l'œuf constitue une source de calcium qui permet le développement du squelette de l'embryon (Johnston et Comar 1955, Freeman et Vince 1974, Arias *et al.* 1993, Hincke *et al.* 2019). En effet, la couche des noyaux mamillaires est résorbée et les membranes coquillières se détachent du reste de la coquille, fournissant ainsi du calcium pour le développement du squelette de l'embryon (**Figure 55**) (Hincke *et al.* 2019). Plus précisément, ce sont les structures appelées CRB (calcium reserve body) qui seraient résorbées lors de la dissolution de la coquille (Chien *et al.* 2009). La dissolution serait permise par la libération de proton H^+ générée par la conversion du CO_2 en HCO_3^- *via* l'action d'une anhydrase carbonique (Tuan et Zrike 1978). Une pompe à proton H^+-ATPase participerait également à l'acidification de la coquille (Narbaitz *et al.* 1995, Gabrielli et Accili 2010). Des modifications morphologiques des cellules de la membrane chorioallantoique (CAM), telles que des extensions cytoplasmiques seraient également impliquées dans ce mécanisme (Gabrielli et Accili 2010). Le calcium dissous est alors pris en charge par la CAM qui assure son transfert jusqu'à l'embryon (Chien *et al.* 2009, Hincke *et al.* 2019). Ce processus serait assuré par un transport transcellulaire à travers la CAM qui est composée de deux épithéliums (chorionique et allantoïque) et d'un mésoderme central (Hincke *et al.* 2019). Ainsi, une protéine Ca^{2+}-binding (transcaclin) assurerait le transport du calcium dans la CAM (Tuan *et al.* 1978, Gabrielli et Accili 2010). Alternativement, un modèle de transport vésiculaire du calcium a également été proposé dans une revue sur la membrane chorioallantoique du poussin (Gabrielli et Accili 2010). Dans ce modèle, le calcium solubilisé est internalisé par endocytose dans les cellules au niveau de la surface apicale des cellules chorioniques. Les vésicules transitent ensuite dans les cellules et délivrent le calcium au niveau de la membrane basolatérale. Le protéome de la CAM

rapporte également les protéines ANXA2, ANXA8 et MFGE8 (Matschke *et al.* 2006, Cordeiro et Hincke 2016), qui sont des acteurs du transport vésiculaire de l'épithélium de l'utérus. De plus, les protéines du transport vésiculaire de l'utérus EDIL3 et MFGE8 sont surabondantes au niveau des membranes coquillières d'œufs fertilisés au 7ème jour du développement embryonnaire et la protéine ANXA2 est surabondante au 11ème jour du développement, par comparaison avec des œufs non fertilisés. Ces surabondances coïncident avec le début du transport calcique réalisé par la CAM (10-12 jours du développement embryonnaire) (Gabrielli et Accili 2010). Pour déterminer si un transport vésiculaire semblable à celui de l'utérus serait impliqué dans le transport du calcium au niveau de la CAM, une analyse d'expression de gènes clefs serait envisagée. Une analyse en cryo-TEM de la CAM pourrait également être entreprise afin d'observer d'éventuelles vésicules intracellulaires contenant du minéral (spectroscopies EDS et EELS). La présence d'un transport vésiculaire permettrait d'acheminer le calcium provenant de la coquille jusqu'au site de minéralisation du squelette de l'embryon. Cela permettrait de préserver un taux de calcium optimal dans le cytosol des cellules de la CAM. De nombreuses vésicules contenant du minéral ont été observées en cryo-microscopie électronique au niveau des os longs et dans les vaisseaux sanguins d'embryon de poulet en cours de développement (Kerschnitzki *et al.* 2016a, Kerschnitzki *et al.* 2016b). Ainsi, les potentielles vésicules extracellulaires provenant de la CAM pourraient transiter dans les vaisseaux sanguins afin de délivrer le minéral nécessaire à la formation du squelette de l'embryon. Cela permettrait d'éviter les éventuelles minéralisations ectopiques qui pourraient se produire. Enfin, la voie paracellulaire pourrait également être explorée au niveau des jonctions des cellules de la CAM. En effet, il est envisageable que plusieurs voies alternatives participent au transport du calcium à travers la CAM. Un nouveau travail de doctorat va débuter prochainement, au sein de notre équipe, de manière à explorer en profondeur ce mécanisme de dissolution/transport du minéral de la coquille en lien avec le développement du squelette de l'embryon.

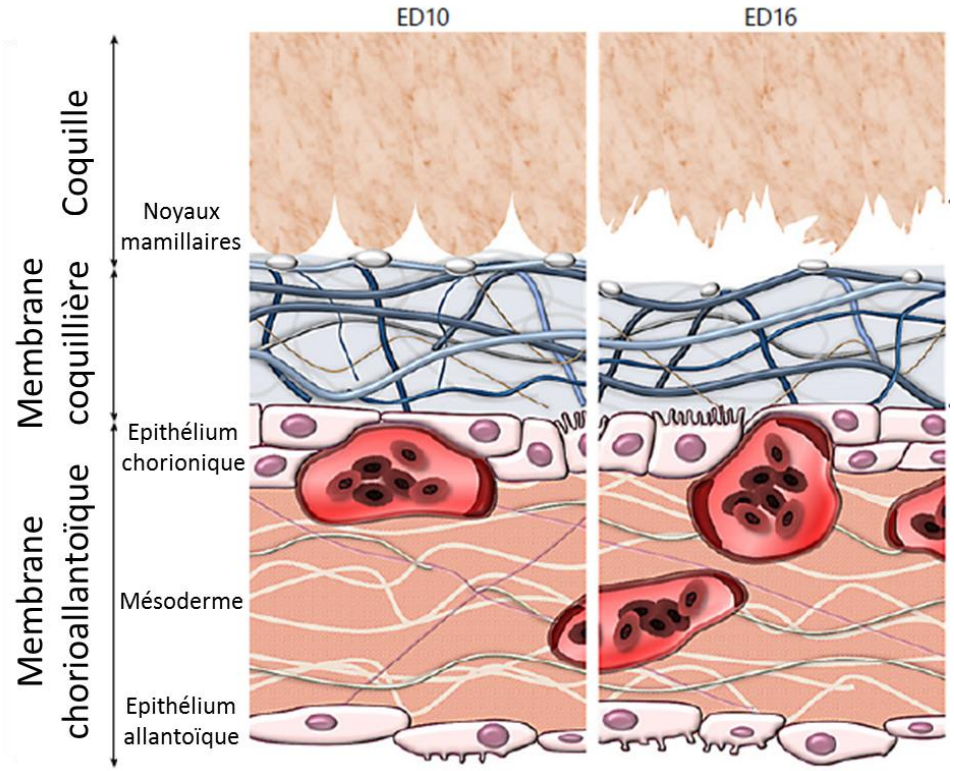


Figure 55. Schéma illustrant l'organisation de la membrane chorioallantoïque et la résorption de la coquille ayant lieu entre le 10ème et 16ème jour du développement embryonnaire du poussin. Au 16ème jour du développement embryonnaire, la membrane coquillière est détachée de la partie calcifiée et les noyaux mamillaires sont dissous (Hincke *et al.* 2019).

2.6. Retombées en terme de connaissances

Les résultats de cette thèse ont contribué à l'apport de nouvelles connaissances aussi bien fondamentales, que pour permettre le développement d'applications (**Figure 56**).

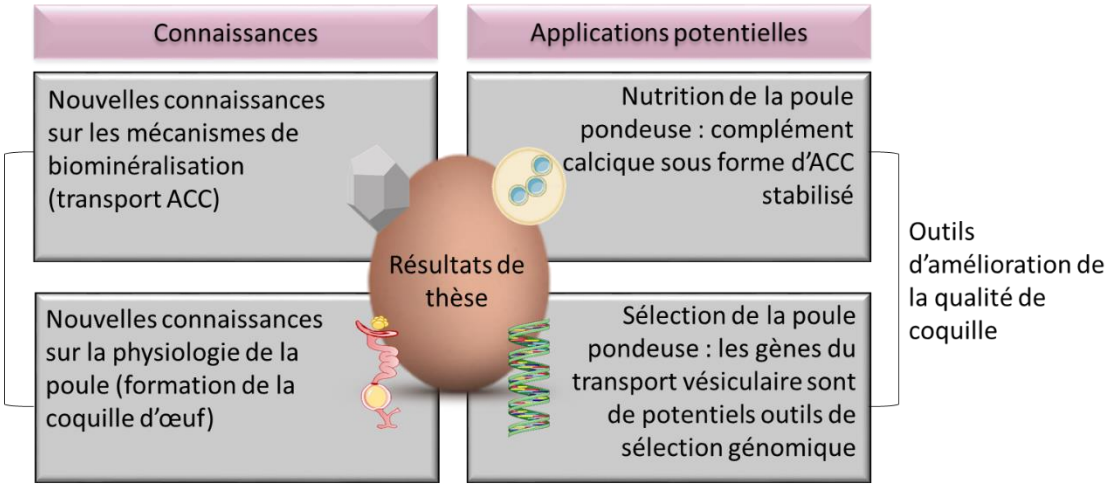


Figure 56. Connaissances et applications potentielles qui découlent des résultats de ce doctorat.

Les retombées de ce travail en terme de connaissances se situent à deux niveaux principaux.

Le premier niveau concerne la physiologie de la poule pondeuse, et plus précisément, la compréhension du processus de biominéralisation de la coquille d'œuf de poule. De nombreuses études ont décrit ce processus de minéralisation biogénique (Wyburn *et al.* 1973, Hamilton 1986, Nys *et al.* 2001, Gautron et Nys 2007b, Nys *et al.* 2010, Hincke *et al.* 2012, Rodriguez-Navarro *et al.* 2015). L'implication de la matrice organique de la coquille et l'identification de ses constituants ont également fait l'objet de plusieurs études (Gautron *et al.* 1996, Gautron *et al.* 1997, Nys *et al.* 2004, Mann *et al.* 2006, Miksik *et al.* 2010, Hincke *et al.* 2012, Rose-Martel *et al.* 2012, Sun *et al.* 2013, Ahmed *et al.* 2017). Les constituants majeurs de la matrice organique ont ensuite été hiérarchisés selon leurs rôles potentiels dans le processus de minéralisation (Marie *et al.* 2015b). En parallèle, le transport des précurseurs ioniques au niveau des cellules utérines a été étudié *via* des analyses de transcritomiques (Jonchere *et al.* 2012, Brionne *et al.* 2014, Nys et Le Roy 2018). C'est dans ce contexte que le projet de cette thèse a émergé. Au commencement, l'objectif de cette thèse était uniquement d'étudier le rôle de deux protéines majoritaires de la matrice organique (EDIL3 et MFGE8). A travers l'analyse de ces deux protéines, nous avons finalement mis en évidence un nouveau transport du carbonate de calcium impliqué dans la minéralisation. Dans ce transport, une phase amorphe du carbonate de calcium est adressée sur le site de la minéralisation pour permettre le développement des colonnes de cristaux composant la coquille. Ces résultats complètent ainsi l'ensemble des connaissances sur le processus de minéralisation de la coquille d'œuf obtenues jusqu'ici.

Ces travaux de thèse participent également au développement des connaissances sur les mécanismes généraux de la biominéralisation. De nombreux organismes invertébrés ou vertébrés ont recours au phénomène de biominéralisation. Ce dernier permet à ces organismes de métaboliser des structures rigides assurant diverses fonctions biologiques. L'étude de ces organismes minéralisants fournit une compréhension globale du phénomène de biominéralisation. En effet, les phénomènes de biominéralisation sont basés sur des principes généraux partagés (Weiner et Dove 2003), même si des spécificités existent selon le type de minéralisation et l'organisme en question. Ainsi, les nouvelles connaissances acquises sur un organisme minéralisant sont potentiellement transposables à d'autres organismes. En effet, le carbonate de calcium amorphe, découvert chez des organismes invertébrés (Addadi et Weiner 1992, Beniash *et al.* 1997, Addadi *et al.* 2003) a ensuite été retrouvé au niveau de la minéralisation de la coquille d'œuf de poule (Rodriguez-Navarro *et al.* 2015). De même, l'implication de vésicules dans le transport du minéral a été démontrée dans d'autres organismes minéralisants vertébrés ou invertébrés (Beniash *et al.* 1999, Weiner et Dove 2003, Addadi *et al.* 2006, Balcerzak *et al.* 2008, Mahamid *et al.* 2011, Vidavsky *et al.* 2015, Kerschnitzki *et al.* 2016a, Hasegawa *et al.* 2017).

En 2015, De Yoreo et collaborateurs ont décrit les différentes voies de cristallisation (De Yoreo *et al.* 2015). Cette revue a souligné l'implication des voies de cristallisation *via* des assemblages de particules minérales, proposant ainsi une alternative aux modèles classiques de la formation cristalline qui consistaient en une croissance monomère par monomère (**Figure 57**) (De Yoreo *et al.* 2015).

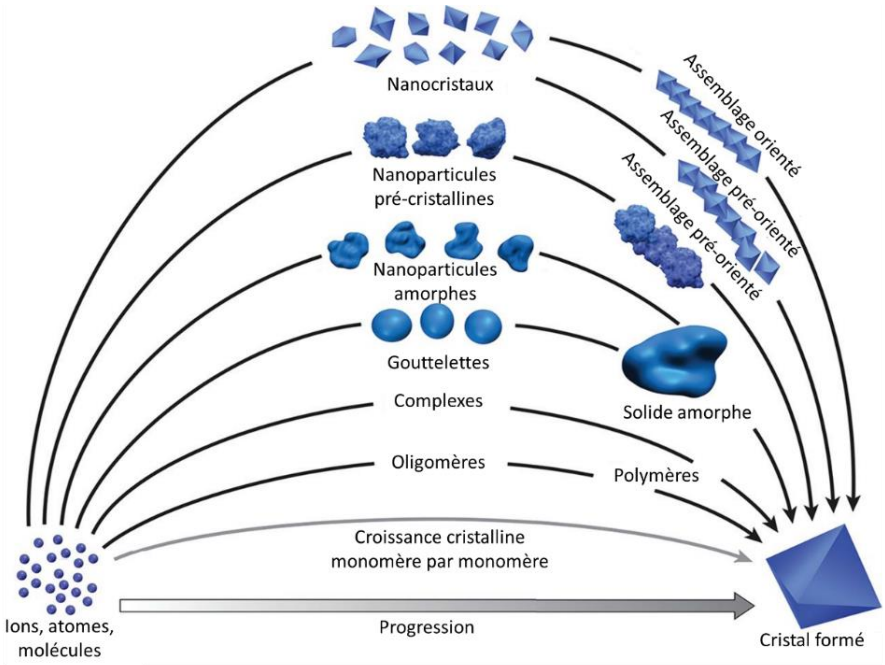


Figure 57. Les voies alternatives de cristallisation. Le modèle de la voie classique de croissance cristalline monomère par monomère est en gris. Les voies alternatives de formation cristalline par assemblage de particules minérales sont en noir. (De Yoreo *et al.* 2015)

Les premiers modèles de minéralisation de la coquille d'œufs décrivaient essentiellement une croissance monomère par monomère à partir d'ions en solution. Des travaux ont ensuite démontré le rôle de nanoparticules d'ACC dans la croissance cristalline de la coquille (Rodriguez-Navarro *et al.* 2015). Les résultats de cette thèse ont finalement permis de mettre en évidence des vésicules qui stabiliseraient l'ACC, précurseur du cristal qui compose la coquille. Une étude approfondie de ce mécanisme de stabilisation et des acteurs moléculaires impliqués permettraient d'enrichir les connaissances sur les voies de cristallisation par assemblage de nanoparticules. Cette étude pourrait être réalisée *via* une collaboration, déjà mises en place, avec le Dr. Stephan Wolf qui s'intéresse aux processus de biomimétismes pour la fabrication de nanomatériaux. Des discussions avec le Pr. Weiner de l'Institut Weizmann qui est une référence dans le domaine de la biominéralisation et le transfert du minéral associé, ou avec d'autres équipes étudiant les voies de minéralisation pourraient aussi être envisagées.

Ainsi, le modèle de transport vésiculaire utérin du carbonate de calcium amorphe mis en évidence au cours de cette thèse fournit de nouvelles connaissances potentiellement nécessaires à la compréhension d'autres processus de minéralisation. En outre, ces nouvelles connaissances pourraient également intéresser l'industrie des matériaux bio-inspirés (Jin *et al.* 2018).

2.7. Retombées en terme d'applications potentielles

Les résultats de cette thèse ouvrent également des perspectives d'applications potentielles pour la filière œuf (**Figure 56**). Actuellement, la production d'œufs de table est très influencée par le contexte de l'allongement de la période de ponte à 90, voire 100 semaines. L'enjeu est de maintenir une qualité de coquille optimale après 80 semaines, de manière à éviter les pertes économiques qu'engendrerait l'augmentation de la période de ponte. Dans ce contexte, le programme BSQ (Bone strength quality), mentionné précédemment, a pour but de décrypter les causes de la diminution de la qualité des os et des coquilles liée à l'âge. Cette diminution est en partie associée à la réduction de l'épaisseur de la coquille et la modification de la texture cristallographique (Richards et Swanson 1965, Rodriguez-Navarro *et al.* 2002, Nys *et al.* 2010). Toutefois, les facteurs responsables de cette diminution de la qualité de coquille restent peu connus. Ainsi, l'étude des paramètres influençant la qualité de coquille en fonction de l'âge est d'une importance majeure. Précédemment, nous avons vu que le calcium nécessaire à la formation de la coquille était d'origine alimentaire. Celui-ci est absorbé par l'intestin et transite dans le sang avant d'être délivré sur le site de minéralisation de la coquille. De manière complémentaire, une partie du calcium provient de l'os médullaire de la poule pondeuse. L'étude BSQ est basée sur une approche intégrée visant à mettre en relation la qualité osseuse et la qualité de coquille qui semblent étroitement liées. Pour cela, les os (imagerie osseuse, histologie), les coquilles mais aussi le foie et le sang (métabolome, marqueur d'accrétion) provenant de poules d'âges différents sont analysés. Les paramètres analysés sur les coquilles correspondent à des paramètres de composition (coquille et cuticule), de structure (ultrastructure et microstructure) et d'abondance protéique (analyse protéomique). Durant une mobilité de 3 mois et demi au sein du Département de Mineralogie et Pétrologie de l'Université de Grenade, j'ai analysé des paramètres de composition et de structure de coquilles issues de poules âgées de 36, 65 et 85 semaines. Ainsi, différents paramètres de composition, d'ultrastructure et de microstructure ont été mesurés à l'aide de méthodes physico-chimiques (microscopie électronique à balayage, diffraction aux rayons-X, thermogravimétrie, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier) (**Annexes 1** et **2**). Les résultats obtenus feront l'objet d'une publication qui est en cours de rédaction (**Annexe 2**). De plus, une quantification d'expression de gènes clefs du processus de minéralisation viendra compléter les analyses effectuées. Les différents paramètres analysés seront ensuite confrontés avec des données de génotypage, afin de détecter d'éventuelles corrélations qui pourraient permettre d'identifier des marqueurs précoces de qualité de coquille.

A terme, un des objectifs de l'équipe DOVE pourrait être de réaliser une étude intégrée complète dans laquelle les coquilles (capacités mécaniques, composition, ultrastructure, microstructure), les os (capacités mécaniques, macrostructure, microstructure), le sang (transfert minéral, dosage du calcium plasmique) mais aussi l'absorption intestinale (transfert minéral, dosage du calcium dans la muqueuse intestinale) seront analysés. Cette approche intégrée complète permettrait de mettre en relation les différents paramètres afin de déterminer les facteurs responsables de la diminution de la qualité de coquille avec l'âge. Cela pourrait permettre d'optimiser la qualité de coquille afin d'atteindre l'objectif d'une période de ponte de 100 semaines.

La nutrition constitue un levier important de management de la qualité des œufs issus de poules pondeuses. Le calcium a un rôle central dans l'alimentation des poules pondeuses, et notamment dans ce contexte d'allongement de la période de production. Le processus de formation de la coquille d'œuf nécessite un apport considérable de carbonate de calcium. En effet, la poule exporte chaque jour 10 % de son calcium corporel total (2g) (Nys et Guyot 2011). La source de calcium est toujours d'origine alimentaire. Toutefois, une part importante des ions qui composent la coquille (30-40 %) provient de l'os médullaire formé à partir du calcium alimentaire (Nys et Guyot 2011). Ainsi, les apports en calcium chez la poule sont cruciaux. Le besoin quotidien de calcium est de 0,9-1,2 % en période de croissance, 2-2,5 % lors de la formation de l'os médullaire (2 semaines avant la première ponte) et 3,5-4 % durant la période de ponte (Bouvarel *et al.* 2011). Une étude a souligné que la qualité de coquille est maximale lorsque 4 à 4,5 g de calcium sont ingérés chaque jour (Scott *et al.* 1999). Les apports calciques sont fournis à la poule par complément de carbonate de calcium dans l'aliment. Cependant, le calcium est nécessaire à la poule durant la formation de la coquille qui a lieu pendant la période nocturne (Bar 2009). L'objectif est donc de maintenir une quantité suffisante de calcium soluble dans l'intestin durant la période nocturne. Plusieurs études ont démontré que le carbonate de calcium particulaire constitue le complément calcique le plus adapté (Guinotte *et al.* 1991, Guinotte et Nys 1993, Guinotte *et al.* 1995, Bouvarel *et al.* 2011). En effet, la forme particulaire a été montrée comme étant celle qui affiche la plus forte amélioration des performances de qualité de coquille (Guinotte et Nys 1993). De plus, cette forme particulaire induit une augmentation de la minéralisation osseuse et améliore la qualité osseuse des vieilles poules (Whitehead et Fleming 2000, Saunders-Blades *et al.* 2009). Cependant, au cours de cette thèse, nous avons vu que la forme amorphe de carbonate de calcium (ACC) correspond à une forme plus réactive et plus soluble que la forme cristalline (Brecevic et Nielsen 1989, Addadi *et al.*

2003). De nombreux organismes utilisent cette phase amorphe pour former leur minéral et notamment la poule (Aizenberg *et al.* 1996, Beniash *et al.* 1997, Weiner et Addadi 1997, Addadi *et al.* 2003, Rodriguez-Navarro *et al.* 2015). Par conséquent, les propriétés de l'ACC suggèrent qu'un apport en carbonate de calcium sous forme amorphe pourrait potentiellement avoir des effets bénéfiques sur la qualité de coquille. Des recherches *in vitro* et *in vivo* ont permis de montrer que le carbonate de calcium sous forme amorphe affiche une solubilité et une biodisponibilité très supérieure à celle du carbonate de calcium cristallin classiquement utilisé. En effet, une étude a démontré que l'ACC est plus soluble que le carbonate de calcium cristallin et que son absorption, mesurée par analyse du calcium plasmique, est 40 % supérieure à celle de la forme cristalline chez le rat (Meiron *et al.* 2011). De plus, la rétention de l'ACC et l'absorption du calcium dans le fémur sont respectivement, 26,5 % et 30 % supérieures à celles du carbonate de calcium cristallin (Meiron *et al.* 2011). Une seconde étude a souligné les effets bénéfiques de l'ACC sur la perte osseuse dans des modèles de rats ayant subi une ovariectomie (Shaltiel *et al.* 2013). Les analyses de micro-tomographie (micro-CT) et d'histomorphométrie démontrent une prévention de la perte osseuse qui se manifeste par une augmentation des paramètres morphométriques osseux. Ces observations sont valables pour une forme d'ACC synthétique et une forme d'ACC stabilisée provenant des gastrolithes d'écrevisse (Shaltiel *et al.* 2013). Des essais cliniques ont également été réalisés sur des femmes en post-ménopause (Vaisman *et al.* 2014). Les résultats indiquent que l'absorption du calcium provenant d'ACC est doublée par comparaison à celle obtenue pour le carbonate de calcium cristallin (Vaisman *et al.* 2014). Cette absorption supérieure de l'ACC lui suggère un rôle potentiel de complément calcique plus efficace que la forme cristalline. L'absorption d'un mélange de sels sous formes amorphes (carbonate de calcium, citrate de calcium, hydro-citrate de calcium et citrate de magnésium) a également été testée chez le poulet (Babarykin *et al.* 2019). Ce mélange de sels sous formes amorphes expose une biodisponibilité qui est respectivement, 66 % et 51 % supérieure à celle des sels de chlorure de calcium et de carbonate de calcium communément utilisés. Cette biodisponibilité, dont l'effet est augmenté en présence de vitamine D, a été mesurée *via* une analyse de l'absorption de la muqueuse duodénale (Babarykin *et al.* 2019). Ainsi, l'apport d'ACC chez la poule pondeuse pourraient avoir des effets positifs sur la prévention de la perte osseuse et la qualité de la coquille (**Figure 58**). La stabilisation de l'ACC par des vésicules de types liposomes a été démontrée *in vitro* (Tester *et al.* 2011, Ihli *et al.* 2014). Par conséquent, l'élaboration de complément calcique sous forme amorphe pourrait consister en la synthèse de liposomes (extrusion) encapsulant de l'ACC synthétique ou naturel (Cystolithes de plante *Ficus microcarpa* (Gal *et al.* 2012) ou carapaces d'invertébrés *Homarus*

americanus (Levi-Kalisman *et al.* 2002), et *Paranephrops planifrons (*Shaltiel *et al.* 2013*)*). Les liposomes sont des vésicules synthétisées qui peuvent être préparées à partir de divers lipides d'origine naturelle ou synthétique. Les lipides utilisés pourraient éventuellement être des phospholipides de jaune d'œuf. Les liposomes permettraient alors de protéger l'ACC jusqu'au site d'absorption du minéral (intestin) et d'augmenter la rétention pour maintenir une source de calcium nocturne (**Figure 58**). De plus, la taille des liposomes devra être choisie afin d'optimiser la stabilisation de l'ACC. En effet, une étude a montré que les particules d'ACC dont la taille est inférieure à 100 nm sont plus stables (Nudelman *et al.* 2010). Toutefois, les vésicules de type liposome permettent seulement une stabilisation de l'ACC durant plusieurs heures (20 h) (Tester *et al.* 2011). Cela ne serait pas suffisant pour la conservation d'un éventuel complément calcique. Par conséquent, une stabilisation de l'ACC par lyophilisation pourrait être appliquée. En effet, une étude a montré que l'ACC lyophilisé reste stable plus de 6 semaines (Ihli *et al.* 2013). Cependant, les liposomes sont sensibles à la lyophilisation (congélation-déshydratation). Pour éviter une éventuelle détérioration des liposomes au cours de la lyophilisation, il faudrait ajouter un protecteur comme par exemple un sucre disaccharide (glucose, lactose, maltose ou tréhalose) qui permet de conserver la structure des liposomes (Franze *et al.* 2018). Les liposomes produits seraient contrôlés par microscopie électronique couplée à des analyses élémentaires (spectroscopie des pertes d'énergie ; EELS et spectroscopie de rayons-X à dispersion d'énergie ; EDS), afin de vérifier la stabilité de la forme amorphe du carbonate de calcium. Ainsi, les liposomes lyophilisés, confinant de l'ACC, pourraient fournir un complément calcique à la poule pondeuse. Ce complément calcique pourrait être ajouté à l'aliment de la même manière que ceux utilisés classiquement.

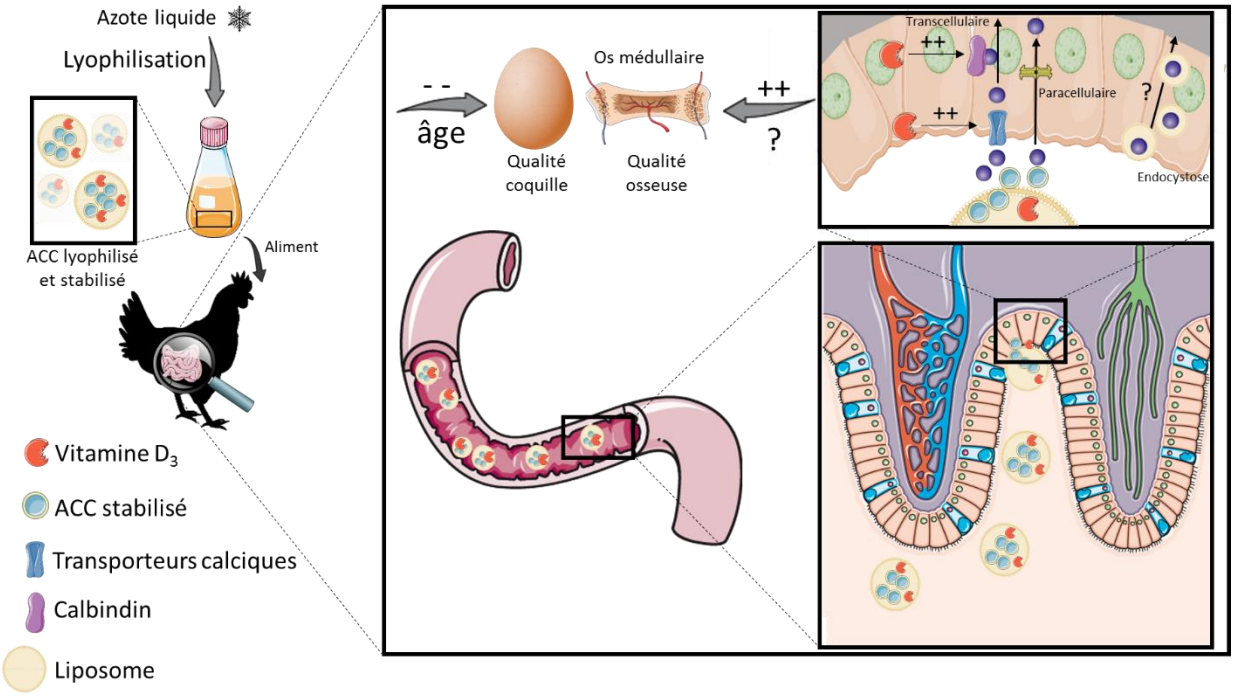


Figure 58. Schéma illustrant le mécanisme d'un potentiel complément calcique sous forme de carbonate de calcium amorphe encapsulé et lyophilisé. La forme amorphe de carbonate de calcium (ACC) correspond à une forme plus réactive et plus soluble que la forme cristalline. L'ACC affiche une solubilité et une biodisponibilité très supérieure à celle du carbonate de calcium cristallin. En effet, l'absorption du calcium provenant d'ACC est supérieure à celle du carbonate de calcium cristallin. Les liposomes permettraient alors de protéger l'ACC jusqu'au site d'absorption du minéral (intestin) et d'augmenter la rétention pour maintenir une source de calcium nocturne. Les voies transcellulaires, paracelullaires et la potentielle voie vésiculaire permettraient l'absorption du calcium au niveau de la bordure en brosse de l'intestin.

Dans la discussion, nous avons vu que l'absorption du calcium au niveau du duodénum est potentiellement assurée par trois voies alternatives (transcellulaire, paracellulaire et vésiculaire), même si la voie vésiculaire reste à démontrer dans cet organe (**Figure 58**). Chez la poule pondeuse, la vitamine D stimule l'absorption du calcium au niveau de l'intestin (Bar 2008, Bouvarel *et al.* 2011, Nys et Le Roy 2018). Par conséquent, l'ajout de vitamine D dans les liposomes serait bénéfique à une augmentation de la capacité d'absorption du calcium libéré par l'ACC (**Figure 58**). Afin de tester ce modèle, un essai pourrait être réalisé. Dans cet essai, trois lots de poules seraient utilisés. Un lot de poule « contrôle » sans apport calcique, un lot de poule qui recevrait un apport en $CaCO_3$ classique et un lot de poule « test » qui recevrait le complément sous forme de liposomes, administré dans l'aliment chaque jour (en substitution du $CaCO_3$ classique). Les coquilles seraient évaluées sur une période donnée afin de comparer la qualité entre les différents groupes. Dans le contexte d'allongement de période de ponte, ces analyses pourraient également être réalisées à différents âges pour évaluer les effets éventuels sur des poules plus âgées. L'impact sur la calcification osseuse pourrait aussi être exploré, en

particulier sur les os longs et médullaires qui sont impliqués dans la minéralisation de la coquille. Les os seraient prélevés et leurs qualités contrôlées et comparées entre les groupes, par analyse de micro-tomographie (micro-CT) et d'histomorphométrie. En parallèle, le calcium plasmique, ainsi que le taux d'absorption du calcium au niveau du duodénum pourraient être dosés. De plus, une analyse d'expression des gènes clefs des trois voies d'absorption potentielles de l'intestin pourrait être mise en place. Ce complément pourrait également être testé deux semaines avant la ponte, période qui correspond à la formation de l'os médullaire chez la poule pondeuse.

Une autre retombée importante de nos recherches concerne l'amélioration génétique des souches de poules pondeuses. Afin d'affiner la recherche de marqueurs génétiques, la détermination des gènes codant pour des protéines clefs du processus de minéralisation est d'un intérêt majeur. Ainsi, la compréhension d'un mécanisme comme celui du transport vésiculaire de l'utérus associé à la minéralisation et la connaissance de ses acteurs moléculaires clefs est bénéfique. Les gènes encodant les protéines clefs du transport vésiculaire impliqué dans la minéralisation de la coquille d'œuf de poule sont de potentiels outils de sélection génomique. La connaissance des régions régulatrices de l'expression des protéines clefs et de leurs régions codantes permettra de cibler précisément les recherches de marqueurs de sélection associés à la qualité de coquille des œufs. Les gènes codant pour les protéines EDIL3, MFGE8, ANXs, CA4, PDCD6IP et Syntenin-1 pourront alors être explorés, afin de découvrir d'éventuels marqueurs associés à la qualité de coquille. De manière encore plus précise, les régions codantes des domaines fonctionnelles des protéines EDIL3 et MFGE8 pourront être ciblées. En parallèle, les acteurs clefs du transport vésiculaire pourraient correspondre à de potentiels marqueurs de qualité pour la filière œuf. Les informations relatives aux polymorphismes associés à ces gènes codant des protéines impliquées dans la minéralisation, permettront de sélectionner parmi la population de poules pondeuses, les animaux portant les allèles favorables. Ces approches de génomique, utilisant des gènes candidats, permettent un gain de précision considérable pour les programmes utilisant la sélection génomique. Plusieurs équipes et sélectionneurs montrent de l'intérêt pour nos travaux et des partenariats sont d'ores et déjà conduits et font l'objet de contrats de recherches avec mon équipe d'accueil.

VI. *Conclusion*

« En toute chose, c'est la fin qui est essentiel »

Aristote

L'objectif de mon doctorat a été de déterminer le rôle de deux protéines clefs du processus de minéralisation de la coquille. Au cours de cette thèse, j'ai exploré l'implication de deux protéines majeures de la matrice organique, EDIL3 et MFGE8, dans le processus de minéralisation. Les résultats obtenus ont permis de proposer un rôle aux protéines EDIL3 et MFGE8, dans un nouveau modèle de transport vésiculaire du minéral impliqué dans la biominéralisation de la coquille. C'est la première fois qu'un tel transport est décrit dans un processus de biominéralisation carbonatée chez les vertébrés. Ces recherches complètent les connaissances antérieures sur le transport des précurseurs minéraux à travers la voie transcellulaire des cellules utérines. Ce travail a permis de compléter les connaissances établies sur le transport des précurseurs minéraux de la coquille d'œuf durant la minéralisation. Il décrit, pour la première fois, un transport vésiculaire, et propose un modèle global et cohérent des apports de calcium.

Les résultats de ce travail auront un intérêt pour la filière œuf qui a pour objectif de maintenir la qualité sanitaire des œufs de consommation. Les gènes encodant les protéines clefs du processus de minéralisation sont de potentiels outils pour la sélection génomique, qui vise l'optimisation de la résistance des coquilles, tout en maintenant les capacités de production. En effet, les résultats issus de cette thèse permettront d'affiner la recherche de marqueurs génétiques de la solidité de coquille. En outre, ces recherches pourront être utiles dans la compréhension d'autres systèmes de biominéralisation dans lesquels des transports vésiculaires de minéral sont envisageables (os, absorption intestinale, autres organismes minéralisants). Enfin, les industries impliquées dans l'élaboration de biomatériaux pourraient être intéressées par les résultats de nos recherches qui contribuent à la compréhension des principes généraux de la biominéralisation.

Au cours de cette thèse, les techniques et approches que j'ai pu développer ont été diverses et nombreuses. Dans un premier temps, j'ai conduit des analyses de biologie moléculaire, de biochimie ainsi que des analyses de séquences, de phylogénie et de prédictions structurales des protéines. Par la suite, j'ai eu recours à diverses techniques expérimentales (expression de gènes, protéomique, analyse biochimique, microscopie électronique, analyse élémentaire) à travers plusieurs collaborations (plateforme de microscopie électronique de l'Université de Tours, plateforme de spectrométrie de masse PAIB2, centre d'instrumentation Scientifique de l'Université de Grenade, GeT-Genotoul), afin de valider le modèle du transport vésiculaire du minéral impliqué dans la minéralisation de la coquille. Cette expérience m'a permis d'approfondir mes connaissances dans les domaines de la biologie générale et de

l'agronomie, que j'avais pu acquérir durant mon parcours à AgroParisTech. Ce travail m'a aussi permis d'apprendre à mener un projet de recherche en s'adaptant aux imprévus de la biologie et du quotidien.

J'ai également pu découvrir la recherche sous un autre angle, lors d'un séjour en Espagne dans le Département de Minéralogie et Pétrologie de l'Université de Grenade. En effet, cette thèse s'inscrivait dans le cadre du parcours « École internationale de recherche d'Agreenium » (EIR-A), qui permet aux doctorants de suivre les enjeux actuels majeurs de l'agronomie *via* des séminaires scientifiques annuels et de découvrir le fonctionnement d'un laboratoire à l'étranger *via* une mobilité. Dans ce cadre, j'ai effectué un séjour de 3 mois et demi au sein du Département de Minéralogie et Pétrologie de l'Université de Grenade, en collaboration avec le Pr. Alejandro Rodriguez-Navarro. Au cours de ce séjour, nous avons exploré les paramètres de variation de la qualité de coquille (composition, ultrastructure, microstructure). Différents paramètres de composition ou de structure influençant la qualité de coquille ont pu être mis en évidence. L'importance de la matrice organique dans le processus de minéralisation a ainsi pu être confirmée. Cette partie expérimentale est rapportée en tant qu'annexe dans ce manuscrit de thèse (**Annexes 1** et **2**). Cette mobilité m'a ainsi permis de m'initier aux analyses physico-chimiques utilisées pour étudier la structure de la coquille.

D'un point de vue personnel, ce doctorat est une expérience remarquable sur de nombreux points. La variété des approches utilisées durant ces trois années, à travers diverses collaborations, a fait de ce doctorat une expérience grandement enrichissante. Ce travail de doctorat m'a également offert l'opportunité de travailler et d'échanger avec de nombreuses personnes qui m'ont transmis leurs expertises. Enfin, cette thèse m'a fait découvrir l'univers mystérieux de l'œuf de poule, que nul ne peut imaginer avant d'avoir franchi la porte du couloir de l'équipe DOVE.

VII. *Articles et communications scientifiques*

« Aucun de nous ne sait ce que nous savons tous, ensemble »

Lao-Tseu

1. Articles scientifiques dans des revues à comité de lecture

Lilian Stapane, Nathalie Le Roy, Maxwell T Hincke, Joël Gautron (2019), *The glycoproteins EDIL3 and MFGE8 regulate vesicle - mediated eggshell calcification in a new model for avian biomineralisation* (Journal of Biological Chemistry, 2019; 294(40):14526-14545)

Lilian Stapane, Nathalie Le Roy, Jacky Ezagal, Alejandro Rodriguez-Navarro, Valérie Labas, Lucie Combes-Soia, Maxwell T Hincke, Joël Gautron (2019), *A new model for avian shell biomineralization: vesicular transport ensures delivery of amorphous calcium carbonate* (soumis dans *eLife* en octobre 2019)

Alejandro Rodriguez-Navarro, **Lilian Stapane**, Christian Grenier, Rocio Roman, Joël Gautron (2020), *Structural parameters impacting mechanical properties of eggshells from selected hens* (en cours de rédaction, **Annexe 1**)

2. Communications à des congrès scientifiques

La personne ayant réalisé la communication est indiquée en gras.

Congrès internationaux

Stapane. L, Le Roy. N, Ezagal. J, Poirier. JC, Gautron. J, *EDIL3 and MFGE8 key proteins involved in the biomineralization of the hen eggshell,* XVth European Poultry Conference, Dubrovnik (Croatia), 17-21/09/2018 (Communication orale sur les travaux du **chapitre 1**)

Stapane. L, Le Roy. N, Ezagal. J, **Gautron. J**, *Identification of extracellular vesicles involved in the biomineralization of the hen eggshell,* XVIII European symposium on the quality of eggs and egg products and XXIV European symposium on the quality of poultry meat, Cezme (Turkey), 23-26/06/2019 (Communication orale sur les travaux du **chapitre 2**)

Stapane. L, Le Roy. N, Ezagal. J, **Gautron. J**, *Identification of extracellular vesicles involved in the biomineralization of the hen eggshell,* XV International Symposium on biomineralization, Munich (Germany), 9-13/09/2019 (Communication orale sur les travaux du **chapitre 2**)

Congrès nationaux

Stapane. L, Rôle de protéines cibles dans le processus de biominéralisation de la coquille d'œuf de poule, concours « Ma thèse en 180 secondes », finale départementale, Tours (France), 16/03/2017 (Communication orale)

Stapane. L, Le Roy. N, Ezagal. J, Poirier. JC, Gautron. J, *Protéines clefs dans le processus de biominéralisation de la coquille d'œuf de poule* : *MFGE8 et EDIL3*, 30ème colloque Biotechnocentre, Seillac (France), 12-13/10/2017 (Communication affichée sur les travaux du **chapitre 1**)

Stapane. L, Le Roy. N, Ezagal. J, Poirier. JC, Gautron. J, *EDIL3 and MFGE8 key proteins involved in the biomineralization of the hen eggshell,* 20èmes Journées Françaises de la Biologie des Tissus minéralisés, Monaco (France), 21-23/03/2018 (Communication orale sur les travaux du **chapitre 1**)

Stapane. L, Le Roy. N, Ezagal. J, Gautron. J, *Identification de vésicules extracellulaires impliquées dans la minéralisation de la coquille d'œuf de poule,* 13èmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Tours (France), 20-21/03/2019 (Communication orale sur les travaux du **chapitre 2**) (**Annexe 3**)

Stapane. L, Le Roy. N, Rodriguez-Navarro. A.B, Ezagal. J, Gautron. J, *Identification of extracellular vesicles involved in chicken eggshell biomineralization,* 21èmes Journées Françaises de la Biologie des Tissus minéralisés, Boulogne-sur-Mer (France), 05-07/06/2019 (Communication orale sur les travaux du **chapitre 2**)

Bourses et subventions obtenues

Subvention de l'Université François Rabelais de Tours pour une mobilité de 3 mois et demi au sein du laboratoire du Pr. Alejandro B. Rodriguez-Navarro (Universidad de Granada-Departamento de Mineralogia y Petrologia) dans le cadre du programme Ecole internationale de la recherche Agreenium (EIR-A, 6ème promotion).

Subvention de l'INRA DARESE pour une mobilité de 3 mois et demi au sein du laboratoire du Pr. Alejandro B. Rodriguez-Navarro (Universidad de Granada-Departamento de Mineralogia y

Petrologia) dans le cadre du programme Ecole internationale de la recherche Agreenium (EIR-A, 6ème promotion).

Subvention de DSM pour une mobilité de 3 mois et demi au sein du laboratoire du Pr. Alejandro B. Rodriguez-Navarro (Universidad de Granada-Departamento de Mineralogia y Petrologia) dans le cadre du programme Ecole internationale de la recherche Agreenium (EIR-A, 6ème promotion).

Bourse « programme jeunes » de la branche Européenne de la World Poultry Science Association (WPSA) pour assister à la XVth European Poultry Conference, Dubrovnik (Croatie).

VIII. *Références bibliographiques*

Abatangelo, G., D. Dagagordini, I. Castellani and R. Cortivo (1978). *Some Observations on the Calcium-Ion Binding to the Eggshell Matrix.* Calcif Tissue Res 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.* Chem-Eur J 12(4): 981-987.

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

Addadi, L. and S. Weiner (1985). *Interactions between Acidic Proteins and Crystals - Stereochemical Requirements in Biomineralization.* P Natl Acad Sci USA 82(12): 4110-4114.

Addadi, L. and S. Weiner (1992). *Control and Design Principles in Biological Mineralization.* Angew Chem Int Edit 31(2): 153-169.

Addadi, L. and S. Weiner (2014). *Biomineralization: mineral formation by organisms.* Phys Scripta 89(9).

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.* Brit Poultry Sci 46(3): 268-279.

Ahmed, T. A., H. P. Suso and M. T. Hincke (2017). *In-depth comparative analysis of the chicken eggshell membrane proteome.* J Proteomics 155: 49-62.

Ait-Oufella, H., K. Kinugawa, J. Zoll, T. Simon, J. Boddaert, S. Heeneman, O. Blanc-Brude, V. Barateau, S. Potteaux, R. Merval, B. Esposito, E. Teissier, M. J. Daemen, G. Leseche, C. Boulanger, A. Tedgui and Z. Mallat (2007). *Lactadherin deficiency leads to apoptotic cell accumulation and accelerated atherosclerosis in mice.* Circulation 115(16): 2168-2177.

Aizenberg, J., G. Lambert, L. Addadi and S. Weiner (1996). *Stabilization of amorphous calcium carbonate by specialized macromolecules in biological and synthetic precipitates.* Adv Mater 8(3): 222-226.

Aizenberg, J., G. Lambert, S. Weiner and L. Addadi (2002). *Factors involved in the formation of amorphous and crystalline calcium carbonate: A study of an ascidian skeleton.* J Am Chem Soc 124(1): 32-39.

Al-Hashimi, N., A. G. Lafont, S. Delgado, K. Kawasaki and J. Y. Sire (2010). *The enamelin genes in lizard, crocodile, and frog and the pseudogene in the chicken provide new insights on enamelin evolution in tetrapods.* Mol Biol Evol 27(9): 2078-2094.

Alberic, M., L. Bertinetti, Z. Y. Zou, P. Fratzl, W. Habraken and Y. Politi (2018). *The Crystallization of Amorphous Calcium Carbonate is Kinetically Governed by Ion Impurities and Water.* Adv Sci 5(5).

Albéric, M., C. A. Stifler, Z. Zou, C. Y. Sun, C. E. Killian, S. Valencia, M. A. Mawass, L. Bertinetti, P. U. P. A. Gilbert and Y. Politi (2019). *Growth and regrowth of adult sea urchin spines involve hydrated and anhydrous amorphous calcium carbonate precursors.* J Struct Biol.

Albus, E., K. Sinningen, M. Winzer, S. Thiele, U. Baschant, A. Hannemann, J. Fantana, A. K. Tausche, H. Wallaschofski, M. Nauck, H. Volzke, S. Grossklaus, T. Chavakis, M. C. Udey, L. C. Hofbauer and M. Rauner (2016). *Milk Fat Globule-Epidermal Growth Factor 8 (MFG-E8) Is a Novel Anti-inflammatory Factor in Rheumatoid Arthritis in Mice and Humans.* J bone miner res 31(3): 596-605.

Alelign, T. and B. Petros (2018). *Kidney Stone Disease: An Update on Current Concepts.* Adv Urol.

Alvares, K. (2014). *The role of acidic phosphoproteins in biomineralization.* Connect Tissue Res 55(1): 34-40.

Andersen, M. H., L. Berglund, J. T. Rasmussen and T. E. Petersen (1997). *Bovine PAS-6/7 binds alpha(V)beta(5) integrin and anionic phospholipids through two domains.* Biochemistry-Us 36(18): 5441-5446.

Andersen, M. H., H. Graversen, S. N. Fedosov, T. E. Petersen and J. T. Rasmussen (2000). *Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin.* Biochemistry-Us 39(20): 6200-6206.

Anderson, H. C. (1967). *Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification.* J Cell Biol 35(1): 81-101.

Anderson, H. C. (1969). *Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage.* J Cell Biol 41(1): 59-72.

Anderson, H. C. (2003). *Matrix vesicles and calcification.* Curr Rheumatol Rep 5(3): 222-226.

Anderson, H. C., R. Garimella and S. E. Tague (2005). *The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization.* Front Biosci 10: 822-837.

Ankra-Badu, G. A. and S. E. Aggrey (2005). *Identification of candidate genes at quantitative trait loci on chicken Chromosome Z using orthologous comparison of chicken, mouse, and human genomes.* In Silico Biol 5(5-6): 593-604.

Anton, M., F. Nau, V. Lechevalier, C. Guerin-Dubiard and T. Croguennec (2010). *Egg products: functional ingredients for complex matrices.* Prod Anim 23(2): 215-224.

Aoka, Y., F. L. Johnson, K. Penta, K. Hirata, C. Hidai, R. Schatzman, J. A. Varner and T. Quertermous (2002). *The embryonic angiogenic factor Del1 accelerates tumor growth by enhancing vascular formation.* Microvasc Res 64(1): 148-161.

Ar, A., H. Rahn and V. C. Paganelli (1979). *The avian egg: mass and strength.* The Condor 81(4): 331-337.

Arad, Z., U. Eylath, M. Ginsburg and H. Eyal-Giladi (1989). *Changes in uterine fluid composition and acid-base status during shell formation in the chicken.* Am J Physiol 257(4 Pt 2): R732-737.

Arakawa, A., M. Matsuo-Takasaki, A. Takai, H. Inomata, M. Matsumura, M. Ikeya, K. Takahashi, Y. Miyachi, N. Sasai and Y. Sasai (2007). *The secreted EGF-Discoidin factor xDel1 is essential for dorsal development of the Xenopus embryo.* Dev Biol 306(1): 160-169.

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

Arias, J. L. and M. S. Fernandez (2008). *Polysaccharides and proteoglycans in calcium carbonate-based biomineralization.* Chem Rev 108(11): 4475-4482.

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.* Int Rev of Cytol 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.* Connect Tissue Res 36(1): 21-33.

Atabai, K., R. Fernandez, X. Z. Huang, I. Ueki, A. Kline, Y. Li, S. Sadatmansoori, C. Smith-Steinhart, W. M. Zhu, R. Pytela, Z. Werb and D. Sheppard (2005). *Mfge8 is critical for mammary gland remodeling during involution.* Mol Biol Cell 16(12): 5528-5537.

Atabai, K., S. Jame, N. Azhar, A. Kuo, M. Lam, W. McKleroy, G. DeHart, S. Rahman, D. D. Xia, A. C. Melton, P. Wolters, C. L. Emson, S. M. Turner, Z. Werb and D. Sheppard (2009). *Mfge8 diminishes the severity of tissue fibrosis in mice by binding and targeting collagen for uptake by macrophages.* J Clin Invest 119(12): 3713-3722.

Athanasiadou, D., W. Jiang, D. Goldbaum, A. Saleem, K. Basu, M. S. Pacella, C. F. Bohm, R. R. Chromik, M. T. Hincke, A. B. Rodriguez-Navarro, H. Vali, S. E. Wolf, J. J. Gray, K.

H. Bui and M. D. McKee (2018). *Nanostructure, osteopontin, and mechanical properties of calcitic avian eggshell.* Sci Adv 4(3).

Auzoux-Bordenave, S., N. Ameziane, A. Badou, S. Berland, J.-M. Caraguel, I. Domart-Coulon, P. J. Lopez, G. Luquet, S. Martin, M. De Rafélis, L. Sefalen and J.-Y. Sire (2013). *Les biominéralisations, témoins de l'évolution du vivant.* Le Courrier de la Nature 275: 29-37.

Aziz, M., A. Jacob, A. Matsuda and P. Wang (2011). *Review: milk fat globule-EGF factor 8 expression, function and plausible signal transduction in resolving inflammation.* Apoptosis 16(11): 1077-1086.

Aziz, M. M., S. Ishihara, Y. Mishima, N. Oshima, I. Moriyama, T. Yuki, Y. Kadowaki, M. A. Rumi, Y. Amano and Y. Kinoshita (2009). *MFG-E8 attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis by modulating osteopontin-dependent alphavbeta3 integrin signaling.* J Immunol 182(11): 7222-7232.

Azoidis, I., S. C. Cox and O. G. Davies (2018). *The role of extracellular vesicles in biomineralisation: current perspective and application in regenerative medicine.* J Tissue Eng 9.

Babarykin, D., M. Mutalova, G. Smirnova, S. Vasiljeva, G. Krumina, N. Basova, V. Agejchenko and R. Simanis (2019). *Amorphous Calcium Salt Composition Bioavailability Evaluation in Chickens.* J Biosci Med 7: 15-25.

Bahn, S. Y., B. H. Jo, Y. S. Choi and H. J. Cha (2017). *Control of nacre biomineralization by Pif80 in pearl oyster.* Sci Adv 3(8).

Balcerzak, M., E. Hamade, L. Zhang, S. Pikula, G. Azzar, J. Radisson, J. Bandorowicz-Pikula and R. Buchet (2003). *The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process.* Acta Biochim Pol 50(4): 1019-1038.

Balcerzak, M., A. Malinowska, C. Thouverey, A. Sekrecka, M. Dadlez, R. Buchet and S. Pikula (2008). *Proteome analysis of matrix vesicles isolated from femurs of chicken embryo.* Proteomics 8(1): 192-205.

Bar, A. (2008). *Calcium homeostasis and vitamin D metabolism and expression in strongly calcifying laying birds.* Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 151(4): 477-490.

Bar, A. (2009). *Calcium transport in strongly calcifying laying birds: mechanisms and regulation.* Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 152(4): 447-469.

Barabesi, C., A. Galizzi, G. Mastromei, M. Rossi, E. Tamburini and B. Perito (2007). *Bacillus subtilis gene cluster involved in calcium carbonate biomineralization.* J Bacteriol 189(1): 228-235.

Barreiro, K. and H. Holthofer (2017). *Urinary extracellular vesicles. A promising shortcut to novel biomarker discoveries.* Cell Tissue Res 369(1): 217-227.

Bartlett, J. D. (2013). *Dental Enamel Development: Proteinases and Their Enamel Matrix Substrates.* ISRN Dent.

Basso, M. and V. Bonetto (2016). *Extracellular Vesicles and a Novel Form of Communication in the Brain.* Front Neurosci-Switz 10.

Beckham, C. J., J. Olsen, P. N. Yin, C. H. Wu, H. J. Ting, F. K. Hagen, E. Scosyrev, E. M. Messing and Y. F. Lee (2014). *Bladder cancer exosomes contain EDIL-3/Del1 and facilitate cancer progression.* J Urol 192(2): 583-592.

Bedouet, L., A. Marie, L. Dubost, J. Peduzzi, D. Duplat, S. Berland, M. Puissegur, H. Boulzaguet, M. Rousseau, C. Milet and E. Lopez (2007). *Proteomics analysis of the nacre soluble and insoluble proteins from the oyster Pinctada margaritifera.* Mar Biotechnol (NY) 9(5): 638-649.

Bellairs, R., M. Harkness and R. D. Harkness (1963). *The vitelline membrane of the hen's egg: a chemical and electron microscopical study.* J. Ultrastruct. Res. 8(3-4): 339-359.

Beniash, E., L. Addadi and S. Weiner (1999). *Cellular control over spicule formation in sea urchin embryos: A structural approach.* J Struct Biol 125(1): 50-62.

Beniash, E., J. Aizenberg, L. Addadi and S. Weiner (1997). *Amorphous calcium carbonate transforms into calcite during sea urchin larval spicule growth.* P Roy Soc B-Biol Sci 264(1380): 461-465.

Benzerara, K., J. Miot, G. Morin, G. Ona-Nguema, F. Skouri-Panet and C. Ferard (2011). *Significance, mechanisms and environmental implications of microbial biomineralization.* Cr Geosci 343(2-3): 160-167.

Bernstein, R. S., T. Nevalainen, R. Schraer and H. Schraer (1968). *Intracellular distribution and role of carbonic anhydrase in the avian (Gallus domesticus) shell gland mucosa.* Biochim Biophys Acta 159(2): 367-376.

Blin, G., E. Margeat, K. Carvalho, C. A. Royer, C. Roy and C. Picart (2008). *Quantitative analysis of the binding of ezrin to large unilamellar vesicles containing phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate.* Biophys J 94(3): 1021-1033.

Blondeau, M., M. Sachse, C. Boulogne, C. Gillet, J. M. Guigner, F. Skouri-Panet, M. Poinsot, C. Ferard, J. Miot and K. Benzerara (2018). *Amorphous Calcium Carbonate Granules Form Within an Intracellular Compartment in Calcifying Cyanobacteria.* Front Microbiol 9.

Bocca, S. M., S. Anderson, B. Amaker, R. J. Swanson, A. Franchi, F. Lattanzio and S. Oehninger (2012). *Milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8): a novel protein in the mammalian endometrium with putative roles in implantation and placentation.* Placenta 33(10): 795-802.

Bonucci, E. (1967). *Fine structure of early cartilage calcification.* J Ultrastruct Res 20(1): 33-50.

Boonrungsiman, S., E. Gentleman, R. Carzaniga, N. D. Evans, D. W. McComb, A. E. Porter and M. M. Stevens (2012). *The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation.* Proc Natl Acad Sci U S A 109(35): 14170-14175.

Boonstra, J., P. Rijken, B. Humbel, F. Cremers, A. Verkleij and P. V. E. Henegouwen (1995). *The Epidermal Growth-Factor.* Cell Biol Int 19(5): 413-430.

Borowitzka, M. A. (1982). *Morphological and Cytological Aspects of Algal Calcification.* International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology 74: 127-162.

Boskey, A. L. and A. S. Posner (1976). *Extraction of a calcium-phospholipid-phosphate complex from bone.* Calcif Tissue Res 19(4): 273-283.

Bottini, M., S. Mebarek, K. L. Anderson, A. Strzelecka-Kiliszek, L. Bozycki, A. M. S. Simao, M. Bolean, P. Ciancaglini, J. B. Pikula, S. Pikula, D. Magne, N. Volkmann, D. Hanein, J. L. Millan and R. Buchet (2018). *Matrix vesicles from chondrocytes and osteoblasts: Their biogenesis, properties, functions and biomimetic models.* Biochim Biophys Acta 1862(3): 532-546.

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.* J Agric Food Chem 59(23): 12368-12374.

Bouvarel, I., Y. Nys and P. Lescoat (2011). Hen nutrition for sustained egg quality. *Improving the safety and quality of eggs and egg products*. Y. Nys, M. Bain and F. Van immerseel(Eds). Cambridge, Woodhead publishing. 1**:** 261-299.

Brecevic, L. and A. E. Nielsen (1989). *Solubility of Amorphous Calcium-Carbonate.* J Cryst Growth 98(3): 504-510.

Breen, P. C. and P. P. De Bruyn (1969). *The fine structure of the secretory cells of the uterus (shell gland) of the chicken.* J Morphol 128(1): 35-65.

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.

Bu, H. F., X. L. Zuo, X. Wang, M. A. Ensslin, V. Koti, W. Hsueh, A. S. Raymond, B. D. Shur and X. D. Tan (2007). *Milk fat globule-EGF factor 8/lactadherin plays a crucial role in maintenance and repair of murine intestinal epithelium.* J Clin Invest 117(12): 3673-3683.

Burgess, B. L., T. A. Abrams, S. Nagata and M. O. Hall (2006). *MFG-E8 in the retina and retinal pigment epithelium of rat and mouse.* Mol Vis 12: 1437-1447.

Calvisi, D. F., R. M. Pascale and F. Feo (2016). *Epidermal growth factor-like repeats and discoidin I-like domains 3: a multifaceted oncoprotein at the crossroad of MAPK and TGF-beta pathways in human hepatocellular carcinoma.* Transl Cancer Res 5(2): 103-109.

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.* Connect Tissue Res 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.* Connect Tissue Res 36(3): 175-193.

Chen, Y. Y., Y. M. Feng, J. G. Deveaux, M. A. Masoud, F. S. Chandra, H. W. Chen, D. Y. Zhang and L. Feng (2019). *Biomineralization Forming Process and Bio-inspired Nanomaterials for Biomedical Application: A Review.* Minerals-Basel 9(2).

Chien, Y. C., M. T. Hincke and M. D. McKee (2009). *Ultrastructure of avian eggshell during resorption following egg fertilization.* J Struct Biol 168(3): 527-538.

Choi, E. Y. (2009). *Inhibition of leukocyte adhesion by developmental endothelial locus-1 (del-1).* Immune Netw 9(5): 153-157.

Choi, E. Y., E. Chavakis, M. A. Czabanka, H. F. Langer, L. Fraemohs, M. Economopoulou, R. K. Kundu, A. Orlandi, Y. Y. Zheng, D. A. Prieto, C. M. Ballantyne, S. L. Constant, W. C. Aird, T. Papayannopoulou, C. G. Gahmberg, M. C. Udey, P. Vajkoczy, T. Quertermous, S. Dimmeler, C. Weber and T. Chavakis (2008). *Del-1, an Endogenous Leukocyte-Endothelial Adhesion Inhibitor, Limits Inflammatory Cell Recruitment.* Science 322(5904): 1101-1104.

Chowdhury, S. D. (1990). *Shell Membrane-Protein System in Relation to Lathyrogen Toxicity and Copper Deficiency.* World Poultry Sci J 46(2): 153-169.

Chung, W. H., K. M. Lai and K. C. Hsu (2010). *Comparative study on histological structures of the vitelline membrane of hen and duck egg observed by cryo-scanning electron microscopy.* J Agric Food Chem 58(3): 1794-1799.

Clode, P. L. and A. T. Marshall (2002). *Low temperature FESEM of the calcifying interface of a scleractinian coral.* Tissue Cell 34(3): 187-198.

Colombo, M., G. Raposo and C. Thery (2014). *Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles.* Annu Rev Cell Dev Bi 30: 255-289.

Combes, C. and C. Rey (2010). *Amorphous calcium phosphates: synthesis, properties and uses in biomaterials.* Acta Biomater 6(9): 3362-3378.

Cordeiro, C. M. M. and M. T. Hincke (2016). *Quantitative proteomics analysis of eggshell membrane proteins during chick embryonic development.* J Proteomics 130: 11-25.

Couto, J. R., M. R. Taylor, S. G. Godwin, R. L. Ceriani and J. A. Peterson (1996). *Cloning and sequence analysis of human breast epithelial antigen BA46 reveals an RGD cell adhesion sequence presented on an epidermal growth factor-like domain.* DNA Cell Biol 15(4): 281-286.

Cui, L., D. A. Houston, C. Farquharson and V. E. MacRae (2016). *Characterisation of matrix vesicles in skeletal and soft tissue mineralisation.* Bone 87: 147-158.

Cusack, M., A. C. Fraser and T. Stachel (2003). *Magnesium and phosphorus distribution in the avian eggshell.* Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 134(1): 63-69.

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.* J Proteome Res 7(8): 3461-3474.

Da Silva, M., V. Labas, Y. Nys and S. Rehault-Godbert (2017). *Investigating proteins and proteases composing amniotic and allantoic fluids during chicken embryonic development.* Poult Sci 96(8): 2931-2941.

De Ketelaere, B., T. Govaerts, P. Coucke, E. Dewil, J. Visscher, E. Decuypere and J. De Baerdemaeker (2002). *Measuring the eggshell strength of 6 different genetic strains of laying hens: techniques and comparisons.* Br Poult Sci 43(2): 238-244.

De Yoreo, J. J., P. U. Gilbert, N. A. Sommerdijk, R. L. Penn, S. Whitelam, D. Joester, H. Zhang, J. D. Rimer, A. Navrotsky, J. F. Banfield, A. F. Wallace, F. M. Michel, F. C. Meldrum, H. Colfen and P. M. Dove (2015). *Crystallization by particle attachment in synthetic, biogenic, and geologic environments.* Science 349(6247).

Dědek, J. (1966). *Le Carbonate de Chaux*. Librairie Universitaire.

Dellett, M., W. Z. Hu, V. Papadaki and S. I. Ohnuma (2012). *Small leucine rich proteoglycan family regulates multiple signalling pathways in neural development and maintenance.* Dev Growth Differ 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).* J Morphol 228(3): 287-306.

Dhami, K. N., M. Sudhakara Reddy and M. A. (2013). *Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review.* Front Microbiol 4(314).

Dillaman, R., S. Hequembourg and M. Gay (2005). *Early pattern of calcification in the dorsal carapace of the blue crab, Callinectes sapidus.* J Morphol 263(3): 356-374.

Dombre, C., N. Guyot, T. Moreau, P. Monget, M. Da Silva, J. Gautron and S. Rehault-Godbert (2017). *Egg serpins: The chicken and/or the egg dilemma.* Semin Cell Dev Biol 62: 120-132.

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.* Poult Sci 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.* Proc Natl Acad Sci U S A 110(10): 3788-3793.

Du, J., C. Liu, G. Xu, J. Xie, L. Xie and R. Zhang (2018a). *fam20C participates in the shell formation in the pearl oyster, Pinctada fucata.* Sci Rep 8(1): 3563.

Du, J. Z., G. R. Xu, C. Liu and R. Q. Zhang (2018b). *The role of phosphorylation and dephosphorylation of shell matrix proteins in shell formation: an in vivo and in vitro study.* Crystengcomm 20(27): 3905-3916.

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.* Anim Genet 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.* Anim Genet 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.* Gen Comp Endocr 163(1-2): 225-232.

Eastin, W. C., Jr. and E. Spaziani (1978). *On the mechanism of calcium secretion in the avian shell gland (uterus).* Biol Reprod 19(3): 505-518.

Ensslin, M., T. Vogel, J. J. Calvete, H. H. Thole, J. Schmidtke, T. Matsuda and E. Topfer-Petersen (1998). *Molecular cloning and characterization of P47, a novel boar sperm-associated zona pellucida-binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins.* Biol Reprod 58(4): 1057-1064.

Ensslin, M. A. and B. D. Shur (2003). *Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding.* Cell 114(4): 405-417.

Ensslin, M. A. and B. D. Shur (2007). *The EGF repeat and discoidin domain protein, SED1/MFG-E8, is required for mammary gland branching morphogenesis.* Proc Natl Acad Sci 104(8): 2715-2720.

Eskan, M. A., R. Jotwani, T. Abe, J. Chmelar, J. H. Lim, S. Liang, P. A. Ciero, J. L. Krauss, F. Li, M. Rauner, L. C. Hofbauer, E. Y. Choi, K. J. Chung, A. Hashim, M. A. Curtis, T. Chavakis and G. Hajishengallis (2012). *The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss.* Nat Immunol 13(5): 465-473.

Faibish, D., S. M. Ott and A. L. Boskey (2006). *Mineral changes in osteoporosis - A review.* Clin Orthop Relat R(443): 28-38.

Falini, G., S. Fermani and S. Goffredo (2015). *Coral biomineralization: A focus on intra-skeletal organic matrix and calcification.* Semin Cell Dev Biol 46: 17-26.

Farinazzo, A., U. Restuccia, A. Bachi, L. Guerrier, F. Fortis, E. Boschetti, E. Fasoli, A. Citterio and P. G. Righetti (2009). *Chicken egg yolk cytoplasmic proteome, mined via combinatorial peptide ligand libraries.* J Chromatogr A 1216(8): 1241-1252.

Feng, M. X., M. Z. Ma, Y. Fu, J. Li, T. Wang, F. Xue, J. J. Zhang, W. X. Qin, J. R. Gu, Z. G. Zhang and Q. Xia (2014). *Elevated autocrine EDIL3 protects hepatocellular carcinoma from anoikis through RGD-mediated integrin activation.* Mol Cancer 13: 226.

Fens, M. H. A. M., E. Mastrobattista, A. M. De Graaff, F. M. Flesch, A. Ultee, J. T. Rasmussen, G. Molema, G. Storm and R. M. Schiffelers (2008). *Angiogenic endothelium shows lactadherin-dependent phagocytosis of aged erythrocytes and apoptotic cells.* Blood 111(9): 4542-4550.

Fernandez, M. S., M. Araya and J. L. Arias (1997). *Eggshells are shaped by a precise spatio-temporal arrangement of sequentially deposited macromolecules.* Matrix Biol 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.* J Struct Biol 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 Biol 19(8): 793-803.

Filmus, J., M. Capurro and J. Rast (2008). *Glypicans.* Genome Biol 9(5): 224.

Fitzer, S. C., V. R. Phoenix, M. Cusack and N. A. Kamenos (2014). *Ocean acidification impacts mussel control on biomineralisation.* Sci Rep 4: 6218.

Fleming, R. H. (2008). *Nutritional factors affecting poultry bone health.* Proc Nutr Soc 67(2): 177-183.

Fong, B. Y., C. S. Norris and A. K. H. MacGibbon (2007). *Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane.* Int Dairy J 17(4): 275-288.

Foster, B. L., K. J. Nagatomo, H. W. Tso, A. B. Tran, F. H. Nociti, Jr., S. Narisawa, M. C. Yadav, M. D. McKee, J. I. Millan and M. J. Somerman (2013). *Tooth root dentin mineralization defects in a mouse model of hypophosphatasia.* J Bone Miner Res 28(2): 271-282.

Franchi, A., S. Bocca, S. Anderson, R. Riggs and S. Oehninger (2011). *Expression of milk fat globule EGF-factor 8 (MFG-E8) mRNA and protein in the human endometrium and its regulation by prolactin.* Mol Hum Reprod 17(6): 360-371.

Frankel, R. B. and D. A. Bazylinski (2003). *Biologically induced mineralization by bacteria.* Rev Mineral Geochem 54: 95-114.

Franze, S., F. Selmin, E. Samaritani, P. Minghetti and F. Cilurzo (2018). *Lyophilization of Liposomal Formulations: Still Necessary, Still Challenging.* Pharmaceutics 10(3).

Fraser, A. C., M. M. Bain and S. E. Solomon (1998). *Organic matrix morphology and distribution in the palisade layer of eggshells sampled at selected periods during lay.* Brit Poultry Sci 39(2): 225-228.

Freeman, B. M. and M. A. Vince (1974). General development, postural changes, activity and relationship between the embryo and other structures within the shell. *Development of the avian embryo*. B. M. Freeman and M. A. Vince(Eds). Dordrecht, Springer**:** 20-37.

Freeman, C. L., J. H. Harding, D. Quigley and P. M. Rodger (2010). *Structural Control of Crystal Nuclei by an Eggshell Protein.* Angew Chem Int Edit 49(30): 5135-5137.

Fujisawa, R. and M. Tamura (2012). *Acidic bone matrix proteins and their roles in calcification.* Front Biosci-Landmrk 17: 1891-1903.

Fullmer, C. S., M. E. Brindak, A. Bar and R. H. Wasserman (1976). *The purification of calcium-binding protein from the uterus of the laying hen.* Proc Soc Exp Biol Med 152(2): 237-241.

Gabrielli, M. G. and D. Accili (2010). *The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development.* J Biomed Biotechnol.

Gal, A., A. Hirsch, S. Siegel, C. Li, B. Aichmayer, Y. Politi, P. Fratzl, S. Weiner and L. Addadi (2012). *Plant cystoliths: a complex functional biocomposite of four distinct silica and amorphous calcium carbonate phases.* Chemistry 18(33): 10262-10270.

Gasse, B. (2015). *Les phosphoprotéines sécrétées liant le calcium (SCPP) impliquées dans la formation de l'émail dentaire : expression chez le lézard Anolis carolinensis et évolution chez les amniotes.* PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie.

Gatti, J. L., S. Metayer, M. Belghazi, F. Dacheux and J. L. Dacheux (2005). *Identification, proteomic profiling, and origin of ram epididymal fluid exosome-like vesicles.* Biol Reprod 72(6): 1452-1465.

Gautron, J. (2017a). ANR IMPACT report, INRA**:** 17.

Gautron, J. (2017b). Biominéralisation de la coquille d'oeuf d'oiseaux. Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), FRA.

Gautron, J. (2019). *Proteomics Analysis of Avian Eggshell Matrix Proteins: Toward New Advances on Biomineralization.* Proteomics 19(13).

Gautron, J., M. Bain, 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.* Br Poult Sci 37(4): 853-866.

Gautron, J., A. Brionne, O. Bouchez, C. Cabau, C. Antier-Hennequet, M. Hincke and Y. Nys (en cours). *An integrative study of gene and protein toolkits of chicken eggshell biomineralization.*

Gautron, J., N. Guyot, A. Brionne and S. Réhault-Godbert (2019). Bioactive Minor Egg Components. *Eggs as Functional Foods and Nutraceuticals for Human Health*. J. Wu(Eds). London, The Royal Society of Chemistry**:** 259-284.

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.* J Biol Chem 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.* Connect Tissue Res 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.* Connect Tissue Res 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.* J Biol Chem 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.* World Poultry Sci J 63(1): 82-90.

Gautron, J. and Y. Nys (2007a). Eggshell matrix proteins. *Bioactive egg compounds*. R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton and R. Schade(Eds). Berlin, Springer**:** 103-108.

Gautron, J. and Y. Nys (2007b). Function of Eggshell Matrix Proteins. *Bioactive Egg Compounds*. R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton and R. Schade(Eds). Berlin, Springer**:** 109-115.

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.* Prod Anim 23(2): 133-141.

Gautron, J., S. Rehault-Godbert, G. Pascal, Y. Nys and M. T. Hincke (2011). *Ovocalyxin-36 and other LBP/BPI/PLUNC-like proteins as molecular actors of the mechanisms of the avian egg natural defences.* Biochem Soc T 39: 971-976.

Gay, C. V., H. Schraer and T. E. Hargest (1978). *Ultrastructure of Matrix Vesicles and Mineral in Unfixed Embryonic Bone.* Metab Bone Dis Relat 1(2): 105-108.

Genge, B. R., X. Cao, L. N. Wu, W. R. Buzzi, R. W. Showman, A. L. Arsenault, Y. Ishikawa and R. E. Wuthier (1992). *Establishment of the primary structure of the major lipid-dependent Ca2+ binding proteins of chicken growth plate cartilage matrix vesicles: identity with anchorin CII (annexin V) and annexin II.* J Bone Miner Res 7(7): 807-819.

Genge, B. R., L. N. Wu and R. E. Wuthier (2007). *In vitro modeling of matrix vesicle nucleation: synergistic stimulation of mineral formation by annexin A5 and phosphatidylserine.* J Biol Chem 282(36): 26035-26045.

Gericke, A., C. Qin, L. Spevak, Y. Fujimoto, W. T. Butler, E. S. Sorensen and A. L. Boskey (2005). *Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization.* Calcif Tissue Int 77(1): 45-54.

Gho, Y. S. and C. Lee (2017). *Emergent properties of extracellular vesicles: a holistic approach to decode the complexity of intercellular communication networks.* Mol Biosyst 13(7): 1291-1296.

Gho, Y. S. and J. Lee (2019). *Special issue on the role of extracellular vesicles in human diseases.* Exp Mol Med 51.

Gilbert, A. B. (1971). The egg: its physical and chemical aspects. *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*. D. J. Bell and B. M. Freeman(Eds). Academic Press, London. 3**:** 1379-1399.

Gilbert, A. B. (1979). Form and function in birds. *Female genital organs*. A. King and J. Mc Lelland(Eds). New York, Academic press.

Gloux, A., N. Le Roy, A. Brionne, E. Bonin, A. Juanchich, G. Benzoni, M. L. Piketty, D. Prie, Y. Nys, J. Gautron, A. Narcy and M. J. Duclos (2019). *Candidate genes of the transcellular and paracellular calcium absorption pathways in the small intestine of laying hens.* Poultry Sci 98(11): 6005-6018.

Golub, E. E. (2009). *Role of matrix vesicles in biomineralization.* Biochim Biophys Acta 1790(12): 1592-1598.

Gong, Y. U., C. E. Killian, I. C. Olson, N. P. Appathurai, A. L. Amasino, M. C. Martin, L. J. Holt, F. H. Wilt and P. U. Gilbert (2012a). *Phase transitions in biogenic amorphous calcium carbonate.* Proc Natl Acad Sci U S A 109(16): 6088-6093.

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. U. P. A. Gilbert (2012b). *Phase transitions in biogenic amorphous calcium carbonate.* P Natl Acad Sci USA 109(16): 6088-6093.

Guérin-Dubiard, C., M. Anton, J. Gautron, Y. Nys and F. Nau (2010). Composition de l'oeuf. *Science et technologie de l'oeuf*. F. Nau, C. Guérin-Dubiard, F. Baron and J. L. Thapon(Eds). Cachan, Lavoisier. 2**:** 1-169.

Guinotte, F., J. Gautron, Y. Nys and A. Soumarmon (1995). *Calcium solubilization and retention in the gastrointestinal tract in chicks (Gallus domesticus) as a function of gastric acid secretion inhibition and of calcium carbonate particle size.* Br J Nutr 73(1): 125-139.

Guinotte, F. and Y. Nys (1993). *Factors affecting the intestinal calcium availability in laying hens: consequences on shell quality*. 5th European symposium on the quality of eggs and egg products, Tours, Worlds Poultry Science Association.

Guinotte, F., Y. Nys and F. Demonredon (1991). *The Effects of Particle-Size and Origin of Calcium-Carbonate on Performance and Ossification Characteristics in Broiler Chicks.* Poultry Sci 70(9): 1908-1920.

Gunther, C., A. Becker, G. Wolf and M. Epple (2005). *In vitro synthesis and structural characterization of amorphous calcium carbonate.* Z Anorg Allg Chem 631(13-14): 2830-2835.

Guyot, N., V. Labas, G. Harichaux, M. Chesse, J. C. Poirier, Y. Nys and S. Rehault-Godbert (2016). *Proteomic analysis of egg white heparin-binding proteins: towards the identification of natural antibacterial molecules.* Sci Rep 6: 27974.

Ha, Y. W., M. J. Son, K. S. Yun and Y. S. Kim (2007). *Relationship between eggshell strength and keratan sulfate of eggshell membranes.* Comp Biochem Phys A 147(4): 1109-1115.

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.* J Biol Chem 270(10): 5115-5121.

Hamilton, R. M. G. (1986). *The Microstructure of the Hens Eggshell - a Short Review.* Food Microstruct 5(1): 99-110.

Hanayama, R., M. Tanaka, K. Miwa and S. Nagata (2004a). *Expression of developmental endothelial locus-1 in a subset of macrophages for engulfment of apoptotic cells.* J Immunol 172(6): 3876-3882.

Hanayama, R., M. Tanaka, K. Miwa, A. Shinohara, A. Iwamatsu and S. Nagata (2002). *Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes.* Nature 417(6885): 182-187.

Hanayama, R., M. Tanaka, K. Miyasaka, K. Aozasa, M. Koike, Y. Uchiyama and S. Nagata (2004b). *Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice.* Science 304(5674): 1147-1150.

Handford, P., A. K. Downing, Z. Rao, D. R. Hewett, B. C. Sykes and C. M. Kielty (1995). *The calcium binding properties and molecular organization of epidermal growth factor-like domains in human fibrillin-1.* J Biol Chem 270(12): 6751-6756.

Handford, P. A., M. Baron, M. Mayhew, A. Willis, T. Beesley, G. G. Brownlee and I. D. Campbell (1990). *The first EGF-like domain from human factor IX contains a high-affinity calcium binding site.* EMBO J 9(2): 475-480.

Handford, P. A., M. Mayhew, M. Baron, P. R. Winship, I. D. Campbell and G. G. Brownlee (1991). *Key residues involved in calcium-binding motifs in EGF-like domains.* Nature 351(6322): 164-167.

Hasegawa, T., T. Yamamoto, E. Tsuchiya, H. Hongo, K. Tsuboi, A. Kudo, M. Abe, T. Yoshida, T. Nagai, N. Khadiza, A. Yokoyama, K. Oda, H. Ozawa, P. H. L. de Freitas, M. Li and N. Amizuka (2017). *Ultrastructural and biochemical aspects of matrix vesicle-mediated mineralization.* Jpn Dent Sci Rev 53(2): 34-45.

Hassan, M. I., B. Shajee, A. Waheed, F. Ahmad and W. S. Sly (2013). *Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes.* Bioorgan Med Chem 21(6): 1570-1582.

Hasse, B., H. Ehrenberg, J. C. Marxen, W. Becker and M. Epple (2000). *Calcium carbonate modifications in the mineralized shell of the freshwater snail Biomphalaria glabrata.* Chemistry 6(20): 3679-3685.

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.* Cryst Growth Des 8(12): 4330-4339.

Hernandez-Hernandez, A., A. B. Rodriguez-Navarro, J. Gomez-Morales, C. Jimenez-Lopez, Y. Nys and J. M. Garcia-Ruiz (2008b). *Influence of model globular proteins with different isoelectric points on the precipitation of calcium carbonate.* Cryst Growth Des 8(5): 1495-1502.

Hernandez-Hernandez, A., M. L. Vidal, J. Gomez-Morales, A. B. Rodriguez-Navarro, V. Labas, J. Gautron, Y. Nys and J. M. G. Ruiz (2008c). *Influence of eggshell matrix proteins on the precipitation of calcium carbonate (CaCO3).* J Cryst Growth 310(7-9): 1754-1759.

Hessvik, N. P. and A. Llorente (2018). *Current knowledge on exosome biogenesis and release.* Cell Mol Life Sci 75(2): 193-208.

Hidai, C., M. Kawana, H. Kitano and S. Kokubun (2007). *Discoidin domain of Del1 protein contributes to its deposition in the extracellular matrix.* Cell Tissue Res 330(1): 83-95.

Hidai, C., T. Zupancic, K. Penta, A. Mikhail, M. Kawana, E. E. Quertermous, Y. Aoka, M. Fukagawa, Y. Matsui, D. Platika, R. Auerbach, B. L. M. Hogan, R. Snodgrass and T. Quertermous (1998). *Cloning and characterization of developmental endothelial locus-1: An embryonic endothelial cell protein that binds the alpha v beta 3 integrin receptor.* Gene Dev 12(1): 21-33.

Hincke, M., J. Gautron, Y. Nys, A. Rodriguez-Navarro and M. D. McKee (2011). The eggshell: structure and protective function. *Improving the safety and quality of eggs and egg products*. Y. Nys, M. Bain and F. Van immerseel(Eds). Cambridge, Woodhead publishing. 1**:** 151-182.

Hincke, M. 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.

Hincke, M. T. (1995). *Ovalbumin is a component of the chicken eggshell matrix.* Connect Tissue Res 31(3): 227-233.

Hincke, M. T., A. M. Bernard, E. R. Lee, C. P. Tsang and R. Narbaitz (1992). *Soluble protein constituents of the domestic fowl's eggshell.* Br Poult Sci 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.* J Histochem Cytochem 56(5): 467-476.

Hincke, M. T., M. Da Silva, N. Guyot, J. Gautron, M. D. McKee, R. Guabiraba-Brito and S. Rehault-Godbert (2019). *Dynamics of Structural Barriers and Innate Immune Components during Incubation of the Avian Egg: Critical Interplay between Autonomous Embryonic Development and Maternal Anticipation.* J Innate Immun 11(2): 111-124.

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 Biol 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.* J Biol Chem 274(46): 32915-32923.

Hincke, M. T., Y. Nys, J. Gautron, K. Mann, A. B. Rodriguez-Navarro and M. D. McKee (2012). *The eggshell: structure, composition and mineralization.* Front Biosci 17: 1266-1280.

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).* Calcif Tissue Int 56(6): 578-583.

Ho, H. K., J. J. Jang, S. Kaji, G. Spektor, A. Fong, P. Yang, B. S. Hu, R. Schatzman, T. Quertermous and J. P. Cooke (2004). *Developmental endothelial locus-1 (Del-1), a novel angiogenic protein: its role in ischemia.* Circulation 109(10): 1314-1319.

Hodges, R. D. and K. Lörcher (1967). *Possible Sources of the Carbonate Fraction of Egg Shell Calcium Carbonate* Nature 216: 609-610.

Horst, F. (2007). Anatomie d'un oeuf

Hu, C. C., T. C. Hart, B. R. Dupont, J. J. Chen, X. Sun, Q. Qian, C. H. Zhang, H. Jiang, V. L. Mattern, J. T. Wright and J. P. Simmer (2000). *Cloning human enamelin cDNA, chromosomal localization, and analysis of expression during tooth development.* J Dent Res 79(4): 912-919.

Huang, J., C. Liu, L. Xie and R. Zhang (2018). *Amorphous calcium carbonate: A precursor phase for aragonite in shell disease of the pearl oyster.* Biochem Biophys Res Commun 497(1): 102-107.

Huang, L. H., X. H. Ke, W. Sweeney and J. P. Tam (1989). *Calcium binding and putative activity of the epidermal growth factor domain of blood coagulation factor IX*. Biochem Biophys Res Commun 160(1): 133-139.

Hurwitz, S. and A. Bar (1965). *Absorption of Calcium and Phosphorus Along the Gastrointestinal Tract of the Laying Fowl as Influenced by Dietary Calcium and Egg Shell Formation.* J Nutr 86: 433-438.

Hurwitz, S. and A. Bar (1968). *Activity Concentration and Lumen-Blood Electrochemical Potential Difference of Calcium in Intestine of Laying Hen.* J Nutr 95(4): 647-654.

Hvarregaard, J., M. H. Andersen, L. Berglund, J. T. Rasmussen and T. E. Petersen (1996). *Characterization of glycoprotein PAS-6/7 from membranes of bovine milk fat globules.* Eur J Biochem 240(3): 628-636.

Ihli, J., A. N. Kulak and F. C. Meldrum (2013). *Freeze-drying yields stable and pure amorphous calcium carbonate (ACC).* Chem Commun 49(30): 3134-3136.

Ihli, J., W. C. Wong, E. H. Noel, Y. Y. Kim, A. N. Kulak, H. K. Christenson, M. J. Duer and F. C. Meldrum (2014). *Dehydration and crystallization of amorphous calcium carbonate in solution and in air.* Nat Commun 5.

Jeong, D., S. Ban, S. Oh, S. Jin Lee, S. Yong Park and Y. W. Koh (2017). *Prognostic Significance of EDIL3 Expression and Correlation with Mesenchymal Phenotype and Microvessel Density in Lung Adenocarcinoma.* Sci Rep 7(1): 8649.

Jiang, R. S., Z. Xie, X. Y. Chen and Z. Y. Geng (2010). *A single nucleotide polymorphism in the parathyroid hormone gene and effects on eggshell quality in chickens.* Poult Sci 89(10): 2101-2105.

Jiang, S. H., Y. Wang, J. Y. Yang, J. Li, M. X. Feng, Y. H. Wang, X. M. Yang, P. He, G. A. Tian, X. X. Zhang, Q. Li, X. Y. Cao, Y. M. Huo, M. W. Yang, X. L. Fu, J. Li, D. J. Liu, M. Dai, S. Y. Wen, J. R. Gu, J. Hong, R. Hua, Z. G. Zhang and Y. W. Sun (2016). *Overexpressed EDIL3 predicts poor prognosis and promotes anchorage-independent tumor growth in human pancreatic cancer.* Oncotarget 7(4): 4226-4240.

Jimenez-Lopez, C., A. Rodriguez-Navarro, J. M. Dominguez-Vera and J. M. Garcia-Ruiz (2003). *Influence of lysozyme on the precipitation of calcium carbonate: A kinetic and morphologic study.* Geochim Cosmochim Ac 67(9): 1667-1676.

Jin, W. J., S. Q. Jiang, H. H. Pan and R. K. Tang (2018). *Amorphous Phase Mediated Crystallization: Fundamentals of Biomineralization.* Crystals 8(1).

Jinushi, M., Y. Nakazaki, D. R. Carrasco, D. Draganov, N. Souders, M. Johnson, M. C. Mihm and G. Dranoff (2008). *Milk Fat Globule EGF-8 Promotes Melanoma Progression through Coordinated Akt and Twist Signaling in the Tumor Microenvironment.* Cancer Res 68(21): 8889-8898.

Johnston, P. M. and C. L. Comar (1955). *Distribution and contribution of calcium from the albumen, yolk and shell to the developing chick embryo.* Am J Physiol 183(3): 365-370.

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: 57.

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: 613.

Kalra, H., G. P. C. Drummen and S. Mathivanan (2016). *Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing.* Int J Mol Sci 17(2).

Kawasaki, K. (2009). *The SCPP gene repertoire in bony vertebrates and graded differences in mineralized tissues.* Dev Genes Evol 219(3): 147-157.

Kawasaki, K. and C. T. Amemiya (2014). *SCPP genes in the coelacanth: tissue mineralization genes shared by sarcopterygians.* J Exp Zool B Mol Dev Evol 322(6): 390-402.

Kawasaki, K., T. Suzuki and K. M. Weiss (2004). *Genetic basis for the evolution of vertebrate mineralized tissue.* Proc Natl Acad Sci U S A 101(31): 11356-11361.

Kawasaki, K. and K. M. Weiss (2003). *Mineralized tissue and vertebrate evolution: the secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster.* Proc Natl Acad Sci U S A 100(7): 4060-4065.

Kaweewong, K., W. Garnjanagoonchorn, W. Jirapakkul and S. Roytrakul (2013). *Solubilization and identification of hen eggshell membrane proteins during different times of chicken embryo development using the proteomic approach.* Protein J 32(4): 297-308.

Kerschnitzki, M., A. Akiva, A. Ben Shoham, Y. Asscher, W. Wagermaier, P. Fratzl, L. Addadi and S. Weiner (2016a). *Bone mineralization pathways during the rapid growth of embryonic chicken long bones.* J Struct Biol 195(1): 82-92.

Kerschnitzki, M., A. Akiva, A. Ben Shoham, N. Koifman, E. Shimoni, K. Rechav, A. A. Arraf, T. M. Schultheiss, Y. Talmon, E. Zelzer, S. Weiner and L. Addadi (2016b). *Transport of membrane-bound mineral particles in blood vessels during chicken embryonic bone development.* Bone 83: 65-72.

Khalifa, G., K. Kahil, L. Addadi and S. Weiner (2018). Calcium Ion and Mineral Pathways in Biomineralization: A Perspective. *Biomineralization: From Molecular and Nano-structural Analyses to Environmental Science*. K. Endo, T. Kogure and H. Nagasawa(Eds). Singapore, Springer**:** 97-103.

Kiani, C., L. Chen, Y. J. Wu, A. J. Yee and B. B. Yang (2002). *Structure and function of aggrecan.* Cell Res 12(1): 19-32.

Kido, S. and Y. Doi (1988). *Separation and Properties of the Inner and Outer Layers of the Vitelline Membrane of Hen's Eggs.* Poultry Sci 67(3): 476-486.

Kim, C. W., H. M. Lee, T. H. Lee, C. H. Kang, H. K. Kleinman and Y. S. Gho (2002). *Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin.* Cancer Res 62(21): 6312-6317.

Kim, D. H., C. Kanno and Y. Mizokami (1992). *Purification and Characterization of Major Glycoproteins, Pas-6 and Pas-7, from Bovine-Milk Fat Globule-Membrane.* Biochim Biophys Acta 1122(2): 203-211.

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).

Kirsch, T. and H. Claassen (2000). *Matrix vesicles mediate mineralization of human thyroid cartilage.* Calcif Tissue Int 66(4): 292-297.

Kirsch, T., G. Harrison, E. E. Golub and H. D. Nah (2000). *The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage.* J Biol Chem 275(45): 35577-35583.

Kitano, H. and C. Hidai (2014). *EDIL3 (EGF-Like Repeats And Discoidin I-Like Domains 3).* Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.

Kitano, H., S. Kokubun and C. Hidai (2010). *The extracellular matrix protein Del1 induces apoptosis via its epidermal growth factor motif.* Biochem Biophys Res Commun 393(4): 757-761.

Klosowski, M. M., R. J. Friederichs, R. Nichol, N. Antolin, R. Carzaniga, W. Windl, S. M. Best, S. J. Shefelbine, D. W. McComb and A. E. Porter (2015). *Probing carbonate in bone forming minerals on the nanometre scale.* Acta Biomater 20: 129-139.

Knott, V., A. K. Downing, C. M. Cardy and P. Handford (1996). *Calcium binding properties of an epidermal growth factor-like domain pair from human fibrillin-1*. J Mol Biol 255(1): 22-27.

Kodali, V. K., S. A. Gannon, S. Paramasivam, S. Raje, T. Polenova and C. Thorpe (2011). *A Novel Disulfide-Rich Protein Motif from Avian Eggshell Membranes.* Plos One 6(3).

Komura, H., M. Miksa, R. Wu, S. M. Goyert and P. Wang (2009). *Milk Fat Globule EGF-factor VIII Is Downregulated in Sepsis via the LPS-CD14 Pathway.* J Immunol. 182(1): 581-587.

Konrad, F., B. Purgstaller, F. Gallien, V. Mavromatis, P. Gane and M. Dietzel (2018). *Influence of aqueous Mg concentration on the transformation of amorphous calcium carbonate.* J Cryst Growth 498: 381-390.

Larocca, D., J. A. Peterson, R. Urrea, J. Kuniyoshi, A. M. Bistrain and R. L. Ceriani (1991). *A Mr 46,000 Human-Milk Fat Globule Protein That Is Highly Expressed in Human Breast-Tumors Contains Factor-Viii-Like Domains.* Cancer Res 51(18): 4994-4998.

Larsson, D. and I. Nemere (2002). *Vectorial Transcellular Calcium Transport in Intestine: Integration of Current Models.* J Biomed Biotechnol 2(3): 117-119.

Lavelin, I., N. Meiri, O. Genina, R. Alexiev and M. Pines (2001). *Na(+)-K(+)-ATPase gene expression in the avian eggshell gland: distinct regulation in different cell types.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 281(4): R1169-1176.

Layh-Schmitt, G., S. Lu, F. Navid, S. R. Brooks, E. Lazowick, K. M. Davis, C. Montagna, M. Gadina and R. A. Colbert (2017). *Generation and differentiation of induced pluripotent stem cells reveal ankylosing spondylitis risk gene expression in bone progenitors.* Clin Rheumatol 36(1): 143-154.

Le Roy, N., A. Brionne, L. Combes-Soia, V. Labas, A. Rodriguez-Navarro, C. Rivard, Y. Nys and J. Gautron (2018). *Proteomics and ultrastructural study of the Guinea fowl eggshell at key stages of the biomineralization* The XVth European Poultry Conference, Dubrovnik, Croatia, Worlds Poultry Science Association.

Le Roy, N., L. Combes-Soia, A. Brionne, V. Labas, A. Rodriguez-Navarro, M. Hincke, Y. Nys and J. Gautron (2019). *Guinea fowl eggshell quantitative proteomics yield new findings related to its unique structural characteristics and superior mechanical properties.* J Proteomics.

Le Roy, N., D. J. Jackson, B. Marie, P. Ramos-Silva and F. Marin (2014). *The evolution of metazoan alpha-carbonic anhydrases and their roles in calcium carbonate biomineralization.* Front Zool 11.

Leach, J. and M. Roland (1982). *Biochemistry of the Organic Matrix of the Eggshell.* Poultry Sci 61(10): 2040-2047.

Lee, J. E., P. G. Moon, Y. E. Cho, Y. B. Kim, I. S. Kim, H. Y. Park and M. C. Baek (2016). *Identification of EDIL3 on extracellular vesicles involved in breast cancer cell invasion.* J Proteomics 131: 17-28.

Lee, S. H., D. Y. Kim, F. Jing, H. Kim, C. O. Yun, D. J. Han and E. Y. Choi (2015). *Del-1 overexpression potentiates lung cancer cell proliferation and invasion.* Biochem Biophys Res Commun 468(1-2): 92-98.

Leonardi-Essmann, F., M. Emig, Y. Kitamura, R. Spanagel and P. J. Gebicke-Haerter (2005). *Fractalkine-upregulated milk-fat globule EGF factor-8 protein in cultured rat microglia.* J Neuroimmunol 160(1-2): 92-101.

Levi-Kalisman, Y., S. Raz, S. Weiner, L. Addadi and I. Sagi (2002). *Structural differences between biogenic amorphous calcium carbonate phases using X-ray absorption spectroscopy.* Adv Funct Mater 12(1): 43-48.

Li-Chan, E. C. Y. and H. Kim (2008). Structure and Chemical Compositions of Eggs. *Egg Bioscience and Biotechnology*. Y. Mine(Eds). New Jersey, John Wiley & Sons, Inc**:** 1-95.

Lin, L., Q. Huai, M. Huang, B. Furie and B. C. Furie (2007). *Crystal structure of the bovine lactadherin C2 domain, a membrane binding motif, shows similarity to the C2 domains of factor V and factor VIII.* J Mol Biol 371(3): 717-724.

Lin, Y. P. and P. C. Singer (2005). *Inhibition of calcite crystal growth by polyphosphates.* Water Res 39(19): 4835-4843.

Linder, M. C., M. Moriya, A. Whon, A. Kassa and C. Gilley (2006). *Vesicular transport of fe and interaction with other metal ions in polarized Caco2 cell monolayers.* Biol Res 39(1): 143-156.

Liu, W., D. Li, J. Liu, S. Chen, L. Qu, J. Zheng, G. Xu and N. Yang (2011). *A genome-wide SNP scan reveals novel loci for egg production and quality traits in white leghorn and brown-egg dwarf layers.* PLos One 6(12).

Liu, X., Z. Liu, C. Jin, H. Li and J. L. Li (2019). *A novel nacre matrix protein hic24 in Hyriopsis cumingii is essential for calcium carbonate nucleation and involved in pearl formation.* Biotechnol Appl Biochem 66(1): 14-20.

Liu, Y., N. Qiu and M. Ma (2013a). *Comparative proteomic analysis of hen egg white proteins during early phase of embryonic development by combinatorial peptide ligand library and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight.* Poultry Sci 92(7): 1897-1904.

Liu, Z., Q. Zheng, X. Zhang and L. Lu (2013b). *Microarray analysis of genes involved with shell strength in layer shell gland at the early stage of active calcification.* Asian-Australas J Anim Sci 26(5): 609-624.

Lopez, C. (2011). *Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure.* Curr Opin Colloid In 16(5): 391-404.

Loste, E., R. J. Park, J. Warren and F. C. Meldrum (2004). *Precipitation of calcium carbonate in confinement.* Adv Funct Mater 14(12): 1211-1220.

Lowenstam, H. A. (1981). *Minerals formed by organisms.* Science 211(4487): 1126-1131.

Lowenstam, H. A. and S. Weiner (1989). *On biomineralization*. New York, Oxford University Press.

Luquet, G. (2012). *Biomineralizations: insights and prospects from crustaceans.* Zookeys (176): 103-121.

Ma, Z., J. Huang, J. Sun, G. Wang, C. Li, L. Xie and R. Zhang (2007). *A novel extrapallial fluid protein controls the morphology of nacre lamellae in the pearl oyster, Pinctada fucata.* J Biol Chem 282(32): 23253-23263.

Macias-Sanchez, E., A. G. Checa and M. G. Willinger (2015). *The Transport System of Nacre Components through the Surface Membrane of Gastropods.* Key Eng. Mater. 672: 103-112.

Macias-Sanchez, E., M. G. Willinger, C. M. Pina and A. G. Checa (2017). *Transformation of ACC into aragonite and the origin of the nanogranular structure of nacre.* Sci Rep-Uk 7.

Mahamid, J., B. Aichmayer, E. Shimoni, R. Ziblat, C. H. Li, S. Siegel, O. Paris, P. Fratzl, S. Weiner and L. Addadi (2010). *Mapping amorphous calcium phosphate transformation into crystalline mineral from the cell to the bone in zebrafish fin rays.* P Natl Acad Sci USA 107(14): 6316-6321.

Mahamid, J., A. Sharir, D. Gur, E. Zelzer, L. Addadi and S. Weiner (2011). *Bone mineralization proceeds through intracellular calcium phosphate loaded vesicles: A cryo-electron microscopy study.* J Struct Biol 174(3): 527-535.

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. (2015). *The calcified eggshell matrix proteome of a songbird, the zebra finch (Taeniopygia guttata).* Proteome Sci 13.

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 Biol 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 Sci 9(1): 7.

Mann, K. and M. Mann (2013). *The proteome of the calcified layer organic matrix of turkey (Meleagris gallopavo) eggshell.* Proteome Sci 11.

Mann, K. and M. Mann (2015). *Proteomic analysis of quail calcified eggshell matrix: a comparison to chicken and turkey eggshell proteomes.* Proteome Sci 13: 22.

Mann, K., J. V. Olsen, B. Macek, F. Gnad and M. Mann (2007). *Phosphoproteins of the chicken eggshell calcified layer.* Proteomics 7(1): 106-115.

Mann, K., F. H. Wilt and A. J. Poustka (2010). *Proteomic analysis of sea urchin (Strongylocentrotus purpuratus) spicule matrix.* Proteome Sci 8: 33.

Mann, S. (1983). *Mineralization in Biological-Systems.* Struct Bond 54: 125-174.

Mann, S. (1988). *Molecular recognition in biomineralization.* Nature 332: 119-124.

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.* Proc Natl Acad Sci U S A 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.* J Mol Evol 72(5-6): 531-546.

Marie, B., A. Marie, D. J. Jackson, L. Dubost, B. M. Degnan, C. Milet and F. Marin (2010). *Proteomic analysis of the organic matrix of the abalone Haliotis asinina calcified shell.* Proteome Sci 8.

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.* Mar Biotechnol 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.* Mar Biotechnol 13(6): 1159-1168.

Marie, P. (2015). *Biominéralisation de la coquille d'oeuf de poule : caractérisation des protéines de la matrice organique impliquées dans l'initiation de la minéralisation*. PhD thesis, Université François Rabelais de Tours.

Marie, P., V. Labas, A. Brionne, G. Harichaux, C. Hennequet-Antier, Y. Nys and J. Gautron (2015a). *Quantitative proteomics and bioinformatic analysis provide new insight into protein function during avian eggshell biomineralization.* J Proteomics 113: 178-193.

Marie, P., V. Labas, A. Brionne, G. Harichaux, C. Hennequet-Antier, A. B. Rodriguez-Navarro, Y. Nys and J. Gautron (2015b). *Quantitative proteomics provides new insights into chicken eggshell matrix protein functions during the primary events of mineralisation and the active calcification phase.* J Proteomics 126: 140-154.

Marin, F. and G. Luquet (2004). *Molluscan shell proteins.* Cr Palevol 3(6-7): 469-492.

Marxen, J. C., W. Becker, D. Finke, B. Hasse and M. Epple (2003). *Early mineralization in Biomphalaria glabrata: Microscopic and structural results.* J Mollus Stud 69: 113-121.

Mass, T., A. J. Giuffre, C. Y. Sun, C. A. Stifler, M. J. Frazier, M. Neder, N. Tamura, C. V. Stan, M. A. Marcus and P. Gilbert (2017a). *Amorphous calcium carbonate particles form coral skeletons.* P Natl Acad Sci USA 114(37): E7670-E7678.

Mass, T., A. J. Giuffre, C. Y. Sun, C. A. Stifler, M. J. Frazier, M. Neder, N. Tamura, C. V. Stan, M. A. Marcus and P. Gilbert (2017b). *Amorphous calcium carbonate particles form coral skeletons.* Proc Natl Acad Sci U S A 114(37): E7670-E7678.

Mather, I. H. and T. W. Keenan (1975). *Studies on Structure of Milk-Fat Globule Membrane.* J Membrane Biol 21(1-2): 65-85.

Matschke, K., L. Da Silva-Azevedo, R. Hlushchuk, V. Djonov and O. Baum (2006). *Annexins as cell-type-specific markers in the developing chicken chorionallantoic membrane.* Cell Tissue Res 323(3): 395-404.

Matsuda, A., A. Jacob, R. Wu, M. Zhou, M. Aziz and P. Wang (2013). *Milk fat globule--EGF factor VIII ameliorates liver injury after hepatic ischemia-reperfusion.* J Surg Res 180(1): e37-46.

Matsuda, A., A. Jacob, R. Wu, M. Zhou, J. M. Nicastro, G. F. Coppa and P. Wang (2011). *Milk fat globule-EGF factor VIII in sepsis and ischemia-reperfusion injury.* Mol Med 17(1-2): 126-133.

Matsumoto, K., N. Kamiya, K. Suwan, F. Atsumi, K. Shimizu, T. Shinomura, Y. Yamada, K. Kimata and H. Watanabe (2006). *Identification and characterization of versican/PG-M aggregates in cartilage.* J Biol Chem 281(26): 18257-18263.

Mauk, M. R., F. I. Rosell, B. Lelj-Garolla, G. R. Moore and A. G. Mauk (2005). *Metal ion binding to human hemopexin.* Biochemistry-Us 44(6): 1864-1871.

Meic, I. B., J. Kontrec, D. D. Jurasin, A. Selmani, B. N. Dzakula, N. Maltar-Strmecki, D. M. Lyons, M. Plodinec, M. Ceh, A. Gajovic, M. D. Sikiric and D. Kralj (2018). *How similar are amorphous calcium carbonate and calcium phosphate? A comparative study of amorphous phase formation conditions.* Crystengcomm 20(1): 35-50.

Meiron, O. E., E. Bar-David, E. D. Aflalo, A. Shechter, D. Stepensky, A. Berman and A. Sagi (2011). *Solubility and bioavailability of stabilized amorphous calcium carbonate.* J Bone Miner Res 26(2): 364-372.

Merolli, A. and M. Santin (2009). *Role of phosphatidyl-serine in bone repair and its technological exploitation.* Molecules 14(12): 5367-5381.

Miksa, M., D. Amin, R. Wu, A. Jacob, M. Zhou, W. Dong, W.-L. Yang, T. S. Ravikumar and P. Wang (2008). *Maturation-induced downregulation of MFG-E8 impairs apoptotic cell clearance and enhances endotoxin response.* Int J Mol Med 22(6): 743-748.

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.* Connect Tissue Res 48(1): 1-8.

Miksik, I., P. Ergang and J. Pacha (2014). *Proteomic analysis of chicken eggshell cuticle membrane layer.* Anal Bioanal Chem 406(29): 7633-7640.

Miksik, I., P. Sedlakova, K. Lacinova, S. Pataridis and A. Eckhardt (2010). *Determination of insoluble avian eggshell matrix proteins.* Anal Bioanal Chem 397(1): 205-214.

Mitroulis, I., L. S. Chen, R. P. Singh, I. Kourtzelis, M. Economopoulou, T. Kajikawa, M. Troullinaki, A. Ziogas, K. Ruppova, K. Hosur, T. Maekawa, B. Wang, P. Subramanian, T. Tonn, P. Verginis, M. von Bonin, M. Wobus, M. Bornhauser, T. Grinenko, M. Di Scala, A. Hidalgo, B. Wielockx, G. Hajishengallis and T. Chavakis (2017). *Secreted protein Del-1 regulates myelopoiesis in the hematopoietic stem cell niche.* J Clin Invest 127(10): 3624-3639.

Miyamoto, H., T. Miyashita, M. Okushima, S. Nakano, T. Morita and A. Matsushiro (1996). *A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls.* Proc Natl Acad Sci U S A 93(18): 9657-9660.

Miyasaka, K., R. Hanayama, M. Tanaka and S. Nagata (2004). *Expression of milk fat globule epidermal growth factor 8 in immature dendritic cells for engulfment of apoptotic cells.* Eur J Immunol 34(5): 1414-1422.

Mollica, N. R., W. F. Guo, A. L. Cohen, K. F. Huang, G. L. Foster, H. K. Donald and A. R. Solow (2018). *Ocean acidification affects coral growth by reducing skeletal density.* P Natl Acad Sci USA 115(8): 1754-1759.

Morhayim, J., J. van de Peppel, J. A. Demmers, G. Kocer, A. L. Nigg, M. van Driel, H. Chiba and J. P. van Leeuwen (2015). *Proteomic signatures of extracellular vesicles secreted*

by nonmineralizing and mineralizing human osteoblasts and stimulation of tumor cell growth. FASEB J 29(1): 274-285.

Moriya, M. and M. C. Linder (2006). *Vesicular transport and apotransferrin in intestinal iron absorption, as shown in the Caco-2 cell model.* Am J Physiol-Gastr L 290(2): G301-G309.

Mukundan, L., J. I. Odegaard, C. R. Morel, J. E. Heredia, J. W. Mwangi, R. R. Ricardo-Gonzalez, Y. P. Goh, A. R. Eagle, S. E. Dunn, J. U. Awakuni, K. D. Nguyen, L. Steinman, S. A. Michie and A. Chawla (2009). *PPAR-delta senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance.* Nat Med 15(11): 1266-1272.

Murshed, M. (2018). *Mechanism of Bone Mineralization.* Csh Perspect Med 8(12).

Nakatani, H., N. Aoki, Y. Nakagawa, S. Jin-No, K. Aoyama, K. Oshima, S. Ohira, C. Sato, D. Nadano and T. Matsuda (2006). *Weaning-induced expression of a milk-fat globule protein, MFG-E8, in mouse mammary glands, as demonstrated by the analyses of its mRNA, protein and phosphatidylserine-binding activity.* Biochem J 395(1): 21-30.

Narbaitz, R., B. Bastani, N. J. Galvin, V. K. Kapal and D. Z. Levine (1995). *Ultrastructural and immunocytochemical evidence for the presence of polarised plasma membrane H(+)-ATPase in two specialised cell types in the chick embryo chorioallantoic membrane.* J Anat 186 (Pt 2): 245-252.

Navarro, M. and T. Serra (2016). Biomimetic mineralization of ceramics and glasses. *Biomineralization and Biomaterials*. C. Aparicio and M.-P. Ginebra(Eds). Cambridge, Woodhead Publishing**:** 315-338.

Neff, J. M. (1972). *Ultrastructure of the outer epithelium of the mantle in the clam Mercenaria mercenaria in relation to calcification of the shell.* Tissue Cell 4(4): 591-600.

Nemere, I. and A. W. Norman (1988). *1,25-Dihydroxyvitamin D3-mediated vesicular transport of calcium in intestine: time-course studies.* Endocrinology 122(6): 2962-2969.

New, S. E. and E. Aikawa (2013). *Role of extracellular vesicles in de novo mineralization: an additional novel mechanism of cardiovascular calcification.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 33(8): 1753-1758.

Nik, A. B., J. D. Hutcheson and E. Aikawa (2017). *Extracellular Vesicles As Mediators of Cardiovascular Calcification.* Front Cardiovasc Med 4.

Noble, R. C. and M. Cocchi (1990). *Lipid metabolism and the neonatal chicken.* Prog Lipid Res 29(2): 107-140.

Nudelman, F., E. Sonmezler, P. H. Bomans, G. de With and N. A. Sommerdijk (2010). *Stabilization of amorphous calcium carbonate by controlling its particle size.* Nanoscale 2(11): 2436-2439.

Nys, Y., K. Baker and D. E. Lawson (1992). *Estrogen and a calcium flux dependent factor modulate the calbindin gene expression in the uterus of laying hens.* Gen Comp Endocrinol 87(1): 87-94.

Nys, Y. and J. Gautron (2007). Structure and formation of the eggshell. *Bioactive egg compounds*. R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton and R. Schade(Eds). Berlin, Springer**:** 99-102.

Nys, Y., J. Gautron, J. M. Garcia-Ruiz and M. T. Hincke (2004). *Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins.* Cr Palevol 3(6-7): 549-562.

Nys, Y., J. Gautron, M. D. McKee, J. Garcia-Ruiz and M. Hincke (2001). *Biochemical and functional characterisation of eggshell matrix proteins in hens.* Worlds Poult Sci J 57(4): 401-413.

Nys, Y. and N. Guyot (2011). Egg formation and chemistry. *Improving the safety and quality of eggs and egg products*. Y. Nys, M. Bain and F. Van immerseel(Eds). Cambridge, Woodhead publishing. 1**:** 83-132.

Nys, Y., M. T. Hincke, J. L. Arias, J. M. Garcia-Ruiz and S. E. Solomon (1999). *Avian eggshell mineralization.* Poult Avian Biol Rev 10(3): 143-166.

Nys, Y., M. T. Hincke, A. Hernandez-Hernandez, A. B. Rodriguez-Navarro, J. Gomez-Morales, V. Jonchere, J. M. Garcia-Ruiz and J. Gautron (2010). *Eggshell ultrastructure, properties and the process of mineralization: involvement of organic matrix in the eggshell fabric.* Prod Anim 23(2): 143-154.

Nys, Y. and N. Le Roy (2018). Calcium Homeostasis and Eggshell Biomineralization in Female Chicken. *Vitamin D* D. Feldman(Eds). Cambridge, Academic press**:** 361-382.

Nys, Y., S. Mayel-Afshar, R. Bouillon, H. Van Baelen and D. E. Lawson (1989). *Increases in calbindin D 28K mRNA in the uterus of the domestic fowl induced by sexual maturity and shell formation.* Gen Comp Endocrinol 76(2): 322-329.

Nys, Y., C. O. Parkes and M. Thomasset (1986). *Effects of suppression and resumption of shell formation and parathyroid hormone on uterine calcium-binding protein, carbonic anhydrase activity, and intestinal calcium absorption in hens.* Gen Comp Endocrinol 64(2): 293-299.

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 Sci 70(5): 1236-1245.

Ogura, K., K. Nara, Y. Watanabe, K. Kohno, T. Tai and Y. Sanai (1996). *Cloning and expression of cDNA for O-acetylation of GD3 ganglioside.* Biochem Biophys Res Commun 225(3): 932-938.

Oh, S. H., J. W. Kim, Y. Kim, M. N. Lee, M. S. Kook, E. Y. Choi, S. Y. Im and J. T. Koh (2017). *The extracellular matrix protein Edil3 stimulates osteoblast differentiation through the integrin alpha5beta1/ERK/Runx2 pathway.* PLoS One 12(11).

Okumura, H., Y. Kohno, Y. Iwata, H. Mori, N. Aoki, C. Sato, K. Kitajima, D. Nadano and T. Matsuda (2004). *A newly identified zona pellucida glycoprotein, ZPD, and dimeric ZP1 of chicken egg envelope are involved in sperm activation on sperm-egg interaction.* Biochem J 384(Pt 1): 191-199.

Omana, D. A., Y. Liang, N. N. Kav and J. Wu (2011). *Proteomic analysis of egg white proteins during storage.* Proteomics 11(1): 144-153.

Ooishi, T., D. Nadano, T. Matsuda and K. Oshima (2017). *Extracellular vesicle-mediated MFG-E8 localization in the extracellular matrix is required for its integrin-dependent function in mouse mammary epithelial cells.* Genes Cells 22(10): 885-899.

Opsahl Vital, S., C. Gaucher, C. Bardet, P. S. Rowe, A. George, A. Linglart and C. Chaussain (2012). *Tooth dentin defects reflect genetic disorders affecting bone mineralization.* Bone 50(4): 989-997.

Oshima, K., N. Aoki, T. Kato, K. Kitajima and T. Matsuda (2002). *Secretion of a peripheral membrane protein, MFG-E8, as a complex with membrane vesicles.* Eur J Biochem 269(4): 1209-1218.

Oshima, K., N. Aoki, M. Negi, M. Kishi, K. Kitajima and T. Matsuda (1999). *Lactation-dependent expression of an mRNA splice variant with an exon for a multiply O-glycosylated domain of mouse milk fat globule glycoprotein MFG-E8.* Biochem Bioph Res Co 254(3): 522-528.

Oshima, K., T. Yasueda, S. Nishio and T. Matsuda (2014). MFG-E8: Origin, Structure, Expression, Functions and Regulation. *MFG-E8 and Inflammation.* P. Wang(Eds). Dordrecht, Springer 1-31.

Otzen, D. E., K. Blans, H. B. Wang, G. E. Gilbert and J. T. Rasmussen (2012). *Lactadherin binds to phosphatidylserine-containing vesicles in a two-step mechanism sensitive to vesicle size and composition.* Bba-Biomembranes 1818(4): 1019-1027.

Packard, M. J. and R. S. Seymour (1997). Evolution of the amniote egg. *Amniote Origins*. S. S. Sumida and K. L. M. Martin(Eds). Cambridge, Academic Press**:** 265–290

Palmiter, R. D. (1972). *Regulation of protein synthesis in chick oviduct. I. Independent regulation of ovalbumin, conalbumin, ovomucoid, and lysozyme induction.* J Biol Chem 247(20): 6450-6461.

Panheleux, M., M. Bain, M. S. Fernandez, I. Morales, J. Gautron, J. L. Arias, S. E. Solomon, M. Hincke and Y. Nys (1999a). *Organic matrix composition and ultrastructure of eggshell: a comparative study.* Brit Poultry Sci 40(2): 240-252.

Panheleux, M., O. Kalin, J. Gautron and Y. Nys (1999b). *Features of eggshell formation in guinea fowl: kinetics of shell deposition, uterine protein secretion and uterine histology.* Br Poult Sci 40(5): 632-643.

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.* Poult Sci 79(4): 580-588.

Pathan, M., P. Fonseka, S. V. Chitti, T. Kang, R. Sanwlani, J. Van Deun, A. Hendrix and S. Mathivanan (2019). *Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles.* Nucleic Acids Res 47(D1): D516-D519.

Penta, K., J. A. Varner, L. Liaw, C. Hidai, R. Schatzman and T. Quertermous (1999). *Del1 induces integrin signaling and angiogenesis by ligation of alpha V beta 3.* J Biol Chem 274(16): 11101-11109.

Pereira, L., M. D'Alessio, F. Ramirez, J. R. Lynch, B. Sykes, T. Pangilinan and J. Bonadio (1993). *Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome.* Hum Mol Genet 2(10): 1762.

Petersen, J. and C. Tyler (1966). *The strength of guinea fowl (Numida meleagris) egg shells.* Brit Poultry Sci 7(4): 291-296.

Pines, M., V. Knopov and A. Bar (1995). *Involvement of osteopontin in egg shell formation in the laying chicken.* Matrix Biol 14(9): 765-771.

Pipich, V., M. Balz, S. E. Wolf, W. Tremel and D. Schwahn (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(21): 6879-6892.

Podlaha, O., D. M. Webb and J. Zhang (2006). *Accelerated evolution and loss of a domain of the sperm-egg-binding protein SED1 in ancestral primates.* Mol Biol Evol 23(10): 1828-1831.

Politi, Y., T. Arad, E. Klein, S. Weiner and L. Addadi (2004). *Sea urchin spine calcite forms via a transient amorphous calcium carbonate phase.* Science 306(5699): 1161-1164.

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.

Politi, Y., R. A. Metzler, M. Abrecht, B. Gilbert, F. H. Wilt, I. Sagi, L. Addadi, S. Weiner and P. U. P. A. Gilbert (2008). *Transformation mechanism of amorphous calcium carbonate into calcite in the sea urchin larval spicule (vol 105, pg 17362, 2008).* P Natl Acad Sci USA 105(50): 20045-20045.

Pomatto, M. A. C., C. Gai, B. Bussolati and G. Camussi (2017). *Extracellular Vesicles in Renal Pathophysiology.* Front Mol Biosci 4.

Qiu, N., W. Liu, M. Ma, L. Zhao and Y. Li (2013). *Differences between fertilized and unfertilized chicken egg white proteins revealed by 2-dimensional gel electrophoresis-based proteomic analysis.* Poultry Sci 92(3): 782-786.

Quintana, C., D. Sandoz, M. C. Delaunay, A. Rivière and P. Baoumati (1978). *Coquille de l'oeuf de caille: Étude ultrastructurale et cristallographique.* Calcif Tissue Res 25(1): 145-159.

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.* Mol Biol Evol 30(9): 2099-2112.

Rao, A., J. Seto, J. K. Berg, S. G. Kreft, M. Scheffner and H. Colfen (2013). *Roles of larval sea urchin spicule SM50 domains in organic matrix self-assembly and calcium carbonate mineralization.* J Struct Biol 183(2): 205-215.

Rao, Z., P. Handford, M. Mayhew, V. Knott, G. G. Brownlee and D. Stuart (1995). *The Structure of a Ca2+-Binding Epidermal Growth Factor-Like Domain - Its Role in Protein-Protein Interactions.* Cell 82(1): 131-141.

Rath, N. C., R. Liyanage, S. K. Makkar and J. O. Lay, Jr. (2016). *Protein profiles of hatchery egg shell membrane.* Proteome Sci 15: 4.

Raymond, A., M. A. Ensslin and B. D. Shur (2009). *SED1/MFG-E8: A Bi-Motif Protein That Orchestrates Diverse Cellular Interactions.* J Cell Biochem 106(6): 957-966.

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.* Adv Funct Mater 13(6): 480-486.

Reggi, M., S. Fermani, V. Landi, F. Sparla, E. Caroselli, F. Gizzi, Z. Dubinsky, O. Levy, J. P. Cuif, Y. Dauphin, S. Goffredo and G. Falini (2014). *Biomineralization in Mediterranean Corals: The Role of the Intraskeletal Organic Matrix.* Cryst Growth Des 14(9): 4310-4320.

Rehault-Godbert, S., F. Baron, S. Mignon-Grasteau, V. Labas, M. Gautier, M. T. Hincke and Y. Nys (2010). *Effect of temperature and time of storage on protein stability and anti-salmonella activity of egg white.* J Food Prot 73(9): 1604-1612.

Rehault-Godbert, S. and N. Guyot (2017). Vitellogenesis and yolk proteins, Birds. *Encyclopedia of Reproduction*. P. Swanson and M. K. Skinner(Eds). Amsterdam, Academic press**:** 278-284.

Rehault-Godbert, S., N. Guyot and Y. Nys (2019). *The Golden Egg: Nutritional Value, Bioactivities, and Emerging Benefits for Human Health.* Nutrients 11(3).

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.* Woodhead Publ Food S(213): 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.* J Biol Chem 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.* J Biol Chem 279(39): 40876-40881.

Richards, J. F. and M. H. Swanson (1965). *Relationship of Egg Shape to Shell Strength.* Poultry Sci 44(6): 1555-1558.

Robertson, W. G. (1982). The solubility concept. *Biological Mineralization and Demineralization*. G. H. Nancollas(Eds). Berlin, Springer-Verlag**:** 5-21.

Robey, P. G. (2002). Bone Matrix Proteoglycans and Glycoproteins. *Principles of Bone Biology*. J. Bilezikian, L. Raisz and T. J. Martin(Eds). San Diego, Academic press. 1**:** 225-237.

Rodriguez-Blanco, J. D., S. Shaw, P. Bots, T. Roncal-Herrero and L. G. Benning (2012). *The role of pH and Mg on the stability and crystallization of amorphous calcium carbonate.* J Alloy Compd 536: S477-S479.

Rodríguez-Navarro, A., N. Dominguez-Gasca, D. Athanasiadou, N. Le Roy, A. González-Segura, L. Lee, R. R. Chromik, N. Reznikov, M. T. Hincke, M. D. McKee, Y. Nys and J. Gautron (soumis). *How organic matrix controls Guinea fowl eggshell structural organization at different levels to provide exceptional mechanical properties.* Nat Commun.

Rodriguez-Navarro, A. and J. M. Garcia-Ruiz (2000). *Model of textural development of layered crystal aggregates.* Eur J Mineral 12(3): 609-614.

Rodriguez-Navarro, A., O. Kalin, Y. Nys and J. M. Garcia-Ruiz (2002). *Influence of the microstructure on the shell strength of eggs laid by hens of different ages.* Br Poult Sci 43(3): 395-403.

Rodriguez-Navarro, A. B. (2007). *Rapid quantification of avian eggshell microstructure and crystallographic-texture using two-dimensional X-ray diffraction.* Brit Poultry Sci 48(2): 133-144.

Rodriguez-Navarro, A. B., N. Dominguez-Gasca, A. Munoz and M. Ortega-Huertas (2013). *Change in the chicken eggshell cuticle with hen age and egg freshness.* Poultry Sci 92(11): 3026-3035.

Rodriguez-Navarro, A. B., P. Marie, Y. Nys, M. T. Hincke and J. Gautron (2015). *Amorphous calcium carbonate controls avian eggshell mineralization: A new paradigm for understanding rapid eggshell calcification.* J Struct Biol 190(3): 291-303.

Rodriguez-Navarro, A. B. and C. S. Romanek (2002). *Mineral fabrics analysis using a low-cost universal stage for X-ray diffractometry.* Eur J Mineral 14(5): 987-992.

Rodriguez-Navarro, A. B., A. Yebra, Y. Nys, C. Jimenez-Lopez and J. M. Garcia-Ruiz (2007). *Analysis of avian eggshell microstructure using X-ray area detectors.* Eur J Mineral 19(3): 391-398.

Rojas, E., N. Arispe, H. T. Haigler, A. L. Burns and H. B. Pollard (1992). *Identification of Annexins as Calcium Channels in Biological-Membranes.* Bone Miner 17(2): 214-218.

Rome, H. and P. Le Roy (2016). *Chromosomal regions influencing egg production and egg quality traits in hens.* Inra Prod Anim 29(2): 117-127.

Romer, A. S. (1957). *Origin of the amniote egg.* The Scientific Monthly 85(2): 57-63.

Rose-Martel, M., J. W. Du and M. T. Hincke (2012). *Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle.* J Proteomics 75(9): 2697-2706.

Rose-Martel, M., S. Smiley and M. T. Hincke (2015). *Novel identification of matrix proteins involved in calcitic biomineralization.* J Proteomics 116: 81-96.

Rose, M. L. H. and M. T. Hincke (2009). *Protein constituents of the eggshell: eggshell-specific matrix proteins.* Cell Mol Life Sci 66(16): 2707-2719.

Rosenthal, A. K., C. M. Gohr, J. Ninomiya and B. T. Wakim (2011). *Proteomic Analysis of Articular Cartilage Vesicles From Normal and Osteoarthritic Cartilage.* Arthritis Rheum-Us 63(2): 401-411.

Sah, N., D. L. Kuehu, V. S. Khadka, Y. Deng, K. Peplowska, R. Jha and B. Mishra (2018). *RNA sequencing-based analysis of the laying hen uterus revealed the novel genes and biological pathways involved in the eggshell biomineralization.* Sci Rep-Uk 8(1): 16853.

Saito, N. and K. Shimada (1988). *Ovarian prostaglandin levels at the midsequence oviposition, the terminal ovipostion and the first ovulation of a sequence in the hen (Gallus domesticus).* J Poult Sci 25(5): 296-304.

Sasaki, O., S. Odawara, H. Takahashi, K. Nirasawa, Y. Oyamada, R. Yamamoto, K. Ishii, Y. Nagamine, H. Takeda, E. Kobayashi and T. Furukawa (2004). *Genetic mapping of*

quantitative trait loci affecting body weight, egg character and egg production in F2 intercross chickens. Anim Genet 35(3): 188-194.

Sauer, G. R., B. R. Genge, L. N. Wu and J. E. Donachy (1994). *A facilitative role for carbonic anhydrase activity in matrix vesicle mineralization.* Bone Miner 26(1): 69-79.

Saunders-Blades, J. L., J. L. MacIsaac, D. R. Korver and D. M. Anderson (2009). *The effect of calcium source and particle size on the production performance and bone quality of laying hens.* Poult Sci 88(2): 338-353.

Sauveur, B. and M. De revier (1988). *Reproduction des volailles et production d'oeufs* Paris, INRA.

Savage, C. R., Jr., T. Inagami and S. Cohen (1972). *The primary structure of epidermal growth factor.* J Biol Chem 247(23): 7612-7621.

Schurpf, T., Q. Chen, J. H. Liu, R. Wang, T. A. Springer and J. H. Wang (2012). *The RGD finger of Del-1 is a unique structural feature critical for integrin binding.* Faseb Journal 26(8): 3412-3420.

Schwahn, D., M. Balz and W. Tremel (2004). *Crystallization of the CaCO(3) mineral in the presence of the protein ovalbumin.* Physica B 350(1-3): E947-E949.

Scott, T. A., R. Kampen and F. G. Silversides (1999). *The effect of phosphorus, phytase enzyme, and calcium on the performance of layers fed corn-based diets.* Poult Sci 78(12): 1742-1749.

Sedlyarov, V., R. Eichner, E. Girardi, P. Essletzbichler, U. Goldmann, P. Nunes-Hasler, I. Srndic, A. Moskovskich, L. X. Heinz, F. Kartnig, J. W. Bigenzahn, M. Rebsamen, P. Kovarik, N. Demaurex and G. Superti-Furga (2018). *The Bicarbonate Transporter SLC4A7 Plays a Key Role in Macrophage Phagosome Acidification.* Cell Host Microbe 23(6): 766-774.

Selandersunnerhagen, M., M. Ullner, E. Persson, O. Teleman, J. Stenflo and T. Drakenberg (1992). *How an Epidermal Growth-Factor (Egf)-Like Domain Binds Calcium - High-Resolution Nmr Structure of the Calcium Form of the Nh2-Terminal Egf-Like Domain in Coagulation Factor-X.* J Biol Chem 267(27): 19642-19649.

Shaltiel, G., E. Bar-David, O. Meiron, E. Waltman, E. Shechter, E. Aflalo, D. Stepensky, A. Berman, B. Martin, C. Weaver and A. Sagi (2013). *Bone loss prevention in ovariectomized rats using stable amorphous calcium carbonate.* Health 5: 18-29.

Shao, C., B. Jin, Z. Mu, H. Lu, Y. Zhao, Z. Wu, L. Yan, Z. Zhang, Y. Zhou, H. Pan, Z. Liu and R. Tang (2019). *Repair of tooth enamel by a biomimetic mineralization frontier ensuring epitaxial growth.* Sci Adv 5(8).

Shao, C., V. A. Novakovic, J. F. Head, B. A. Seaton and G. E. Gilbert (2008). *Crystal structure of lactadherin C2 domain at 1.7A resolution with mutational and computational analyses of its membrane-binding motif.* J Biol Chem 283(11): 7230-7241.

Shapiro, I. M., W. J. Landis and M. V. Risbud (2015). *Matrix vesicles: Are they anchored exosomes?* Bone 79: 29-36.

Shi, J., C. W. Heegaard, J. T. Rasmussen and G. E. Gilbert (2004). *Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-L-serine and increased curvature.* Biochim Biophys Acta 1667(1): 82-90.

Shibata, S., K. Fukada, H. Imai, T. Abe and Y. Yamashita (2003). *In situ hybridization and immunohistochemistry of versican, aggrecan and link protein, and histochemistry of hyaluronan in the developing mouse limb bud cartilage.* J Anat 203(4): 425-432.

Shin, J., T. Maekawa, T. Abe, E. Hajishengallis, K. Hosur, K. Pyaram, I. Mitroulis, T. Chavakis and G. Hajishengallis (2015). *DEL-1 restrains osteoclastogenesis and inhibits inflammatory bone loss in nonhuman primates.* Sci Transl Med 7(307).

Silvestre, J. S., C. Thery, G. Hamard, J. Boddaert, B. Aguilar, A. Delcayre, C. Houbron, R. Tamarat, O. Blanc-Brude, S. Heeneman, M. Clergue, M. Duriez, R. Merval, B. Levy,

A. Tedgui, S. Amigorena and Z. Mallat (2005). *Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization.* Nat Med 11(5): 499-506.

Silyn-Roberts, H. and R. M. Sharp (1986). *Crystal-Growth and the Role of the Organic Network in Eggshell Biomineralization.* Proc R Soc Ser B-Bio 227(1248): 303.

Sinningen, K., E. Albus, S. Thiele, S. Grossklaus, T. Kurth, M. C. Udey, T. Chavakis, L. C. Hofbauer and M. Rauner (2015). *Loss of milk fat globule-epidermal growth factor 8 (MFG-E8) in mice leads to low bone mass and accelerates ovariectomy-associated bone loss by increasing osteoclastogenesis.* Bone 76: 107-114.

Solomon, S. E. (2010). *The eggshell: strength, structure and function.* Br Poult Sci 51 Suppl 1: 52-59.

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.* J Biol Chem 278(23): 21083-21091.

Stechschulte, D. J., Jr., D. C. Morris, S. F. Silverton, H. C. Anderson and H. K. Vaananen (1992). *Presence and specific concentration of carbonic anhydrase II in matrix vesicles.* Bone Miner 17(2): 187-191.

Stubbs, J. D., C. Lekutis, K. L. Singer, A. Bui, D. Yuzuki, U. Srinivasan and G. Parry (1990). *Cdna Cloning of a Mouse Mammary Epithelial-Cell Surface Protein Reveals the Existence of Epidermal Growth Factor-Like Domains Linked to Factor-Viii-Like Sequences.* P Natl Acad Sci USA 87(21): 8417-8421.

Sun, C., G. 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.

Sun, J. C., X. T. Liang, K. Pan, H. Wang, J. J. Zhao, J. J. Li, H. Q. Ma, Y. B. Chen and J. C. Xia (2010). *High expression level of EDIL3 in HCC predicts poor prognosis of HCC patients.* World J Gastroenterol 16(36): 4611-4615.

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.

Sviben, S., A. Gal, M. A. Hood, L. Bertinetti, Y. Politi, M. Bennet, P. Krishnamoorthy, A. Schertel, R. Wirth, A. Sorrentino, E. Pereiro, D. Faivre and A. Scheffel (2016). *A vacuole-like compartment concentrates a disordered calcium phase in a key coccolithophorid alga.* Nat Commun 7: 11228.

Takahashi, H., O. Sasaki, K. Nirasawa and T. Furukawa (2010). *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(5): 541-544.

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.* Anim Genet 40(5): 779-782.

Takeuchi, Y., K. Nishimura, N. Aoki, T. Adachi, C. Sato, K. Kitajima and T. Matsuda (1999). *A 42-kDa glycoprotein from chicken egg-envelope, an avian homolog of the ZPC family glycoproteins in mammalian Zona pellucida. Its first identification, cDNA cloning and granulosa cell-specific expression.* Eur J Biochem 260(3): 736-742.

Taylor, M. R., J. R. Couto, C. D. Scallan, R. L. Ceriani and J. A. Peterson (1997). *Lactadherin (formerly BA46), a membrane-associated glycoprotein expressed in human milk and breast carcinomas, promotes Arg-Gly-Asp (RGD)-dependent cell adhesion.* DNA Cell Biol 16(7): 861-869.

Teghidet, H. (2012). *Etude de la cristallisation contrôlée de la calcite par voie électrochimique. Effet des ions étrangers au système calcocarbonique sur la nucléation-croissance de l acalcite*. PhD thesis, Université Perre et Marie Curie-Paris VI.

Tester, C. C., R. E. Brock, C. H. Wu, M. R. Krejci, S. Weigand and D. Joester (2011). *In vitro synthesis and stabilization of amorphous calcium carbonate (ACC) nanoparticles within liposomes.* Crystengcomm 13(12): 3975-3978.

Thery, C., M. Ostrowski and E. Segura (2009). *Membrane vesicles as conveyors of immune responses.* Nat Rev Immunol 9(8): 581-593.

Thery, C., A. Regnault, J. Garin, J. Wolfers, L. Zitvogel, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo and S. Amigorena (1999). *Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes: Selective accumulation of the heat shock protein hsc73.* J Cell Biol 147(3): 599-610.

Thouverey, C., A. Malinowska, M. Balcerzak, A. Strzelecka-Kiliszek, R. Buchet, M. Dadlez and S. Pikula (2011). *Proteomic characterization of biogenesis and functions of matrix vesicles released from mineralizing human osteoblast-like cells.* J Proteomics 74(7): 1123-1134.

Tobler, D. J., J. D. R. Blanco, K. Dideriksen, K. K. Sand, N. Bovet, L. G. Benning and S. L. S. Stipp (2014). *The effect of aspartic acid and glycine on amorphous calcium carbonate (ACC) structure, stability and crystallization.* Proced Earth Plan Sc 10: 143-148.

Travel, A., Y. Nys and E. Lopes (2010). *Facteurs physiologiques et environnementaux influençant la production et la qualité de l'œuf.* Inra Prod Anim 23(2): 155-166.

Tuan, R. S., W. A. Scott and Z. A. Cohn (1978). *Calcium-binding protein of the chick chorioallantoic membrane. I. Immunohistochemical localization.* J Cell Biol 77(3): 743-751.

Tuan, R. S. and J. Zrike (1978). *Functional involvement of carbonic anhydrase in calcium transport of the chick chorioallantoic membrane.* Biochem J 176(1): 67-74.

Tuiskula-Haavisto, M., M. Honkatukia, R. Preisinger, M. Schmutz, D. J. de Koning, W. H. Wei and J. Vilkki (2011). *Quantitative trait loci affecting eggshell traits in an F(2) population.* Anim Genet 42(3): 293-299.

Tuiskula-Haavisto, M., M. Honkatukia, J. Vilkki, D. J. de Koning, N. F. Schulman and A. Maki-Tanila (2002). *Mapping of quantitative trait loci affecting quality and production traits in egg layers.* Poultry Sci 81(7): 919-927.

Tullet, S. G. (1987). Egg shell formation and quality. *Egg quality current problems and recent advances*. R. G. Wells and C. G. Belyavin(Eds). London, Butterworths**:** 123-146.

Vaisman, N., G. Shaltiel, M. Daniely, O. E. Meiron, A. Shechter, S. A. Abrams, E. Niv, Y. Shapira and A. Sagi (2014). *Increased calcium absorption from synthetic stable amorphous calcium carbonate: double-blind randomized crossover clinical trial in postmenopausal women.* J Bone Miner Res 29(10): 2203-2209.

Van Niel, G., G. D'Angelo and G. Raposo (2018). *Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles.* Nat Rev Mol Cell Bio 19(4): 213-228.

Vidavsky, N., S. Addadi, J. Mahamid, E. Shimoni, D. Ben-Ezra, M. Shpigel, S. Weiner and L. Addadi (2014). *Initial stages of calcium uptake and mineral deposition in sea urchin embryos.* P Natl Acad Sci USA 111(1): 39-44.

Vidavsky, N., A. Masic, A. Schertel, S. Weiner and L. Addadi (2015). *Mineral-bearing vesicle transport in sea urchin embryos.* J Struct Biol 192(3): 358-365.

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.

Waclawek, M., R. Foisner, J. Nimpf and W. J. Schneider (1998). *The chicken homologue of zona pellucida protein-3 is synthesized by granulosa cells.* Biol Reprod 59(5): 1230-1239.

Wang, J., J. Gao, J. Xie, X. Zheng, Y. Yan, S. Li, L. Xie and R. Zhang (2016a). *Cloning and mineralization-related functions of the calponin gene in Chlamys farreri.* Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 201: 53-58.

Wang, X., B. C. Ford, C. A. Praul and R. M. Leach, Jr. (2002). *Collagen X expression in oviduct tissue during the different stages of the egg laying cycle.* Poult Sci 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.* J Phys Chem B 113(26): 8975-8982.

Wang, X. Q., H. L. Sun, Y. Q. Xia, C. X. Chen, H. Xu, H. H. Shan and J. R. Lu (2009b). *Lysozyme mediated calcium carbonate mineralization.* J Colloid Interf Sci 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 CaCO3 Precipitation during in Vitro Biomineralization.* J Phys Chem B 114(16): 5301-5308.

Wang, Z., T. Boyko, M. C. Tran, M. LaRussa, N. Bhatia, V. Rashidi, M. T. Longaker and G. P. Yang (2018). *DEL1 protects against chondrocyte apoptosis through integrin binding.* J Surg Res 231: 1-9.

Wang, Z., M. C. Tran, N. J. Bhatia, A. W. Hsing, C. Chen, M. F. LaRussa, E. Fattakhov, V. Rashidi, K. Y. Jang, K. J. Choo, X. Nie, J. A. Mathy, M. T. Longaker, R. H. Dauskardt, J. A. Helms and G. P. Yang (2016b). *Del1 Knockout Mice Developed More Severe Osteoarthritis Associated with Increased Susceptibility of Chondrocytes to Apoptosis.* PLoS One 11(8).

Waqas, M. Y., P. Yang, N. Ahmed, Q. Zhang, T. Liu, Q. Li, L. Hu, C. Hong and Q. Chen (2016). *Characterization of the ultrastructure in the uterovaginal junction of the hen.* Poultry Sci 95(9): 2112-2119.

Wasserman, R. H., C. A. Smith, C. M. Smith, M. E. Brindak, C. S. Fullmer, L. Krook, J. T. Penniston and R. Kumar (1991). *Immunohistochemical localization of a calcium pump and calbindin-D28k in the oviduct of the laying hen.* Histochemistry 96(5): 413-418.

Wasserman, R. H. and A. N. Taylor (1966). *Vitamin d3-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa.* Science 152(3723): 791-793.

Watabe, N. and R. J. Kingsley (1989). Extra-, Inter-, and Intracellular Mineralization in Invertebrates and Algae. *Origin, Evolution, and Modern Aspects of Biomineralization in Plants and Animals.* R. E. Crick(Eds). New York, Springer**:** 209-223.

Watanabe, T., R. Totsuka, S. Miyatani, S. Kurata, S. Sato, I. Katoh, S. Kobayashi and Y. Ikawa (2005). *Production of the long and short forms of MFG-E8 by epidermal keratinocytes.* Cell Tissue Res 321(2): 185-193.

Weiner, S. and L. Addadi (1997). *Design strategies in mineralized biological materials.* J Mater Chem 7(5): 689-702.

Weiner, S. and L. Addadi (2011). *Crystallization Pathways in Biomineralization.* Annu Rev Mater Res 41: 21-40.

Weiner, S. and P. M. Dove (2003). *An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect.* Rev Mineral Geochem 54: 1-29.

Weiss, I. M., N. Tuross, L. Addadi and S. Weiner (2002). *Mollusc larval shell formation: Amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite.* J Exp Zool 293(5): 478-491.

Wheeler, A. P., J. W. George and C. A. Evans (1981). *Control of calcium carbonate nucleation and crystal growth by soluble matrx of oyster shell.* Science 212(4501): 1397-1398.

Whitehead, C. C. and R. H. Fleming (2000). *Osteoporosis in cage layers.* Poult Sci 79(7): 1033-1041.

Wolc, A., J. Arango, T. Jankowski, I. Dunn, P. Settar, J. E. Fulton, N. P. O'Sullivan, R. Preisinger, R. L. Fernando, D. J. Garrick and J. C. Dekkers (2014). *Genome-wide association study for egg production and quality in layer chickens.* J Anim Breed Genet 131(3): 173-182.

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.* J Am Chem Soc 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.* Dev Biol 104(1): 28-36.

Wu, L. N., B. R. Genge, G. R. Sauer and R. E. Wuthier (1996). *Characterization and reconstitution of the nucleational complex responsible for mineral formation by growth plate cartilage matrix vesicles.* Connect Tissue Res 35(1-4): 309-315.

Wu, L. N., B. R. Genge and R. E. Wuthier (2009). *Differential effects of zinc and magnesium ions on mineralization activity of phosphatidylserine calcium phosphate complexes.* J Inorg Biochem 103(7): 948-962.

Wuthier, R. E. and G. F. Lipscomb (2011). *Matrix vesicles: structure, composition, formation and function in calcification.* Front Biosci-Landmrk 16: 2812-2902.

Wyburn, G. M., H. S. Johnston, M. H. Draper and M. F. Davidson (1973). *The ultrastructure of the shell forming region of the oviduct and the development of the shell of Gallus domesticus.* Q J Exp Physiol Cogn Med Sci 58(2): 143-151.

Xia, H. P., J. X. Chen, M. Shi, H. J. Gao, K. Sekar, V. P. Seshachalam, L. L. P. J. Ooi and K. M. Hui (2015). *EDIL3 is a novel regulator of epithelial-mesenchymal transition controlling early recurrence of hepatocellular carcinoma.* J Hepatol 63(4): 863-873.

Xiao, Z., C. E. Camalier, K. Nagashima, K. C. Chan, D. A. Lucas, M. J. de la Cruz, M. Gignac, S. Lockett, H. J. Issaq, T. D. Veenstra, T. P. Conrads and G. R. Beck, Jr. (2007). *Analysis of the extracellular matrix vesicle proteome in mineralizing osteoblasts.* J Cell Physiol 210(2): 325-335.

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.* Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 147(2): 172-177.

Yamaguchi, H., J. Takagi, T. Miyamae, S. Yokota, T. Fujimoto, S. Nakamura, S. Ohshima, T. Naka and S. Nagata (2008). *Milk fat globule EGF factor 8 in the serum of human patients of systemic lupus erythematosus.* J Leukoc Biol 83(5): 1300-1307.

Yan, Y., D. Yang, X. Yang, C. Liu, J. Xie, G. Zheng, L. Xie and R. Zhang (2017). *A Novel Matrix Protein, PfY2, Functions as a Crucial Macromolecule during Shell Formation.* Sci Rep 7(1): 6021.

Yang, J. H., J. F. Hou, C. Farquharson, Z. L. Zhou, Y. F. Deng, L. Wang and Y. Yu (2011). *Localisation and expression of TRPV6 in all intestinal segments and kidney of laying hens.* Brit Poultry Sci 52(4): 507-516.

Yang, J. H., Z. H. Zhao, J. F. Hou, Z. L. Zhou, Y. F. Deng and J. J. Dai (2013). *Expression of TRPV6 and CaBP-D28k in the egg shell gland (uterus) during the oviposition cycle of the laying hen.* Brit Poult Sci 54(3): 398-406.

Yang, L., Y. Zhang and F. Z. Cui (2007a). *Two types of mineral-related matrix vesicles in the bone mineralization of zebrafish.* Biomed Mater 2(1): 21-25.

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 (2007b).

Differentially expressed transcripts in shell glands from low and high egg production strains of chickens using cDNA microarrays. Anim Reprod Sci 101(1-2): 113-124.

Yao, J. F., Z. X. Chen, G. Y. Xu, X. L. Wang, Z. H. Ning, J. X. Zheng, L. J. Qu and N. Yang (2010). *Low-density lipoprotein receptor-related protein 8 gene association with egg traits in dwarf chickens.* Poult Sci 89(5): 883-886.

Ye, H., B. H. Li, V. Subramanian, B. H. Choi, Y. Liang, A. Harikishore, G. Chakraborty, K. Baek and H. S. Yoon (2013). *NMR solution structure of C2 domain of MFG-E8 and insights into its molecular recognition with phosphatidylserine.* Bba-Biomembranes 1828(3): 1083-1093.

Yi, Y. S. (2016). *Functional Role of Milk Fat Globule-Epidermal Growth Factor VIII in Macrophage-Mediated Inflammatory Responses and Inflammatory/Autoimmune Diseases.* Mediators Inflamm 2016: 5628486.

Yin, Z., L. Lian, F. Zhu, Z. H. Zhang, M. Hincke, N. Yang and Z. C. Hou (2019). *The transcriptome landscapes of ovary and three oviduct segments during chicken (Gallus gallus) egg formation.* Genomics.

Zhang, G., X. X. Yang, P. M. Leung, L. S. He, T. Y. Chan, G. Y. Yan, Y. Zhang, J. Sun, Y. Xu and P. Y. Qian (2016). *Secretory locations of SIPC in Amphibalanus amphitrite cyprids and a novel function of SIPC in biomineralization.* Sci Rep 6: 29376.

Zhang, Q., F. Zhu, L. Liu, C. W. Zheng, H. Wang de, Z. C. Hou and Z. H. Ning (2015). *Integrating transcriptome and genome re-sequencing data to identify key genes and mutations affecting chicken eggshell qualities.* PLoS One 10(5).

Zhao, X. G., W. Shi, Y. Han, S. X. Liu, C. Guo, W. D. Fu, X. L. Chai and G. X. Liu (2017). *Ocean acidification adversely influences metabolism, extracellular pH and calcification of an economically important marine bivalve, Tegillarca granosa.* Mar Environ Res 125: 82-89.

Zheng, X., L. Xiang, J. Liang, L. Xie and R. Zhang (2016). *Pf-Sp8/9, a novel member of the specificity protein family in Pinctada fucata, potentially participates in biomineralization.* J Struct Biol 196(2): 119-126.

Zhong, J. P., B. Eliceiri, D. Stupack, K. Penta, G. Sakamoto, T. Quertermous, M. Coleman, N. Boudreau and J. A. Varner (2003). *Neovascularization of ischemic tissues by gene delivery of the extracellular matrix protein Del-1.* J Clin Invest 112(1): 30-41.

Zhou, X., Y. Cui, J. Luan, X. Zhou, G. Zhang, X. Zhang and J. Han (2013). *Label-free quantification proteomics reveals novel calcium binding proteins in matrix vesicles isolated from mineralizing Saos-2 cells.* Biosci Trends 7(3): 144-151.

Zhu, F., F. Zhang, M. Hincke, Z. T. Yin, S. R. Chen, N. Yang and Z. C. Hou (2019). *iTRAQ-Based Quantitative Proteomic Analysis of Duck Eggshell During Biomineralization.* Proteomics: e1900011.

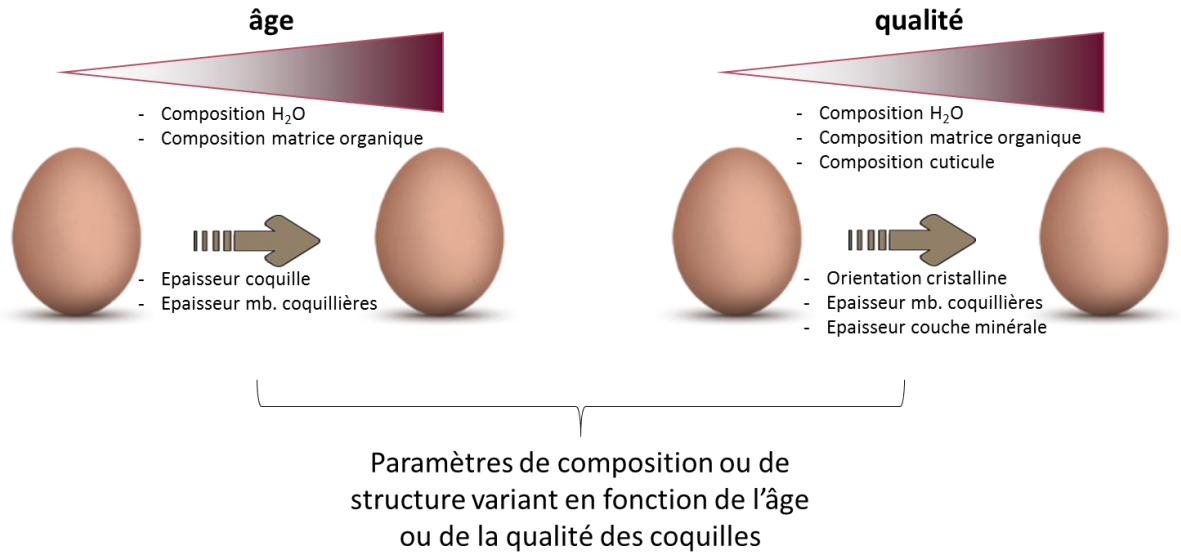
Zhu, W. J., J. P. Lin, C. H. Cai and Y. Q. Lu (2013). *Biomimetic mineralization of calcium carbonate mediated by a polypeptide-based copolymer.* J Mater Chem B 1(6): 841-849.

Zhu, X. L. and W. S. Sly (1990). *Carbonic anhydrase IV from human lung. Purification, characterization, and comparison with membrane carbonic anhydrase from human kidney.* J Biol Chem 265(15): 8795-8801.

Ziegler, A. (1994). *Ultrastructure and Electron Spectroscopic Diffraction Analysis of the Sternal Calcium Deposits of Porcellio Scaber Latr (Isopoda, Crustacea).* J Struct Biol 112(2): 110-116.

Zou, X. L., H. Q. Qiao, X. A. Jiang, X. S. Dong, H. C. Jiang and X. Y. Sun (2008). *Downregulation of developmentally regulated endothelial cell locus-1 inhibits the growth of colon cancer.* J Biomed Sci 16.

IX. *Annexes*



Annexe 1. Résumé des paramètres qui affichent des variations significatives en fonction de l'âge ou de la qualité des coquilles. Ces paramètres pourraient influencer les capacités mécaniques des coquilles. Ces résultats ont été obtenus lors de l'étude structurale des coquilles réalisée à Grenade. Un article détaillant l'ensemble des résultats obtenus est présenté ci-après (**Annexe 2**).

Annexe 2. Article présentant les résultats obtenus au cours de la mobilité de 3 mois et demi dans le département de Minéralogie et Pétrologie de l'université de Grenade en Espagne. L'objectif de ces travaux était d'étudier les paramètres de composition et de structure influencant les propriétés mécaniques des coquilles en fonction de l'âge et de la qualité.

Paramètres structuraux influençant les propriétés mécaniques des coquilles d'œufs de poules sélectionnées

Alejandro Rodriguez-Navarro[1] and Lilian Stapane[2], Christian Grenier[1], Rocio Roman[1], Joël Gautron[2]

[1]*Departmento de Mineralogia y Petrologia, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain*

[2]*BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France*

Mots clefs : poule, qualité de coquille, âge, propriétés mécaniques, microstructure, ultrastructure, composition, matrice organique

Introduction

La qualité sanitaire est l'un des enjeux majeurs de la filière œuf. La coquille constitue la barrière physique de l'œuf qui permet de maintenir son intégrité (Nys *et al.* 2004, Nys et Gautron 2007, Hincke *et al.* 2012). Chaque année, en France, un milliard d'œufs sont déclassés pour défauts de coquille afin d'assurer la sécurité alimentaire des consommateurs. Cela entraine des pertes économiques importantes pour la filière. Dans ce contexte, la compréhension des paramètres influençant les propriétés mécaniques de l'œuf et donc la qualité de ce dernier est un élément clef. La coquille d'œuf résiste à 3-4 kg de pression statique (Hincke *et al.* 2011). L'épaisseur et la quantité de coquille sont des paramètres prépondérants de la qualité de coquille (Nys *et al.* 2010). Environ, 60 % de la variabilité de qualité coquille est liée à l'épaisseur et la densité (Richards et Swanson 1965). Toutefois, cette variabilité est également liée à la microstructure de la coquille et la composition de sa matrice organique (Rodriguez-Navarro *et al.* 2002, Rodriguez-Navarro 2007, Nys *et al.* 2010). La taille des cristaux, leur orientation, leur nombre mais aussi la composition de la matrice organique de la coquille, sont des paramètres qui vont influencer la texture et par conséquent les paramètres mécaniques de la coquille (Panheleux *et al.* 1999a, Panheleux *et al.* 2000, Rodriguez-Navarro *et al.* 2002, Ahmed *et al.* 2005, Rodriguez-Navarro 2007). L'âge de la poule influence fortement les propriétés mécaniques de la coquille. En effet, la solidité de la coquille diminue avec l'âge et cela est corrélé à une réduction de l'épaisseur de coquille ainsi qu'une modification de la texture cristallographique (Rodriguez-Navarro *et al.* 2002). Les propriétés mécaniques des coquilles de vieilles poules peuvent être

rétablies en provoquant une mue. Ce renouvellement serait lié à la texture cristallographique des coquilles (Ahmed *et al.* 2005). Les efforts de la génétique et un souci de durabilité ont amené les éleveurs et producteurs d'œufs à allonger la période de ponte au-delà de 80 semaines, au lieu de 70 semaines. On observe chez ces poules âgées, une fragilisation des coquilles d'œufs pour certaines poules, alors que d'autres maintiennent leur qualité. Dans ce contexte d'allongement de la période de ponte, une meilleure compréhension des paramètres influençant la qualité de coquille en fonction de l'âge et en fonction de la solidité de la coquille à un âge donné, est essentielle pour maintenir un bon niveau de production en fin de période de ponte.

Ainsi, l'objectif de cette étude a été de mesurer des paramètres physiques de la coquille d'œufs issus de poules à différents âges (36, 65 et 85 semaines). Par ailleurs, les coquilles collectées à 36 et 85 semaines, ont été divisées en 2 groupes de solidité de coquille pour chaque période d'âge (forte résistance à la rupture, HBS et faible résistance à la rupture, LBS). Des paramètres de composition (coquille et cuticule), d'ultrastructure (épaisseur des différentes couches de coquille) et de microstructure (taille, nombre et orientation des cristaux) ont ainsi été explorés et confrontés entre les groupes. Des techniques de thermogravimétrie, de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, de diffraction des rayons-X et de microscopie électronique à balayage ont été employées pour obtenir ces mesures.

Matériel et méthodes

Recueil des coquilles d'oeufs

Les coquilles d'œufs ont été recueillis chez des animaux grands-parentaux sélectionnés pour la ponte par la société Novogen. Vingt-quatre coquilles provenant de poules à 65 semaines, 24 provenant de poules à 85 semaines et 30 coquilles provenant de poules à 36 semaines (descendants) ont été utilisées (Figure 1A). Des mesures physiques et mécaniques (poids et force de fracture des coquilles) ont été effectuées, pour définir les groupes de coquilles de bonne (HBS) et mauvaise qualité (LBS) à 36 et 85 semaines.

Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

L'ensemble des échantillons de coquilles a été analysé avec l'appareil FTIR spectrometer (model 6200, JASCO Analytical Instruments, Tokyo, Japan) (Rodriguez-Navarro *et al.* 2013). Un morceau de coquille de chaque échantillon a été placé face externe sur la lentille pour l'analyse de la couche la plus externe de la coquille (cuticule). Les résultats obtenus (OH %, Amide1 %, Amide2 %, CO_3 %, Lipids %, Sulphates %, Sugar %, Total cuticle %), ont été

analysés avec le logiciel Spectra manager de Jasco (**https://jascoinc.com/products/spectroscopy/spectroscopy-software/**).

Analyse thermogravimétrique (TGA)

Cette technique a permis d'analyser la composition en eau (H_2O %), et en matrice organique (OM1 % et OM 2%, en fonction de la thermosensibilité) des lots de coquilles (Figure 1C). Pour cela, les coquilles ont été lavées 3 h à l'hypochlorite de sodium (NaClO) afin de retirer les membranes coquillières, puis séchées avant d'être broyées en poudres fines avec un mortier et un pilon. Chaque poudre de coquille a ensuite été chauffée à 200 °C (perte de l'eau, H_2O %), à 400°C (perte d'une partie de la matrice organique, OM1 %), puis à 600°C (perte de l'autre partie de la matrice organique, OM2 %). Entre chaque étape de chauffage, les masses des poudres de coquilles sont mesurées de manière à calculer les pourcentages de composition (H_2O %, OM1 % et OM2 %), pour comparaison entre les lots de coquilles.

Diffraction aux rayons-X (source cuivre, XRD)

L'ensemble des échantillons de coquilles a été analysé avec le diffractomètre à rayons-X (source cuivre) (Rodriguez-Navarro *et al.* 2002), qui permet l'analyse de l'orientation des cristaux de calcite dans les différents lots de coquilles. Cette technique permet d'analyser la couche de cristaux sur une profondeur de 50 µm. Un morceau de $1cm^2$ de chaque échantillon de coquille a été déposé sur un support (face externe vers le haut) pour réaliser l'analyse (Figure 1D). Un profil de diffraction a ainsi été obtenu pour chaque échantillon. Un diffractogramme d'échantillon de coquille réduit en poudre a également été mesuré, afin d'avoir un profil de diffraction de cristaux référent ayant une orientation cristalline totalement aléatoire.

Les profils de diffraction ont ensuite été traités avec le logiciel TOPAS (**https://www.bruker.com/fr/products/x-ray-diffraction-and-elemental-analysis/x-ray-diffraction/xrd-software/topas.html**) de manière à obtenir la position et l'aire de l'ensemble des pics de chaque échantillon, correspondant aux angles de diffraction. Après normalisation avec l'aire des pics de l'échantillon de poudre référent, l'indice d'orientation FWHM a été calculé pour chaque échantillon *via* la pente de la droite I/Io en fonction de l'angle à (001).

Diffraction aux rayons-X en deux dimensions (source molybdène, 2D-XRD)

Cette technique a permis d'évaluer la taille, ainsi que le nombre et l'orientation des cristaux (Figure 1C). L'ensemble des échantillons de coquilles a été analysé en dupliqua avec le diffractomètre à rayons X deux dimensions (source molybdène) (Rodriguez-Navarro 2007). La

source molybdène a été utilisée car les rayons émis sont plus pénétrants que ceux obtenus avec une source cuivre (Figure 2D). Ainsi, cette technique permet l'analyse des cristaux sur toute l'épaisseur de la coquille. Un morceau de chaque échantillon de coquille ($1cm^2$) a été déposé sur une règle (support) de manière à pouvoir mesurer les échantillons en série. Un profil de diffraction 2D a été obtenu pour chaque échantillon.

Les profils de diffraction 2D de chaque échantillon ont été traités avec le logiciel XRD2DScan (**https://www.ugr.es/~anava/xrd2dscan.htm**) afin d'obtenir les valeurs de marqueurs de taille des cristaux et de leur nombre (NofSpots, Intensity, NetSumIntensity, SpotArea, Cal_CSize).

Le logiciel XRD2DScan a également permis de mesurer l'intensité de l'ensemble des pics des profils de diffraction 2D de chaque échantillon. Ainsi, l'orientation des cristaux de calcite a été évaluée en calculant le paramètre du ratio d'intensité des pics 110 et 104 (I110/I104) de chaque échantillon de coquille.

Analyse de microscopie électronique à balayage (MEB)

Les analyses de microscopie électronique à balayage ont été réalisées sur 5 échantillons par lot de coquille. La variable qualité (HBS/LBS) n'a pas été analysée pour les coquilles de 36 semaines.

Chaque échantillon de coquille ($0.5\ cm^2$) a été métallisé et observé au microscope électronique à balayage. Pour chaque échantillon, 3 microphotographies de différentes zones ont été réalisées, afin d'utiliser la moyenne géométrique lors de l'analyse statistique, permettant de réduire le biais expérimental. Les images de chaque échantillon ont ensuite été analysées en utilisant le logiciel FIJI (**https://imagej.net/Fiji/Downloads**), afin de mesurer l'épaisseur totale des coquilles et des différentes couches qui les composent (Eff.thickness, Eggshell membrane thickness, Mineral layer thickness, Total thickness), ainsi que le nombres de noyaux mamillaires (Number of m.knobs) (Figure 1C).

Analyses statistiques

Les différents paramètres physiques et mécaniques entre les différents lots, ainsi que les mesures de composition et de structure ont été comparés entre les groupes de coquilles *via* une analyse ANOVA suivi d'un test de Tukey avec le logiciel Minitab®18 (**https://www.minitab.com/fr-fr/**). Les trois comparaisons qui ont été réalisées sont les suivantes : 36W/65W/85W, HBS/LBS (36W) et HBS/LBS (85W) (Figure 1A).

Résultats/discussion

Une analyse statistique (ANOVA-Tukey) a été réalisée pour vérifier les différences des paramètres physiques et mécaniques entre les groupes (Tableau 1). L'effet de l'âge à 36, 65 et 85 semaines a été mesuré sur 12 coquilles d'œufs dans chaque groupe. Le poids de l'œuf, la résistance à la rupture de la coquille et l'épaisseur de coquille sont significativement plus élevées à 36 semaines par rapport à 65 et 85 semaines d'âge. Aucune différence statistique n'est observée entre 65 et 85 semaines.

A 36 semaines, 15 coquilles de bonne (HBS, high breaking strenght) et mauvaise (LBS, Low breaking strenght) qualités ont été analysées (comparaison 2 sur Figure 1B). L'analyse ANOVA-Tukey a permis de confirmer que la force de fracture était différente entre les groupes alors que l'épaisseur des coquilles ne variait pas (Tableau 1). Un résultat similaire en terme de significativité a été obtenu à 85 semaines sur 11 coquilles de bonne et mauvaise qualité (Tableau 1).

Composition de la cuticule des coquilles

La composition de la cuticule a été analysée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. Les compositions en eau (OH %), protéines (Amide1 % et Amide2 %), lipides (Lipids %), sulfates (Sulphates %) et sucres (Sugar %) ont ainsi été explorées (Figure 2). Le pourcentage total de cuticule de chaque échantillon a alors été déduit (TotalCuticle). Ce dernier est indirectement corrélé avec le pourcentage de minéral identifiée dans l'analyse (CO3 %). En effet, plus la cuticule sera épaisse (TotalCuticle % élevé) moins la couche de minéral superficielle de la coquille, située sous la cuticule, sera identifiée et inversement.

Une différence significative de la composition en eau (OH %) a été identifiée dans les cuticules en fonction de l'âge. En effet, OH % est significativement supérieur à 65 semaines par comparaison aux cuticules de coquille à 36 semaines et 85 semaines (Figure 2A). Aucune autre différence significative n'a été identifiée entre les cuticules des coquilles de 36 semaines, 65 semaines et 85 semaines. Une étude précédente a montré que la quantité totale de cuticule, de lipides et le degré de glycosylation diminuent avec l'âge (Rodriguez-Navarro *et al.* 2013). Notre étude ne permet pas de confirmer ces résultats antérieurs.

A 85 semaines, une différence significative du pourcentage de lipides (Lipids %) a été observée entre les coquilles de bonne (HBS) et mauvaise qualités (LBS) (Figure 2B). La quantité de lipides est supérieure dans les coquilles de bonne qualité par rapport aux coquilles de mauvaise

qualité. Ce résultat confirme les précédents résultats obtenus sur la composition en lipides de l'utérus des poules pondant des œufs aux coquilles fragiles et solides (Castaldo and Maurice, 1989). En effet, la proportion en lipides dans l'utérus des poules serait proportionnelle à la qualité des coquilles d'œufs.

Trois différences significatives ont également été repérées entre les coquilles de bonne et mauvaise qualité à 36 semaines (Figure 2C). Les quantités en Amide 1% et Amide 2% sont significativement supérieures dans les cuticules de coquilles à faible résistance (LBS) par comparaison aux cuticules de coquilles à forte résistance (HBS). Cela signifie que le pourcentage protéique est significativement plus élevé dans les coquilles LBS. De ce fait, le pourcentage de minéral (CO3 %) identifié est significativement supérieur dans les cuticules de coquilles à forte résistance (HBS). En effet, la composition en protéine (Amide 1% et Amide 2%) reflète l'épaisseur de la cuticule. Par conséquent, les cuticules LBS ayant un pourcentage protéique plus élevé, le pourcentage de minéral (CO3 %) est logiquement plus faible que celui des cuticules HBS. Ce résultat suggère que les coquilles les plus solides possèderaient des cuticules moins épaisses. Ce paramètre pourrait être un marqueur de qualité de coquille à 36 semaines. Toutefois, ces différences ne sont pas retrouvées entre les coquilles de qualités différentes à 85 semaines.

Composition en eau et matrice organique des coquilles

Les pourcentages d'eau (H_2O), de matrice organique de type 1 (Organic matrix 1) et de type 2 (Organic matrix 2) ont été mesurés dans les échantillons de coquilles *via* une analyse thermogravimétrique (Figure 3). La composition en matrice organique a été divisée en deux groupes selon la thermosensibilité des composés organiques (Organic matrix 1 : 200-400 °C ; Organic matrix 2 : 400-600 °C).

Le pourcentage en eau (H_2O) est significativement inférieur dans les coquilles de 36 semaines par rapport aux coquilles d'œuf de 65 et 85 semaines (Figure 3A). De plus, le pourcentage de matrice organique de type 1 (Organic matrix 1) est significativement supérieur dans les coquilles de 36 semaines par rapport aux coquilles de 65 et 85 semaines, alors que le pourcentage de matrice organique de type 2 (Organic matrix 2) est significativement inférieur dans les coquilles de 36 semaines par rapport aux coquilles de 65 et 85 semaines. Aucune différence significative n'a été observée dans le pourcentage en eau et en matrice organique entre les coquilles de 65 semaines et 85 semaines. Ces résultats suggèrent qu'une diminution de la teneur en eau se produit entre 36 semaines et 65 semaines. De plus, ces résultats indiquent

que la composition de la matrice organique de la coquille varie avec l'âge des poules. Les proportions des différentes protéines présentes dans la matrice organique semblent évoluer avec l'âge. Cela rejoint les observations effectuées au niveau des œufs issus de poules âgées après mue, indiquant que l'augmentation des capacités mécaniques des coquilles après la mue était liée à une concentration plus importante de protéines spécifiques de la coquille (Ahmed *et al.* 2005). Un dosage des protéines spécifiques pourrait potentiellement correspondre à un indicateur de qualité des coquilles.

A 85 semaines, aucune différence de composition (eau et matrice organique) n'a été détectée entre les coquilles de bonne (HBS) et mauvaise qualité (LBS) (Figure 3B).

A 36 semaines, les pourcentages d'eau et de matrice organique de type 1 sont significativement supérieurs dans les coquilles de mauvaise qualités (LBS) par comparaison aux coquilles de bonne qualités (HBS) (Figure 3C). La composition en eau et en matrice organique de type 1 pourraient alors être des marqueurs de qualité de coquille à 36 semaines. Cependant, ces résultats ne sont pas retrouvés dans les œufs de poules à 85 semaines. Par conséquent, ce paramètre ne peut pas être utilisé comme marqueur de qualité de coquille pour des poules âgées. Enfin, aucune différence significative n'a été observée dans les pourcentages de matrice organique de type 2 entre les coquilles de bonne et mauvaise qualités provenant de poules à 36 et 85 semaines (Figure 3C).

Microstructure des coquilles : nombre de cristaux de calcite et évaluation de leur taille et de leur orientation

La microstructure des coquilles a été analysée avec 2 techniques différentes (Figure 1). La diffraction aux rayons-X (source cuivre), permet de déterminer un indice d'orientation des cristaux (FWHM). Cette mesure est faite sur une profondeur de 50 µm et permet principalement l'analyse des cristaux de la couche extérieure de la coquille. Les résultats obtenus sont présentés en figure 4. L'analyse statistique montre une différence de l'index d'orientation uniquement pour les coquilles provenant de poules collectées à 85 semaines. En effet, l'indice d'orientation FWHM indique une différence significative entre les coquilles de bonne et mauvaise qualités à 85 semaines (Figure 4). En effet, les coquilles de bonne qualité (HBS) à 85 semaines possèdent un indice FWHM significativement plus faible que celui des coquilles de faible qualité (LBS) au même âge (Figure 4). Cela souligne une orientation des cristaux moins importante dans les coquilles LBS que dans les coquilles HBS à 85 semaines.

L'analyse de la microstructure des coquilles d'œufs a également été réalisée par diffraction aux rayons-X (2D-XRD), en 2 dimensions et avec une source molybdène. Cette source est plus pénétrante et permet l'analyse de l'ensemble des cristaux contenus dans la coquille. Cette analyse permet de mesurer le nombre de cristaux (Nofspot) ainsi que leurs tailles (Intensity, NetSumIntensity, SpotArea et Cal-Csize) et leurs orientations (I110/I104) (Table 2). La seule différence significative observée, concerne l'orientation des cristaux entre coquilles de bonne et mauvaise qualité à 36 semaines. Le paramètre d'orientation I110/I104 montre que les coquilles de bonne qualité (HBS) présentent des cristaux plus orientées que dans les coquilles de mauvaise qualités (LBS) provenant de poules à 36 semaines (I110/I104-HBS > I110/I104-LBS) (Tableau 2).

Ces résultats obtenus par ces 2 méthodes ne vont pas dans le même sens que ceux précédemment obtenus dans une autre étude sur le lien entre l'orientation des cristaux et la force de fracture (Rodriguez-Navarro *et al.* 2002). En effet, les résultats antérieurs rapportaient que des cristaux moins orientés dans les coquilles de poules à 30 semaines, étaient associés à une meilleure résistance des coquilles (Rodriguez-Navarro *et al.* 2002). Toutefois, dans cette même étude, la relation entre l'orientation des cristaux et la résistance des coquilles est moins évidente pour des œufs provenant de poules à 58 semaines. Dans notre étude, pour les œufs de poules à 36 et 85 semaines, les résultats suggèrent que plus les cristaux de calcite sont orientés, plus les œufs sont solides. En effet, l'orientation des cristaux est supérieure dans les coquilles à forte résistance (HBS) par rapport aux coquilles de faible résistances (LBS) pour ces 2 périodes d'âges. Dans l'étude précédente, les résultats ont également rapporté que les coquilles issues de jeunes poules (30 semaines) possédaient des cristaux moins orientés que les coquilles issues de poules plus âgées (58 semaines) (Rodriguez-Navarro *et al.* 2002). Notre étude ne permet pas de confirmer ce résultat. En effet, nos 2 mesures n'ont pas permis de déceler de différences significative entre les coquilles à différents âges différents (Figure 4). D'autres analyses seront nécessaires pour déterminer le lien entre l'orientation des cristaux dans les coquilles et les capacités de résistances de ces dernières.

Ultrastructure des coquilles : épaisseur des couches minérales et organiques

Afin de mesurer l'épaisseur des différentes couches qui composent les coquilles, des microphotographies ont été réalisées *via* des observations en microscopie électronique à balayage. Les microphotographies obtenues ont été analysées avec le logiciel FIJI pour déterminer les valeurs d'épaisseur des différentes couches dans chaque échantillon de coquille (Figure 5).

L'épaisseur totale (Total thickness) et l'épaisseur des membranes coquillières (Eggshell mb thickness), sont significativement plus élevées pour les coquilles provenant de poules à 36 semaines par rapport à celles provenant de poules à 85 semaines (Figure 5A). Aucune autre différence concernant l'épaisseur des couches des coquilles n'a été identifiée entre les coquilles provenant de poules d'âges différents. Ces résultats confortent les précédents résultats indiquant que la diminution de qualité de coquille en fonction de l'âge est la conséquence d'une réduction de l'épaisseur de coquille (Rodriguez-Navarro *et al.* 2002). Notre étude précise que cette diminution d'épaisseur de coquille serait liée à une réduction de l'épaisseur des membranes coquillières en fonction de l'âge. En effet, l'épaisseur de la couche minérale ne semble pas varier en fonction de l'âge des poules (Figure 5A).

D'autre part, la comparaison des épaisseurs des différentes couches des coquilles provenant de poules à 85 semaines a permis d'identifier des différences significatives entre les coquilles de bonne (HBS) et mauvaise (LBS) qualités. En effet, l'épaisseur effective (Eff.thickness) et l'épaisseur de la couche minérale (Mineral layer thickness) des coquilles de bonne qualité est significativement supérieure à celles des coquilles de mauvaise qualité (Figure 5B). A l'inverse, l'épaisseur des membranes coquillières (Eggshell mb thickness) est significativement supérieure dans les coquilles de faible qualité par rapport à celle des coquilles de bonne qualité (Figure 5B). Par conséquent, ces résultats suggèrent que les coquilles de mauvaise qualité à 85 semaines possèdent des membranes coquillières plus épaisses et une couche minérale moins épaisse que les coquilles de bonne qualité au même âge, tout en gardant une épaisseur totale identique. L'épaisseur de la couche minérale semble être un paramètre de qualité de coquille qui pourrait être un marqueur pour les œufs de poules âgées de 85 semaines. L'épaisseur des membranes coquillières reste moins évidente à interpréter. Celle-ci est positivement corrélée à la qualité de coquille pour des poules d'âge équivalent (85 semaines) mais cette corrélation est inversée lorsque la variable de l'âge est introduite. En effet, dans notre étude, lorsque la qualité de coquille diminue avec l'âge, l'épaisseur des membranes coquillières décroit également. Enfin, les résultats indiquent que le nombre de noyaux mamillaires ne varie pas entre les coquilles de qualité ou d'âge différents (Figure 5A et B).

Conclusion

La qualité de coquille est un élément clef pour la filière œuf. Une optimisation des capacités mécaniques des coquilles est associée à une réduction des pertes économiques et une augmentation de la sécurité alimentaire. Afin d'identifier les paramètres structuraux qui influencent les propriétés mécaniques de la coquille, des lots de coquilles de qualités différentes ont été analysés. L'objectif était d'identifier les paramètres de composition et de structure qui varient selon les capacités mécaniques des coquilles. Pour cela, des techniques d'analyses physico-chimiques ont été réalisées (spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier, thermogravimétrie, diffraction aux rayons-X classique et en deux dimensions et microscopie électronique à balayage). Ces tests ont été réalisés sur des lots de coquilles de qualités différentes ou provenant de poules d'âges différents. Des variations de compositions de coquille (eau et matrice organique) et de cuticule (eau) ainsi que des variations d'ultrastructure (épaisseur totale et épaisseur des membranes coquillières) ont été identifiées en fonction de l'âge (Tableau 3). Des variations de composition de coquille (H_2O et matrice organique) et de cuticule (protéines), ainsi qu'une variation de microstructure (orientation des cristaux), ont également été identifiées entre les coquilles de bonne et mauvaise qualités à 36 semaines (Tableau 4). Enfin à 85 semaines, une variation de composition de cuticule (lipides) ainsi que des variations de microstructure (orientation des cristaux) et d'ultrastructure (épaisseur de la couche organique et la couche minérale) ont été repérées (Tableau 5). Certains de ces paramètres pourraient correspondre à des marqueurs de qualité des coquilles pour la filière œuf. De plus, des analyses protéomiques seront réalisées sur les mêmes échantillons de coquilles. Ainsi, la confrontation des résultats phénotypiques de cette étude avec les futurs résultats moléculaires permettra une meilleure compréhension du mécanisme de biominéralisation. Le lien avec la qualité de coquille pourra ensuite être établi.

Tableaux

Tableau 1. Résumé des paramètres mécaniques de chaque groupe de coquilles pour les 3 comparaisons (Age effect, Quality effect 36W, Quality effect 85W). Lorsque deux groupes ne possèdent aucune lettre du résultat statistique en commun (ANOVA-Tukey), ils sont significativement différents.

Age effect				
	Mean±SD 36 W	Mean±SD 65 W	Mean±SD 85W	p-value
n	12	12	12	
Eggshell weight	6.31[a]	5.954±0.535[b]	5,803 ± 0,555[b]	0.007
Eggshell strength	4877±653[a]	3773±562[b]	3244 ± 621[b]	<0.001
Eggshell thickness	0.477±0.032[a]	0.345±0.027[b]	0.335[b]	<0.001
Quality effect 36 W				
	LBS	HBS	p-value	
n	15	15		
Eggshell strength	4053±382[b]	5013±319[a]	<0.001	
Eggshell thickness	0.452±0.036	0.474±0.027	0.07	
Quality effect 85 W				
	LBS	HBS	p-value	
n	11	11		
Eggshell strength	3102.6±287.6[b]	3845.6±282.1[a]	<0.001	
Eggshell thickness	0.335±0,009	0,343±0,016	0.186	

Suite Tableau 1.

Tableau 2. Etude de la microstructure des coquilles d'œufs des différents groupes *via* l'analyse de diffraction aux rayons-X classique (source molybdène, 2D-XRD, Figure 1B et C). Les indices du nombre (Nofspots), de la taille (Intensity, NetSumIntensity, SpotArea, Cal-Csize) et de l'orientation des cristaux (ratio I110/I104) ont été mesurés dans les différents groupes de coquilles. Trois comparaisons ont été réalisées : âge (coquilles (n=12) de 36 semaines, 65 semaines et 85 semaines), 36W (coquilles (n=15) de bonne, HBS et mauvaise, LBS qualité) et 85W (coquilles (n=11) de bonne, HBS et mauvaise, LBS qualité) (Figure 1A).

			Age effect																
			Nofspots			**Intensity**			**NetSumIntensity**			**SpotArea**			**Cal-Csize**			**I110/I104**		
	Group	n	**mean**	**SD**	**p-value: 0.811**	**mean**	**SD**	**p-value: 0.321**	**mean**	**SD**	**p-value: 0.852**	**mean**	**SD**	**p-value: 0.714**	**mean**	**SD**	**p-value: 0.793**	**mean**	**SD**	**p-value: 0.506**
Age	36W	12	59.25	7.54	a	2770	549	a	195332	34501	a	367.79	13.22	a	10.363	0.503	a	0.2196	0.1143	a
	65W	12	57.21	7.01	a	2741	847	a	189088	41924	a	372.33	18	a	10.5	0.447	a	0.2341	0.1415	a
	85W	12	58.54	8.79	a	3219	1083	a	199107	52660	a	373.96	24.1	a	10.442	0.529	a	0.2934	0.1982	a
			Quality effect																
	Group	n	**mean**	**SD**	**p-value: 0.509**	**mean**	**SD**	**p-value: 0.780**	**mean**	**SD**	**p-value: 0.444**	**mean**	**SD**	**p-value: 0.230**	**mean**	**SD**	**p-value: 0.460**	**mean**	**SD**	**p-value: 0.036**
36W	HBS	14	59.57	8.27	a	2854	543	a	198999	32571	a	369.82	13.24	a	10.35	0.528	a	0.028	0.00101	a
	LBS	14	61.39	5.95	a	2796	550	a	188805	36709	a	376.57	15.74	a	10.225	0.332	a	0.0272	0.00093	b
	Group	n	**mean**	**SD**	**p-value: 0.792**	**mean**	**SD**	**p-value: 0.332**	**mean**	**SD**	**p-value: 0.426**	**mean**	**SD**	**p-value: 0.069**	**mean**	**SD**	**p-value: 0.741**	**mean**	**SD**	**p-value: 0.929**
85W	HBS	11	60.18	9.5	a	2783	832	a	189651	43425	a	375.73	14.18	a	10.355	0.607	a	0.3435	0.2407	a
	LBS	11	61.18	7.97	a	2481	564	a	174346	44945	a	363.32	16.04	a	10.277	0.464	a	0.3345	0.2269	a

Tableau 3. Résumé des paramètres de coquilles qui varient significativement en fonction de l'âge des poules (36, 65 et 85 semaines). Lorsque deux groupes ne possèdent aucune lettre du résultat statistique en commun (ANOVA-Tukey), ils sont significativement différents.

Age effect

		Eggshell composition (TGA)			Cuticle composition (FTIR)	Ultrastructure SEM (n=5)	
		H_2O %	OM1 %	OM2 %	OH %	Total thickness (µm)	Egg.mb.thickness (µm)
	Anova	p-value: <0.001	p-value: <0.001	p-value: <0.001	p-value: 0.010	p-value: 0.044	p-value: 0.05
Group	n						
36W	12	0.2134^{b}	1.5930^{a}	0.0531^{b}	0.4228^{a}	407.7^{a}	56.23^{a}
65W	12	0.5191^{a}	1.1855^{b}	0.2269^{a}	0.3701^{b}	383.8^{ab}	46.16^{ab}
85W	12	0.5802^{a}	1.2546^{b}	0.2033^{a}	0.4269^{a}	348.9^{b}	37.78^{b}

Tableau 4. Résumé des paramètres de coquilles qui varient significativement en fonction de la qualité de coquille (bonne, HBS et mauvaise, LBS qualité) à 36 semaines. Lorsque deux groupes ne possèdent aucune lettre du résultat statistique en commun (ANOVA-Tukey), ils sont significativement différents.

Quality effect 36 W

		Eggshell composition (TGA)		Cuticle composition (FTIR)			Microstructure (2DXRD)
		H_2O %	OM1 %	Amidel %	AmideII %	CO_3 %	I110/I104 (crystal orientation)
	Anova	p-value: 0.039	p-value: 0.014	p-value: 0.016	p-value: 0.029	p-value: 0.041	p-value: 0.036
Group	n						
HBS	15	0.2135^{b}	1.6365^{b}	0.1193^{b}	0.1107^{b}	0.2167^{a}	0.0279^{a}
LBS	15	0.3008^{a}	1.8622^{a}	0.1527^{a}	0.1302^{a}	0.1947^{b}	0.0271^{b}

Tableau 5. Résumé des paramètres de coquilles qui varient significativement en fonction de la qualité de coquille (bonne, HBS et mauvaise, LBS qualité) à 85 semaines. Lorsque deux groupes ne possèdent aucune lettre du résultat statistique en commun (ANOVA-Tukey), ils sont significativement différents.

Quality effect 85 W

		Cuticle composition (FTIR)	Microstructure (XRD)	Ultrastructure (SEM) n=5		
		Lipids %	FWHM (crystal orientation)	Eff.thickness (µm)	Egg.mb.thickness (µm)	Mineral layer thickness (µm)
	Anova	p-value: 0.015	p-value: 0.003	p-value: 0.007	p-value: 0.025	p-value: 0.009
Group	n					
HBS	11	0.015[a]	75.96[a]	304.98[a]	32.81[b]	343.78[a]
LBS	11	0.005[b]	99.96[a]	278.55[b]	48.52[a]	308.77[b]

Figures

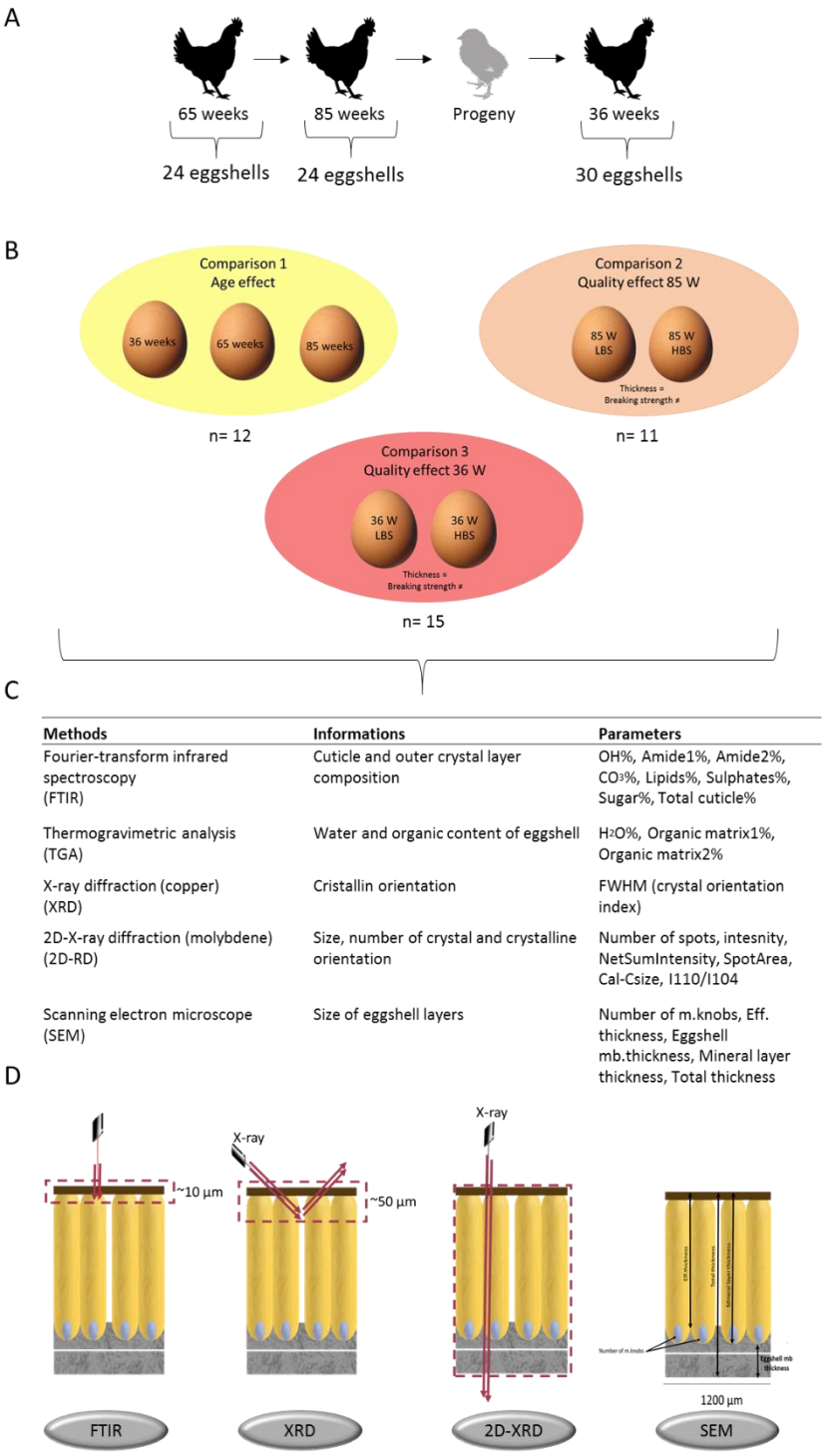


Figure 1. Résumé de la procédure utilisée dans cette étude. A. Description du matériel biologique utilisé **B.** Comparaison effectuées entre les groupes de coquilles pour étudier la variable âge et la variable qualité de coquille **C.** Paramètres mesurés pour chaque méthode utilisée **D.** Principe des différentes méthodes utilisées et zones des coquilles analysées.

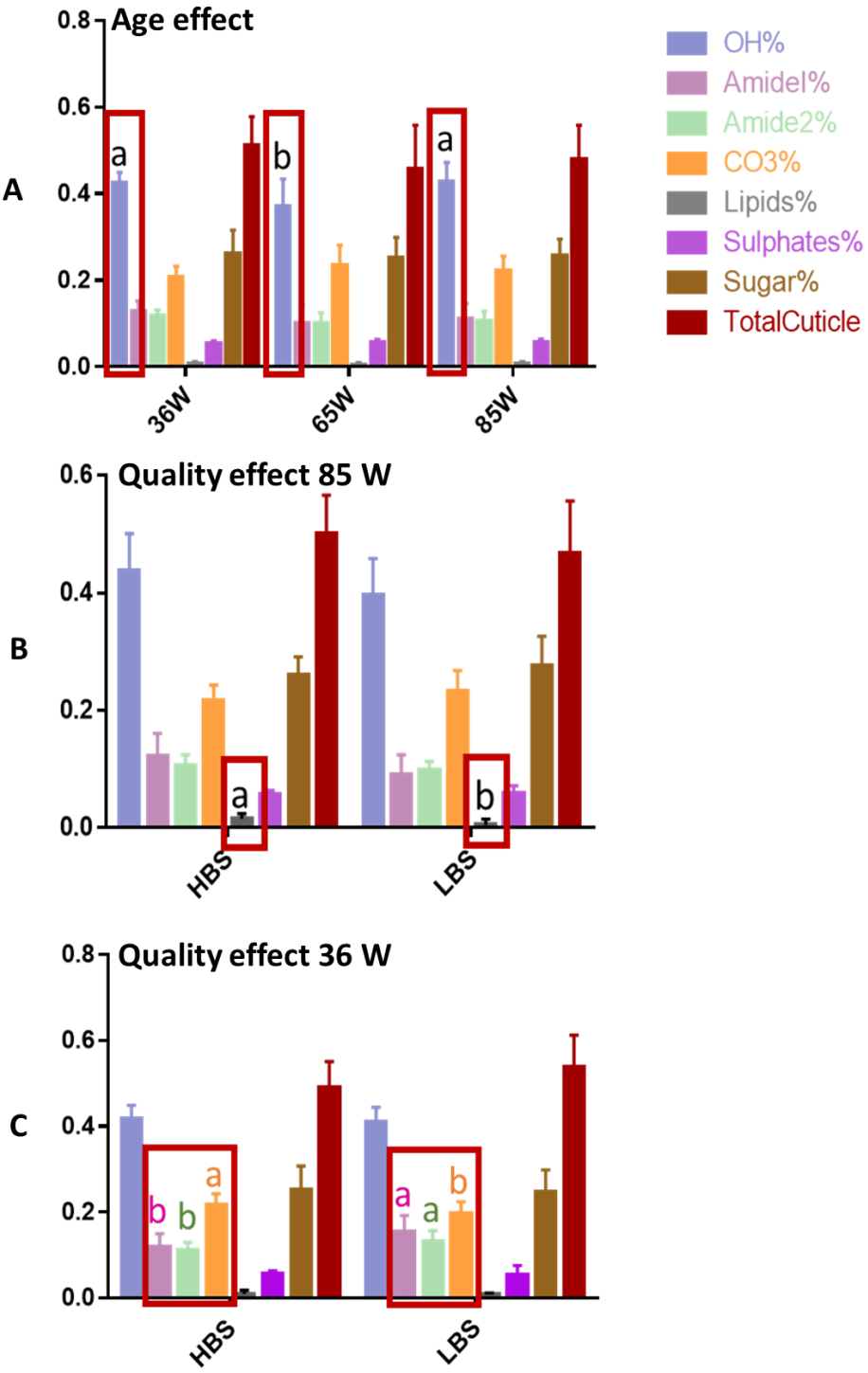


Figure 2. Niveaux des différents composants de la cuticule, mesurés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, pour chaque groupe de coquilles. **A.** Age effect : coquille provenant de poules d'âge différents (36, 65 et 85 semaines n=12) **B.** Quality effect 85W : coquilles de bonne (HBS) et mauvaise qualité (LBS) à 85 semaines (n=11) **C.** Quality effect 36W : coquilles de bonne (HBS) et mauvaise qualité (LBS) à 36 semaines (n=15). Les résultats significatifs sont indiqués par des lettres (ANOVA-Tukey).

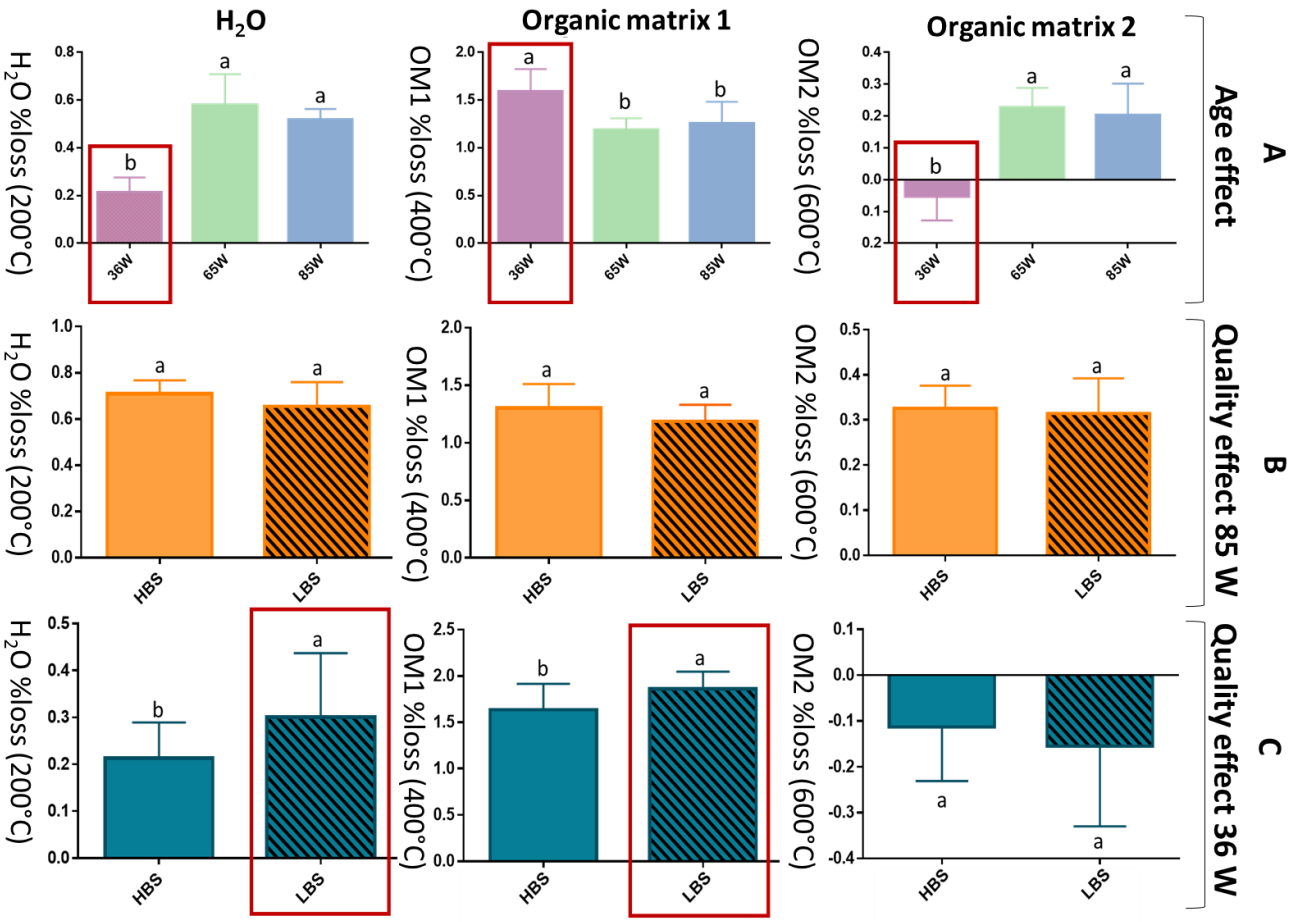


Figure 3. Pourcentage d'eau et de matrice organique retrouvé dans chaque groupe de coquilles. Les mesures ont été obtenues *via* une analyse de thermogravimétrie. **A.** Age effect : coquille provenant de poules d'âges différents (36, 65 et 85 semaines, n=12) **B.** Quality effect 85W : coquilles de bonne (HBS) et mauvaise qualité (LBS) à 85 semaines (n=11) **C.** Quality effect 36W : coquilles de bonne (HBS) et mauvaise qualité (LBS) à 36 semaines (n=15). Les résultats significatifs sont indiqués par des lettres (ANOVA-Tukey).

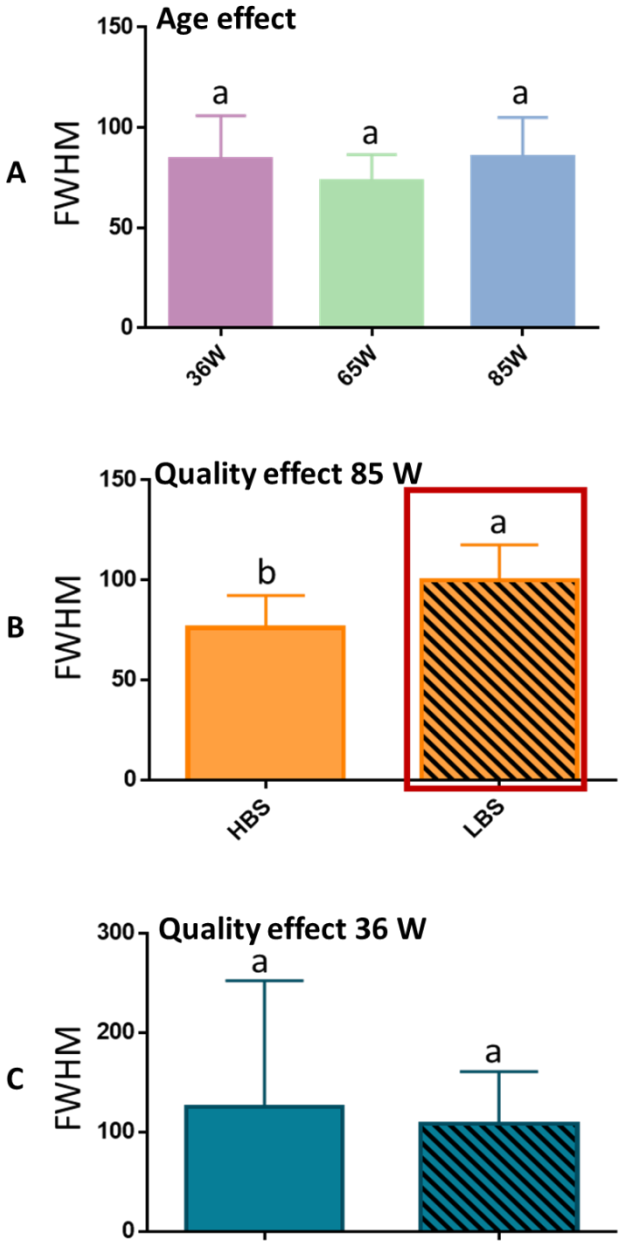


Figure 4. Orientation des cristaux dans chaque groupe de coquilles. Les valeurs de l'indice d'orientation FWHM (full width at half maximum of the distribution) ont été obtenues *via* une analyse de diffraction aux rayons-X en deux dimensions (source cuivre, XRD). Plus l'indice FWHM augmente, moins l'orientation des cristaux de calcite est importante. **A.** Age effect : coquille provenant de poules d'âges différents (36, 65 et 85 semaines, n= 12) **B.** Quality effect 85W : coquilles de bonne (HBS) et mauvaise qualité (LBS) à 85 semaines (n=11) **C.** Quality effect 36W : coquilles de bonne (HBS) et mauvaise qualité (LBS) à 36 semaines (n=15). Les résultats significatifs sont indiqués par des lettres (ANOVA-Tukey).

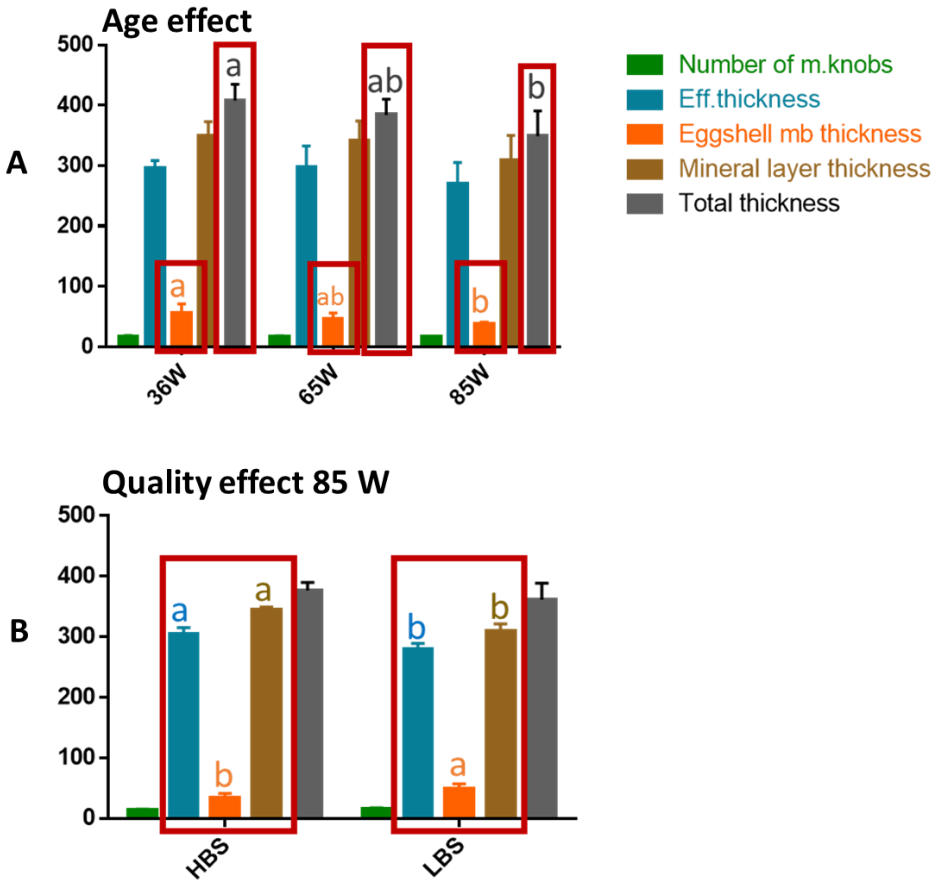


Figure 5. Epaisseur des différentes couches qui composent la coquille en fonction des groupes. Ces valeurs ont été obtenues par analyse des microphotographies (logiciel FIJI) réalisés *via* des observations de microscopie électronique à balayage sur chaque groupe de coquilles (n=5, en triplicat). **A.** Age effect : coquille provenant de poules d'âges différents (36, 65 et 85 semaines) **B.** Quality effect 85W : coquilles de bonne (HBS) et mauvaise qualité (LBS) à 85 semaines. Les résultats significatifs sont indiqués par des lettres (ANOVA-Tukey).

Bibliographie

1. Nys Y, Gautron J, Garcia-Ruiz JM, Hincke MT (2004) Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. Cr Palevol 3 (6-7):549-562

2. Hincke MT, Nys Y, Gautron J, Mann K, Rodriguez-Navarro AB, McKee MD (2012) The eggshell: structure, composition and mineralization. Front Biosci (Landmark Ed) 17:1266-1280

3. Nys Y, Gautron J (2007) Structure and formation of the eggshell. In: Huopalahti R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R (eds) Bioactive egg compounds. Springer, Berlin, pp 99-102

4. Hincke M, Gautron J, Nys Y, Rodriguez-Navarro A, McKee MD (2011) The eggshell: structure and protective function. In: Nys Y, Bain M, Van immerseel F (eds) Imporving the safety and quality of eggs and egg products, vol 1. Woodhead publishing, Sawston, pp 151-182

5. Nys Y, Hincke MT, Hernandez-Hernandez A, Rodriguez-Navarro AB, Gomez-Morales J, Jonchere V, Garcia-Ruiz JM, Gautron J (2010) Eggshell ultrastructure, properties and the process of mineralization: involvement of organic matrix in the eggshell fabric. Prod Anim 23 (2):143-154

6. Richards JF, Swanson MH (1965) Relationship of Egg Shape to Shell Strength. Poultry Sci 44 (6):1555-1558

7. Rodriguez-Navarro A, Kalin O, Nys Y, Garcia-Ruiz JM (2002) Influence of the microstructure on the shell strength of eggs laid by hens of different ages. Br Poult Sci 43 (3):395-403

8. Rodriguez-Navarro AB (2007) Rapid quantification of avian eggshell microstructure and crystallographic-texture using two-dimensional X-ray diffraction. Brit Poultry Sci 48 (2):133-144

9. Ahmed AMH, Rodriguez-Navarro AB, Vidal ML, Gautron J, Garcia-Ruiz JM, Nys Y (2005) Changes in eggshell mechanical properties, crystallographic texture and in matrix proteins induced by moult in hens. Brit Poultry Sci 46 (3):268-279

10. Panheleux M, Bain M, Fernandez MS, Morales I, Gautron J, Arias JL, Solomon SE, Hincke M, Nys Y (1999) Organic matrix composition and ultrastructure of eggshell: a comparative study. Brit Poultry Sci 40 (2):240-252

11. Panheleux M, Nys Y, Williams J, Gautron J, Boldicke T, Hincke MT (2000) Extraction and quantification by ELISA of eggshell organic matrix proteins (ovocleidin-17, ovalbumin, ovotransferrin) in shell from young and old hens. Poult Sci 79 (4):580-588

12. Rodriguez-Navarro AB, Dominguez-Gasca N, Munoz A, Ortega-Huertas M (2013) Change in the chicken eggshell cuticle with hen age and egg freshness. Poultry Sci 92 (11):3026-3035

Annexe 3. Article publié dans le eBook des 13èmes Journées de la Recherche Avicole et palmipèdes à foie gras – 20 et 21 mars 2019) – Tours Centre des congrès Vinci. Cet article présente une partie des résultats du **chapitre 2** de ce manuscrit.

IDENTIFICATION DE VESICULES EXTRACELLULAIRES IMPLIQUEES DANS LA MINERALISATION DE LA COQUILLE DE L'ŒUF DE POULE

L. Stapane[1], N. Le Roy[1], J. Ezagal[1] et J. Gautron[1]

1.BOA, INRA, Université de Tours, Centre Val de Loire, 37380 Nouzilly, France

lilian.stapane@inra.fr

RÉSUMÉ

La coquille d'œuf constitue une barrière physique contre les chocs mécaniques et la pénétration microbienne. Son intégrité est cruciale pour assurer la qualité hygiénique de cet ingrédient de base de la consommation humaine et limiter le nombre d'œufs déclassés pour défaut de coquille. Dans ce contexte, nous caractérisons différents marqueurs qui influencent l'ultrastructure de la coquille et déterminent sa solidité. Ces marqueurs constituent des candidats biologiques utilisables en sélection génomique pour renforcer la solidité de la coquille. La coquille est constituée à 95 % d'une phase minérale de carbonate de calcium (calcite) et à 3,5 % d'une matrice organique principalement constituée de protéines. La formation de la coquille résulte d'un processus de biominéralisation contrôlé et extracellulaire qui a lieu dans l'utérus. Ce processus implique un fluide dans lequel baigne l'œuf lors de la formation de la coquille et une forme transitoire de carbonate de calcium amorphe (ACC). Cette forme transitoire serait stabilisée et transportée par des vésicules extracellulaires du fluide utérin jusqu'au site de la minéralisation. Ce travail vise à mettre en évidence et caractériser le rôle des vésicules extracellulaires dans le processus de minéralisation. Dans un premier temps, la RT-qPCR en temps réel a permis de quantifier l'expression de gènes cibles vésiculaires dans différents tissus. Les résultats confirment une forte expression des acteurs moléculaires clefs de ce système (*edil3*, *anxa1*, *anxa2*) au niveau des régions de l'oviducte impliquées dans la formation de la coquille. Dans un second temps, une analyse par microscopie électronique à transmission a été couplée à une analyse élémentaire sur le fluide utérin collecté pendant la minéralisation. Les vésicules extracellulaires (~300 nm) ont pu être visualisées ainsi que le carbonate de calcium qu'elles contiennent. Des Western Blots ont permis de confirmer la présence d'un des acteurs clefs dans les vésicules purifiées. Les résultats de cette étude montrent pour la première fois l'implication du transport vésiculaire du calcium dans la biominéralisation de la coquille d'œuf.

ABSTRACT

Identification of extracellular vesicles involved in the biomineralization of the hen eggshell.

The eggshell is a crucial barrier against mechanical stresses and microbial attacks. Its integrity is essential to maintain the hygienic quality of this basic human food and to restrict the growth of downgraded eggs. In such a context, we are looking for markers specific to eggshell strength, in order to optimize egg quality. The eggshell is made of a mineral (calcite, calcium carbonate) phase (95%) and an organic matrix (3.5%) mostly containing proteins. The eggshell formation arises from an extra-cellular biomineralization process, which takes place in a fluid that contains eggshell precursors and involves a transient phase of calcium carbonate (ACC). This ACC could be stabilized and carried to the mineralization site through extracellular vesicles. This work aims at exploring the presence and the role of extra-cellular vesicles in the process of eggshell mineralization. In a first approach, we assessed, by real time qRT-PCR, the expression of vesicular target genes in several tissues. The results confirmed a high expression of target genes (*edil3*, *anxa1*, *anxa2*) in the portions of the oviduct where mineralization takes place. In a second approach, observation by electronic microscopy coupled with elementary analysis of the uterine fluid collected during eggshell biomineralization highlighted the presence of extracellular vesicles (~ 300 nm) containing calcium carbonate. Finally, a Western Blot analysis confirmed the presence of a key protein in the purified vesicle fraction. The results of this study shows for the first time the involvement of extra-cellular vesicle in the transport of calcium carbonate for the biomineralization of the hen eggshell.

INTRODUCTION

La coquille d'œuf constitue une barrière physique contre les chocs mécaniques et la pénétration microbienne. Son intégrité est cruciale pour assurer la qualité hygiénique de cet ingrédient de base de la consommation humaine et limiter le nombre d'œufs déclassés pour défaut de coquille. La qualité de la coquille a été fortement améliorée grâce à la sélection de pondeuses aux coquilles renforcées. Cette sélection a porté principalement sur la masse de coquille. Elle n'est cependant pas le seul critère déterminant sa qualité. En effet, à masse égale, les coquilles peuvent présenter des ultrastructures différentes qui déterminent leurs propriétés mécaniques (Nys et al., 2004). Pour obtenir de nouveaux gains en terme de sélection et de génétique, les acteurs moléculaires impliqués dans les processus qui déterminent la texture et la solidité de la coquille devront être pris en compte. Dans ce contexte, nous étudions les mécanismes de minéralisation pour caractériser les acteurs moléculaires influençant l'ultrastructure de la coquille et potentiellement utilisables en sélection génomique.

La coquille est constituée à 95 % d'une phase minérale de carbonate de calcium (calcite) et à 3,5 % d'une matrice organique principalement constituée de protéines (Nys et al., 1999). La formation de la coquille dans l'utérus de la poule résulte d'un processus de biominéralisation contrôlé et extracellulaire. Le fluide utérin baigne l'œuf lors de la formation de la coquille et joue un rôle central dans ce processus, apportant les précurseurs organiques et minéraux et régulant le processus de calcification. Une étude récente a démontré le rôle clef du carbonate de calcium amorphe (ACC) dans la synthèse de la coquille de l'œuf de poule et mis en évidence son ultrastructure (Rodríguez-Navarro et al., 2015). L'ACC constitue une forme transitoire instable vers la forme cristalline stable. L'ACC correspond à une réserve temporaire de calcium soluble fournissant les ions nécessaires durant la minéralisation rapide et permettant une cristallisation dans des conditions physiologiques (Ziegler, 1994). Cette forme amorphe de carbonate de calcium est plus soluble mais moins stable que la forme cristalline (Brecevic and Nielsen, 1989 ; Addadi et al., 2003). En conditions physiologiques l'ACC doit être stabilisée, ce qui nous a logiquement conduit au questionnement sur le mécanisme de maintien de cette forme dans le fluide utérin de la poule. Une hypothèse indiquant le rôle de vésicules extracellulaires stabilisant cette forme amorphe a émergé en confrontant des données vésiculaires obtenues *in vitro* (Tester et al., 2011), et *in situ* sur des systèmes de minéralisation d'invertébrés et osseux (Flores et Livingston, 2017 ; Vidasky et al., 2015 ; Balcerzak et al., 2008 ; Hasegawa et al., 2017 ; Mahamid et al., 2011). Des observations au microscope de la jonction utérovaginale et de la coquille montrent un nombre important de vésicules (Wyburn et al., 1973 ; Dennis et al., 1996 ; Chien et al., 2009 ; Waqas et al., 2016). Des données transcriptomiques récentes de notre équipe montrent qu'un nombre important de gènes est impliqué dans le transport vésiculaire dans l'utérus de poule (Gautron, 2018). L'ensemble de ces observations conforte l'hypothèse de la nécessité que l'ACC soit stabilisé dans des vésicules pour qu'il permette l'élaboration de la structure cristalline de la coquille. Ces vésicules permettraient de stabiliser et de transporter l'ACC jusqu'aux sites de nucléation situés au niveau de noyaux mamillaires présents sur les membranes coquillières de l'œuf.

A partir de données transcriptomiques utérines obtenues dans notre équipe et de données bibliographiques sur l'implication de vésicules dans la minéralisation des systèmes osseux (Shapiro et al., 2015), nous avons évalué le rôle potentiel d'acteurs protéiques préalablement identifiés dans le système vésiculaire utérin. Ce travail vise donc à mettre en évidence et à caractériser le rôle de vésicules extracellulaires dans le processus de minéralisation de la coquille de l'œuf de poule.

1. MATERIELS ET METHODES

Les différentes expériences ont été réalisées en respectant les "European Communities Council Directives" sur le bien-être des animaux. Le protocole d'expérimentation a été validé par le Comité d'éthique d'expérimentation animale de Val de Loire (comité d'éthique national pour l'expérimentation animale n°19) et le ministère sous #16099-015902. Des poules (ISA-Hendrix, 35 semaines au prélèvement), ont été sacrifiées durant la phase active de minéralisation. Plusieurs tissus (os, duodénum, rein, foie) et segments d'oviducte (magnum, isthme blanc, isthme rouge, utérus), ont été collectés et directement plongés dans l'azote liquide. Les tissus ont été conservés à-80°C en cryo-tubes jusqu'à l'extraction des ARNs (RNA now™).

Du fluide utérin a été recueilli par l'induction de l'expulsion de l'œuf par injection de 50 µg de prostaglandine-F2α durant la phase de minéralisation (Gautron et al., 1997). Une partie du fluide utérin a été diluée dans du tampon phosphate (PBS, 5 :1 (v : v)) et immédiatement utilisée pour la purification des vésicules extracellulaires. Le reste du fluide utérin a été déposé dans l'azote liquide de manière à obtenir des billes cryo-conservées pour l'analyse au microscope. Afin de contrôler le profil protéique du fluide récolté, une aliquote a été collectée et diluée dans du tampon Laemmli pour électrophorèse SDS-PAGE.

Les vésicules extracellulaires ont été purifiées du fluide utérin par un système de centrifugations en

série. Le fluide utérin dilué dans du PBS a d'abord été centrifugé à 100 g pendant 15 min puis à 12 000 g pendant 15 min pour éliminer les débris cellulaires. Après ces étapes, deux centrifugations successives de 90 min à 100 000 g ont été effectuées afin de culoter les vésicules. Le culot vésiculaire a ensuite été suspendu dans du PBS et conservé à -20°C jusqu'à son analyse par Western Blot.

Le fluide utérin et la fraction vésiculaire ont été dilués dans du tampon Laemmli et soumis à une électrophorèse SDS-PAGE en gel de polyacrylamide à 12 %. Les protéines séparées ont été transférées sur membranes de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées avec un anticorps anti-EDIL3 (rabbit polyclonal; SAB2105802, Sigma-Aldrich) puis un anticorps secondaire Alexa Fluor® 680 (Invitrogen) avant d'être révélées à l'aide d'un imageur à infrarouge (LI-COR Odyssey®imaging system).

Les ARNs totaux ont été extraits à partir des tissus congelés et ont ensuite été soumis à un traitement à la DNAse du kit TURBO DNA-free™ (Invitrogen) permettant d'éliminer l'ADN génomique restant. La concentration des ARNs a été mesurée par absorption à 260 nm au NanoDrop™. Les ADNc ont été synthétisés en utilisant des Oligo(dT)™ (Promega) et une transcriptase inverse Superscript II™ (Promega). L'expression des gènes a été évaluée par High Throughput quantitative PCR (Fluidigm Biomark HD) sur les ADNc. Les ADNc ainsi que les couples d'amorces permettant d'amplifier une portion des gènes cibles vésiculaires *edil3*, *anxa1*, *anxa2* et *pdcd6ip* ont été utilisés pour analyser l'expression quantitative de ces gènes pour chaque tissu et segment d'oviducte. L'expression des gènes est exprimée en quantité relative de chaque transcript cible normalisée par la moyenne de quantité de transcripts de huit gènes de ménage par l'intermédiaire du logiciel GenNorm. Les niveaux d'expression des gènes étudiés ont été comparés dans différentes situations physiologiques, à l'aide d'une analyse de variance suivie d'une comparaison par paire (Tukey).

Une bille de fluide utérin prélevée durant la minéralisation de la coquille a été déposée congelée sur une grille en Nickel pour observation en microscopie électronique. La préparation a été contrastée avec de l'acétate d'uranyle aqueux 2% et immédiatement observée au microscopie électronique à transmission (TEM-1400 Plus electron microscope-JEOL). Une analyse élémentaire a été réalisée avec le mode STEM du microscope électronique de manière à obtenir une cartographie des éléments chimiques présents dans les vésicules observées.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Surexpression de gènes vésiculaires dans les segments de l'oviducte responsables de la minéralisation

L'expression de 4 gènes vésiculaires cibles (*edil3, anxa1, anxa2 et pdcd6ip*) a été mesurée (i) dans les régions de l'oviducte impliquées dans la minéralisation de la coquille (isthme rouge et utérus) et dans la formation des membranes coquillières (isthme blanc), (ii) dans l'os et (iii) dans d'autres tissus et segments non impliqués dans la minéralisation (duodénum, rein, foie et magnum).
On observe une surexpression des 4 gènes vésiculaires dans les segments de l'oviducte impliqués dans la formation de la coquille (isthmes rouge et blanc, utérus ; Tableau.1). Le gène *edil3* est surexprimé dans les trois segments de l'oviducte impliqués dans la formation de la coquille. Le niveau d'expression d'*Anxa1* est maximum dans l'isthme rouge, qui est le lieu de l'initiation de la minéralisation. Ce niveau reste élevé dans l'isthme blanc, lieu de formation des membranes coquillières et plus faiblement dans l'utérus, l'os et le magnum (lieu de formation du blanc). *Anxa2* est exprimé à un niveau comparable à celui d'*Anxa1,* avec toutefois une expression maximum dans l'utérus et l'isthme rouge, mais aussi dans le duodenum. Le gène marqueur vésiculaire *pdcd6ip* est exprimé dans l'ensemble des tissus et segments testés et on note une surexpression dans l'utérus et l'isthme rouge (p-value < 0.05). Ces résultats ainsi que les données bibliographiques montrant la présence des protéines ANXA1, ANXA2 et PDCD6IP dans les vésicules de l'os (Shapiro et al., 2015), confortent l'hypothèse de l'implication de vésicules extracellulaires dans la minéralisation de la coquille. La base de donnée Vesiclepedia, qui recense les protéines vésiculaires les plus fréquemment retrouvées (www.microvesicles.org/), mentionne la protéine PDCD6IP comme étant le plus important marqueur vésiculaire. Sa surexpression dans l'utérus et l'isthme rouge confirmerait donc l'implication du transport vésiculaire lors de la formation de la coquille.
Ces données et des éléments bibliographiques nous ont permis de proposer des rôles pour les protéines EDIL3, ANXA1 et ANXA2. EDIL3 présente des domaines fonctionnels qui lui permettraient de se lier à la fois aux phospholipides de la vésicule et au calcium. Elle participerait à l'adressage des vésicules au niveau des sites de nucléation de la minéralisation. Les protéines ANXA1 et ANXA2 joueraient le rôle de canaux permettant l'entrée de calcium dans les vésicules (Rojas et al., 1992 ; Kirsch et al., 2000). Ce système vésiculaire minéralisant nécessite que le gaz carbonique du fluide utérin alimente la vésicule en carbonate. L'anhydrase carbonique CA4 pourrait intervenir dans ce phénomène (Sauer et al., 1994).

Ainsi, il est possible que le carbonate de calcium vésiculaire soit formé sous forme amorphe et que les vésicules endossent le rôle de stabilisateurs lors de son acheminement jusqu'au site de minéralisation.

2.2 Identification et composition des vésicules extracellulaires dans le fluide utérin

Afin de vérifier cette hypothèse, la présence de vésicules a été explorée dans le fluide utérin, par microscopie électronique à transmission. Les images obtenues ont permis de visualiser des vésicules extracellulaires en nombre important. Les vésicules observées possèdent une taille moyenne de ~ 300 nm (Figure 1A). L'aspect morphologique de ces vésicules est comparable à celui des vésicules identifiées dans l'os (Thouverey et al., 2009).
Des Western Blots réalisés avec des anticorps spécifiques ont confirmé la présence d'EDIL3 au niveau de la fraction vésiculaire (Figure 1B).
La présence de calcium intra-vésiculaire a été recherchée par analyse élémentaire couplée à la microscopie électronique à transmission. La cartographie d'élément obtenue démontre clairement la présence de calcium intra-vésiculaire. On observe également la présence d'oxygène et de carbone dans les vésicules.

CONCLUSION

A travers différentes approches, cette étude a permis de mettre en évidence le rôle de vésicules extracellulaires dans le transport de carbonate de calcium sur le site de la minéralisation de la coquille de l'œuf de poule. Les mesures d'expression génique confirment une activé vésiculaire sur le site de la minéralisation, et les résultats des Western Blots et de l'analyse élémentaire démontrent la présence de carbonate de calcium et de matière organique dans les vésicules extracellulaires. Ces vésicules contiendraient de l'ACC, qui serait stabilisé par la matrice organique. Ces vésicules seraient adressées au site de minéralisation de par leur liaison à EDIL3. Des analyses complémentaires seront nécessaires pour confirmer la forme carbonate de calcium identifiée dans les vésicules, la présence d'autres acteurs protéiques et ainsi valider cette hypothèse de transport sur le site de minéralisation par l'intermédiaire de protéines guides. Les protéines ainsi identifiées pourront être confrontées aux protéomes des vésicules de l'os (Balcerzak et al., 2008 ; Rosenthal et al., 2011).
A terme, les données obtenues permettront sur la base de leur polymorphisme, la sélection de marqueurs biologiques de la minéralisation. Leur potentiel d'utilisation en sélection génomique devra être exploré par des études d'association.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient, l'université François Rabelais de Tours, la région Centre Val de Loire, la plateforme IBiSA de Microscopie Electronique de l'Université de Tours pour son expertise et l'UE PEAT pour le soin et la prise en charge des animaux.

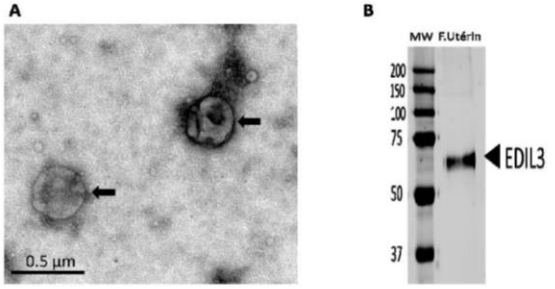
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Addadi L., Raz S., Weiner S., 2003. *Adv Mater*, (15), 959-70
Balcerzak M., Malinowska A., Thouverey C., Sekrecka A., Dadlez M., Buchet R., Pikula S., 2008. *Proteomics*, (8), 192-205
Brecevic L., Nielsen A.E., 1989. *J Cryst Growth*, (98), 504-10
Dennis J.E., Xiao S.Q., Agarwal M., Fink D.J., Heuer A.H., Caplan A.I., 1996. *J Morphol*, (228), 287-306
Flores R.L., Livingston B.T., 2017. *Bmc Evol Biol*, (1), 17-125
Gautron J., Hincke M.T., Nys Y., 1997. *Connect Tissue Res*, (36), 195-210
Gautron J., 2018. *Compte rendu de fin de projet, ANR IMPACT*, 17p
Hasegawa T., Yamamoto T., Tsuchiya E., Hongo H., Tsuboi K., Kudo A., Abe M., Yoshida T., Nagai T., Khadiza N., Yokoyama A., Oda K., Ozawa H., de Freitas P.H.L., Li M., Amizuka N., 2017. *Jpn Dent Sci Rev*, (53), 34-45
Kirsch T., Harrison G., Golub E.E., Nah H.D., 2000. *J Biol Chem*, (275), 35577-83
Mahamid J., Sharir A., Gur D., Zelzer E., Addadi L., Weiner S., 2011. *J Struct Biol*, (174), 527-35
Nys Y., Hincke M.T., Arias J.L., Garcia-Ruiz J.M., Solomon S.E., 1999. *Poult Avian Biol Rev*, (10), 143-66
Nys Y., Gautron J., Garcia-Ruiz J.M., Hincke M.T., 2004. *Cr Palevol*, (3), 549-62
Rodriguez-Navarro A.B., Marie P., Nys Y., Hincke M.T., Gautron J., 2015. *J Struct Biol*, (190), 291-303
Rojas E., Arispe N., Haigler H.T., Burns A.L., Pollard H.B., 1992. *Bone Miner*, (17), 214-8
Rosenthal A.K., Gohr C.M., Ninomiya J., Wakim B.T., 2011. *Arthritis Rheum-Us*, (63), 401-11
Sauer G.R., Genge B.R., Wu L.N., Donachy J.E., 1994. *Bone Miner*, (26), 69-79
Shapiro I.M., Landis W.J., Risbud M.V., 2015. *Bone*, (79), 29-36
Tester C.C., Brock R.E., Wu C.H., Krejci M.R., Weigand S., Joester D., 2011. *Crystengcomm*, (13), 3975-8
Thouverey C., Bechkoff G., Pikula S., Buchet R., 2009. *Osteoarthr Cartilage*, (17), 64-72
Vidavsky N., Masic A., Schertel A., Weiner S., Addadi L., 2015. *J Struct Biol*, (192), 358-65
Waqas M.Y., Yang P., Ahmed N., Zhang Q., Liu T., Li Q., Hu L., Hong C., Chen Q., 2016. *Poultry Sci*, (95), 2112-9
Wyburn G.M., Johnston H.S., Draper M.H., Davidson M.F., 1973. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*, (58), 143-51
Ziegler A., 1994. *J Struct Biol*, (112), 110-6

Tableau 1. Mesure de l'expression de gènes vésiculaires dans plusieurs tissus et dans différents segments de l'oviducte.
Les valeurs d'expression ne partageant aucune lettre sont significativement différentes ($P < 0.05$).

		Tissus				Segments de l'oviducte			
Genes		Os	Duodenum	Rein	Foie	Magnum	Isthme blanc	Isthme rouge	Utérus
edil3		0.1875	0	0.00125	0	0	0.825	1.101	0.737
	Stat.	B	B	B	B	B	A	A	A
anxa1		0.2046	0.0015	0.0093	0.0004	0.1936	2.19	3.338	0.891
	Stat.	CD	D	D	D	CD	B	A	C
anxa2		0.3068	0.5208	0.0062	0.0009	0.543	1.208	2.884	1.904
	Stat.	CD	CD	D	D	CD	BC	A	AB
pdcd6ip		0.2128	1.1499	0.7271	0.4929	0.777	0.842	1.454	2.03
	Stat.	E	BC	CDE	DE	CD	CD	B	A

Figure 1. Transport vésiculaire impliqué dans la biominéralisation de la coquille d'œuf de poule.
A. Image de microscopie électronique des vésicules du fluide utérin avec coloration à l'acétate d'uranyle aqueux à 2 %. **B.** Western Blot avec l'anticorps anti-EDIL3 testé sur la fraction vésiculaire isolée du fluide utérin.



Prise de notes

Lilian STAPANE

Biominéralisation de la coquille d'œuf de poule : mise en évidence d'un transport vésiculaire impliquant les protéines EGF-like repeats and discoidin-like domains 3 (EDIL3) et Milk fat globule EGF-factor 8 (MFGE8)

Résumé

L'œuf de poule est une chambre aseptique et autosuffisante qui permet le développement harmonieux du poussin en 21 jours. La coquille constitue la première barrière physique de l'œuf et protège ce dernier contre les agressions physiques et microbiennes. Lors de la minéralisation de la coquille dans le fluide utérin, la matrice organique secrétée par l'utérus de la poule joue un rôle prépondérant. Pour décrypter le rôle de deux protéines majeures de la matrice organique (EGF-like repeats and discoidin-like domains 3 : EDIL3 et Milk fat globule EGF-factor 8 : MFGE8), différentes approches *in silico* et expérimentales ont été réalisées. Ainsi, nous avons retracé l'histoire évolutive de ces deux protéines, qui indique une divergence d'EDIL3 et MFGE8, il y a environ 480 millions d'années. Les résultats obtenus nous ont également permis de mettre en évidence un transport vésiculaire du minéral (carbonate de calcium amorphe), impliqué dans ce phénomène de biominéralisation. EDIL3 et MFGE8 joueraient un rôle prépondérant dans ce mécanisme en participant à l'adressage sur le site de minéralisation. Ce travail a été complété par une analyse des autres acteurs moléculaires du transport vésiculaire. Ces acteurs participent au fonctionnement vésiculaire, à l'apport du calcium et des bicarbonates vésiculaires, ainsi qu'à la stabilisation du carbonate de calcium amorphe. Pour finir, nous proposons un modèle global et cohérent du transport des précurseurs minéraux nécessaires à la minéralisation de la coquille. Ce modèle impliquerait trois voies (transcellulaire, vésiculaire et paracellulaire) dont les rôles respectifs devront être explorés.

Mots clefs : Coquille d'œuf, biominéralisation, protéines, vésicules, transport, minéral

Résumé en anglais

The chicken egg is an aseptic and a self-sufficient chamber allowing the harmonious development of the chicken embryo in 21 days. The eggshell is the first physical barrier of the egg, which protects the egg from mechanical and microbial stresses. During eggshell biomineralization in the uterine fluid, the organic matrix, which is secreted by the uterus, ensures a crucial role in this process. To decipher the role of two major proteins of the organic matrix (EGF-like repeats and discoidin-like domains 3 : EDIL3 et Milk fat globule EGF-factor 8 : MFGE8), *in silico* and experimental approaches were performed. We firstly investigated the common evolution history of EDIL3 and MFGE8. We have estimated a divergent point between both paralogs 480 million years ago. The results also allowed us to highlight a vesicular transport of mineral (amorphous calcium carbonate) involved in eggshell biomineralization. EDIL3 and MFGE8 proteins would guide the vesicles to the mineralizing site and consequently ensure a critical role in this transport. This work also described additional molecular actors involved in vesicles formation, in calcium and bicarbonates supply and to the stabilization of amorphous calcium carbonate. We therefore proposed a global and coherent model of mineral transport during eggshell calcification. In this model, three alternative pathways could be involved (transcellular, vesicular and paracellular). Further investigations will be necessary to determine the respective roles of these pathways.

Keywords: eggshell, biomineralization, proteins, vesicles, transport, mineral