



**Année 2015-2016 - Demande d'allocation doctorale  
ED Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV) n°549**

**1. Informations administratives :**

Nom de l'encadrant responsable de la thèse : GAUTRON Joël  
Unité : INRA, UR83 Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly  
Equipe Fonction et Régulation des Protéines de L'Œuf (FRPO)  
Email de l'encadrant : joel.gautron@tours.inra.fr

Co-encadrant éventuel :

**2. Titre de la thèse : Rôle de protéines cibles dans le processus de biominéralisation de la coquille d'oeuf de poule**

**3. Résumé :**

L'œuf de poule constitue une chambre aseptique et auto-suffisante pour permettre le développement extra-utérin de l'embryon des oiseaux. Il est composé d'un ovocyte entouré de réserves nutritionnelles (jaune et blanc), et de la coquille comme enveloppe protectrice pour empêcher toutes pénétrations microbiennes dans les compartiments internes de l'œuf. La coquille est un biominéral constitué de 95 % de carbonate de calcium sous forme de calcite et de 3.5 % de protéines et de protéoglycanes qui constituent sa matrice organique. Sa formation résulte d'un processus de biominéralisation contrôlé qui se produit dans un espace confiné par interaction de la phase minérale avec les constituants de la matrice organique.

Récemment, nous avons obtenu des avancées importantes sur les mécanismes de minéralisation de la coquille et décrit précisément la régulation dans le temps et l'espace des événements clés de la biominéralisation (Rodriguez-Navarro et al., 2015). Le minéral s'accumule initialement sur les membranes coquillières et sur les sites de nucléation (noyaux mamillaires), sous forme de carbonate de calcium amorphe (ACC). L'ACC constitue un intermédiaire précoce et transitoire qui se dissout rapidement et fournit une source d'ions pour former la calcite qui est un polymorphe cristallin du carbonate de calcium. Ces unités de calcite s'agrègent en de plus grandes unités cristallines et forment ensuite une couche compacte (couche palissadique) faite de colonnes de cristaux présentant une orientation préférentielle perpendiculaire à la surface. La coquille est donc formée par agrégation de particules d'ACC rapidement transformées en cristaux de calcite. Ce processus favorise une minéralisation rapide au cours des différentes phases du processus de calcification et l'élaboration d'une structure complexe donnant à la coquille son ultrastructure et ses propriétés mécaniques remarquables.

La matrice organique joue un rôle clé dans ce processus de par sa capacité à stabiliser l'ACC, à déterminer le polymorphe cristallin, la morphologie et la taille des cristaux. C'est pourquoi dans un second temps, nous avons conduit des approches de protéomiques

quantitatives pour identifier environ 300 protéines de la matrice organique surabondantes lors de ces événements clés de la minéralisation (Marie et al., 2015a, 2015b). Parmi celles-ci, on note plus particulièrement la présence de 21 protéines présentant à la fois des concentrations élevées dans la coquille et des surabondances lors de ces événements clés et des fonctions biologiques prédites étroitement associées à la biominéralisation.

Dans ce contexte, le projet de thèse vise à **caractériser et à valider expérimentalement la fonction associée à la biominéralisation de protéines de la matrice organique surabondantes au cours des événements clés du processus de calcification de la coquille**. Nous nous focaliserons sur un nombre restreint de candidats protéiques (environ 3). Il s'agira d'établir un lien entre la solidité de la coquille, le niveau d'abondance et d'expression de ces protéines, à différents stades de la minéralisation ou selon divers facteurs physiologiques (âge, génétique...), ainsi que leur régulation génétique. À terme, il s'agira de hiérarchiser les protéines qui jouent un rôle prépondérant dans la détermination de l'ultrastructure de la coquille qui définissent les propriétés mécaniques de la coquille.

L'essentiel des matériels, ressources et expertises nécessaires est présent au sein de l'unité d'accueil INRA, UR83 Recherches Avicoles. Les méthodes envisagées incluent la purification de protéines, des mesures de l'interaction matrice-minéral et notamment leur rôle dans la stabilisation de l'ACC et la détermination de la morphologie des cristaux par des techniques physiques adaptées (Xanes, Spectrométrie Raman, XRD...) (collaboration université de Grenade, Espagne). Les autres approches envisagées sont la production d'anticorps, le western blot et l'immunohistochimie, ainsi que les méthodes moléculaires pour étudier la variation d'expression des gènes codant ces protéines. Par ailleurs l'étude de la régulation de l'expression génique et des polymorphismes de ces gènes sera réalisée avec l'équipe génétique (SAQSE) au sein de l'unité.

#### **4. Résumé en anglais :**

The chicken egg is a sterile, self-sufficient close chamber to allow the embryonic extra uterine development. The egg is composed of an oocyte surrounded by nutritional reserves (egg white and yolk), and of the eggshell as protective envelope to avoid any bacterial penetration in the internal part of the egg. The shell is a biomineral made of 95% calcium carbonate and of 3.5% of proteins and proteoglycans which constitute its organic matrix.

We have reported recently major advances on the mechanisms of the mineralization of the shell. We have precisely described the spatio-temporal regulation of the key events of the shell mineralization (Rodriguez-Navarro et al., 2015). Mineral first accumulate as amorphous calcium carbonate (ACC) on specific nucleation sites on eggshell membranes. ACC is an early transient phase which rapidly evolved to supply ions to form the calcite which is the calcium carbonate crystal polymorph present in the shell. These calcitic units then aggregate in larger calcite crystals to form a compact palisade layer made of column of crystals with a preferred orientation perpendicular to the surface. Shell is therefore the result of the assembly of the aggregation of ACC particles in calcite crystals to allow a very fast controlled process during the different step of shell calcification and also to obtain a complex ultrastructure to the eggshell which determines its resulting mechanical properties.

Organic matrix proteins are known to play a key role in this process, by stabilizing the ACC, determining crystalline polymorph its morphology and crystal size. In such a context, we have performed quantitative proteomics to identify about 300 organic matrix proteins overabundant at the pivotal stages of shell mineralization (Marie et al., 2015a, 2015b). Amongst them, we have highlighted 21 proteins highly concentrated in the shell and overabundant at these pivotal stages. These proteins also exhibited predicted biological activities related to the biomineralisation process.

The present project will aim to **characterize and experimentally validate functional activities related to biomineralisation of organic matrix proteins overabundant at pivotal stages of eggshell calcification**. We only focus to a restricted number of proteins (about 3) for this thesis project. The aim will be to establish relationships between eggshell solidity, the level of abundance and expression of both proteins and coding transcripts at different stages of shell mineralization, or according to various physiological states (age, genetic factors...). The genic regulation will also be explored. This study will help to establish a hierarchy in proteins playing a crucial role in determining the shell ultrastructure and consequently eggshell mechanical properties.

All materials, resources and skills are available in receiving laboratory INRA, UR83, Recherches Avicoles. Methods will include protein purifications, determination of the mineral-matrix interaction, and notably protein roles to stabilize ACC and to determine crystals morphologies using specific physical methods (Xanes, Raman spectrometry, XRD...) (Collaboration with the university of Granada, Spain). Additional methods will be the production of antibodies, western blot, immunohistochemistry, and molecular methods to explore the variation of expression of transcripts coding eggshell matrix proteins. Furthermore, the study of the genic regulation and of associated gene polymorphisms will be explored in collaboration with the genetic team (SAQSE) present in the receiving laboratory.

#### **5. Thèses encadrées au cours des 4 dernières années (par l'encadrant et l'éventuel co-encadrant) :**

Nom du doctorant : [MARIE Pauline](#)  
Encadrant responsable de la thèse : [GAUTRON Joël](#)  
Date de début - date de soutenance : [Novembre 11 – mai 2015](#)  
Financement de la thèse : [100 % Région](#)  
Publications de l'étudiant en 1<sup>er</sup> auteur : [4](#)  
Brevets :  
Devenir de l'étudiant après la thèse : [Recherche de post-doc](#)

#### **6. Thèses en cours (par l'encadrant et l'éventuel co-encadrant) :**

Nom du doctorant :  
Encadrant responsable de la thèse :  
Date de début - date de soutenance :  
Financement de la thèse :  
Publications de l'étudiant en 1<sup>er</sup> auteur :  
Brevets :

#### **7. Cinq publications principales ou brevets de l'encadrant (et de l'éventuel co-encadrant) au cours des 4 dernières années :**

[Du, J., Hincke, M.T., Rose-Martel, M., Hennequet-Antier, C., , Brionne, A., Cogburn, L.A., Nys, Y., Gautron, J. \(2015\). Identifying specific proteins involved in eggshell membrane formation using gene expression analysis and bioinformatics. BMC Genomics, 16, 792.](#)

[Marie, P., Labas, V., Harichaux, G., Rodriguez-Navarro, A.B., Nys, Y., Gautron, J. \(2015a\). Quantitative proteomics provides new insights into chicken eggshell matrix protein functions during the primary events of mineralisation and the active calcification phase. Journal of Proteomics, 126, 140-154](#)

Marie, P., Labas, V., Brionne, A., Harichaux, G., Hennequet-Antier, C., Nys, Y., **Gautron, J.** (2015b). Quantitative proteomics and bioinformatic analysis provide new insight into protein function during avian eggshell biomineralization. *Journal of Proteomics*, 113, 178-193.

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

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, 220.

**8. Principaux contrats de recherche obtenus par l'encadrant (et l'éventuel co-encadrant) au cours des 4 dernières années :**

ANR IMPACT (Identification of Matrix Proteins Affecting Calcite Texture in chicken and guinea fowls eggshells). **J. Gautron**, coordinateur (2013-2017) ANR-13-BSV6-007)

**9. Autres thèses en cours au sein de l'équipe :**

Nombre d'HDR dans l'équipe	<b>3</b>			
Détail des étudiants en thèse dans l'équipe (Nom des encadrants et calendrier de ces thèses)	Nom étudiant	Dates : début et fin de thèse	Nom de l'encadrant (en gras) et éventuel co-encadrant (entre parenthèses)	Financement de la thèse
	Da Silva Mylène	Novembre 2014- Octobre 2017	<b>Nys Y</b> (Réhault-Godbert S.)	Région

**10. Remarques éventuelles à signaler :**