Effet de la température, du temps de stockage et du développement embryonnaire sur les activités antimicrobiennes du blanc d'oeuf

Sophie Réhault-Godbert, Florence Baron, Michel Gautier, Y. Nys

▶ **To cite this version:**

Sophie Réhault-Godbert, Florence Baron, Michel Gautier, Y. Nys. Effet de la température, du temps de stockage et du développement embryonnaire sur les activités antimicrobiennes du blanc d'oeuf. 8èmes Journées de la Recherche Avicole, Mar 2009, Paris (FR), France. hal-00729179

HAL Id: hal-00729179

https://institut-agro-rennes-angers.hal.science/hal-00729179

Submitted on 17 Jan 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

EFFET DE LA TEMPERATURE, DU TEMPS DE STOCKAGE ET DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE SUR LES ACTIVITES ANTIMICROBIENNES DU BLANC D'OEUF

Réhault-Godbert Sophie[1], Baron Florence[2], Michel Gautier [2] et Nys Yves[1]

[1]UR83 Recherches Avicoles, équipe « Fonction et Régulation des Protéines de l'œuf » INRA – Tours- F-37380 NOUZILLY
[2]UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'œuf, Agrocampus Ouest-Centre de Rennes/INRA, équipe « Hygiène Alimentaire-65 rue de Saint Brieuc-F35042 RENNES

RÉSUMÉ

L'oeuf renferme de nombreuses molécules contribuant à la protection de l'embryon, qui limitent en outre les toxi-infections alimentaires liées à sa consommation (Salmonelloses). Certaines sont connues dans le blanc d'œuf (lysozyme, ovotransferrine) mais il existe d'autres protéines, telles que les antiprotéases, qui pourraient participer à la défense de l'œuf. La régulation de leurs activités dans le blanc d'oeuf reste méconnue.
Dans ce contexte, nous avons analysé l'activité bactériostatique et antiprotéasique de différents blancs d'œufs non embryonnés (NE-E) conservés à 4°C, 20°C ou 37°C pendant 30 jours ou de blancs d'œufs embryonnés (E-E) incubés pendant 10 jours. Nous constatons que les blancs des œufs conservés à 37°C perdent leur activité bactériostatique contre *Salmonella* et leur potentiel antiprotéasique, dès 14 jours de conservation. Aucune différence d'activité n'est observée dans les œufs (NE-E) stockés à 4°C ou 20°C. Par ailleurs, on observe une diminution du potentiel antibactérien des blancs des œufs embryonnés au cours de l'incubation alors que les activités antiprotéasiques restent identiques. Ces résultats suggèrent que la perte du potentiel antibactérien (E-E) n'est pas due à l'activité des antiprotéases. Les analyses du blanc d'oeuf en SDS-PAGE ont révélé l'apparition de bandes nouvelles au cours de l'incubation des œufs à 37°C après 14 jours de conservation (NE-E) ou dès 4 jours d'incubation (E-E) mais l'analyse en spectrométrie de masse de ces bandes n'a pas permis d'identifier des molécules antimicrobiennes connues pouvant expliquer l'altération de l'activité bactériostatique observée.

ABSTRACT

Hen egg contains numerous molecules that participate to the protection of the embryo and that limit toxi-infections related to egg consumption (Salmonellosis). These proteins are mainly concentrated in the egg white. Some are well-characterized (lysozyme, ovotransferrin) but there are other constituents such as antiproteases that might have a role in innate defense of the egg. The regulation of their activity in egg remains unknown.
We therefore analyzed the bacteriostatic and antiproteases activities in different egg whites sampled from unfertile eggs (NE-E) stored at 4°C, 20°C or 37°C during 30 days or from fertile eggs (E-E) incubated during 10 days to allow embryonic development. We observed a diminution in the bacteriostatic and antiprotease activities in egg whites (NE-E) stored more than 14 days at 37°C whereas no significant difference was noticed in eggs stored at 4°C or 20°C. In parallel, we showed that egg whites from fertile eggs displayed lower antimicrobial activity from 4 days of incubation compared to non-fertile eggs, whereas no diminution in antiprotease activity could be observed. These data suggest that the lost of the antimicrobial activity (E-E) cannot be related to antiprotease activities. SDS-PAGE analysis of egg whites revealed new bands appearing at 37°C but mass spectrometry analysis of these molecules did not allow identification of known antimicrobial molecules that might be incriminated in the alteration of the antimicrobial potential of egg whites stored at 37°C for 14 days or egg whites collected from fertile eggs incubated more than 4 days.

INTRODUCTION

L'œuf se compose d'une grande diversité de nutriments et de molécules actives « programmés » pour permettre le développement autonome d'un embryon dans un milieu potentiellement hostile. Outre des éléments nutritifs essentiels, on y trouve de multiples molécules participant au développement et à la protection de l'embryon qu'elle soit physique (coquille, membranes) ou chimique (molécules antibactériennes, antivirales, antioxydantes). Pour l'homme, l'œuf constitue une source remarquable de protéines mais représente également la principale cause de toxi-infections alimentaires (salmonelloses).
Les molécules antimicrobiennes de l'œuf sont principalement concentrées dans le blanc d'oeuf. Certaines ont une action directe sur le pathogène, comme le lysozyme qui dégrade le peptidoglycan bactérien, d'autres agissent indirectement en séquestrant des éléments essentiels à la croissance bactérienne telles que l'ovotransferrine, l'avidine ou la flavoprotéine (Masschalck et al., 2002; White, 1987). Le blanc d'oeuf contient également 4 antiprotéases dont l'activité antimicrobienne reste mal documentée (Réhault et al., 2007). La régulation de l'activité « antisalmonellique » et antiprotéase dans l'œuf est peu connue.
Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'effet de la température (4°C, 20°C, 37°C) et du stockage (du jour de ponte à 30 jours de stockage) sur les différentes activités du blanc d'oeuf. Nous avons dans un deuxième temps étudié la régulation de ces activités dans le blanc d'oeuf au cours des 10 premiers jours du développement embryonnaire.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1 Echantillons

Des oeufs non fertilisés (ISA Brown, Hendrix Genetics, St Brieuc, France) ont été collectés le jour de ponte (J0) et conservés pendant 30 jours à 4°C, 20°C ou 37°C. Aux jours 2, 5, 7, 9, 14, 20 et 30, les blancs ont été séparés des jaunes, homogénéisés (Ultra-Turrax) indépendamment les uns des autres, en conditions stériles et conservés à -20°C (10 oeufs par jour d'incubation et par traitement). Dans une seconde expérience, nous avons incubé des œufs embryonnés et des oeufs non embryonnés (37,7 °C, 45% d'hygrométrie et retournement toutes les heures) pendant 10 jours. Chaque jour, (J0, 1,2, 3, 4, 5 6, 7 8, 9, 10) 10 œufs par traitement ont été collectés et les blancs d'oeufs récupérés et traités comme décrit ci-dessus. Pour l'analyse des activités antiprotéasiques des échantillons une détermination de la quantité de protéines a été effectuée en utilisant la technique de DC Protein Assay (Biorad) avec la BSA comme standard de la gamme étalon.

1.2 Analyse de l'activité bactériostatique des blancs d'oeufs vis-à-vis des Salmonelles.

Une culture de *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis 9066 est décongelée puis repiquée dans du tryptone de soja 24h à 37°C. Des dilutions décimales dans du tryptone sel sont ensuite préparées puis inoculées à 2% dans du blanc d'œuf dans les puits d'une microplaque afin d'obtenir un inoculum final d'environ 10^3 bactéries/mL de blanc. Les microplaques contenant les échantillons de blanc d'oeuf inoculé sont incubées à 30°C pendant 72h avant dénombrement sur gélose par une microméthode (Baron et al., 2006). Les résultats sont exprimés en $\log_{10}$ CFU/mL de blanc.

1.3 Activités antiprotéasiques des échantillons

L'activité antitrypsique des blancs d'œufs a été évaluée en incubant l'échantillon (0,25 µg de protéines), 2 nM de trypsine dans du tampon Hepes (50mM) , NaCl 50mM, pH7,4 pendant 1 heure à 37°C avant addition de 0,15 mM du substrat chromogénique tosyl-Glu-Gly-Arg-pNA. L'hydrolyse du substrat a été suivie en fonction du temps par un enregistrement continu de l'absorbance à 410 nm correspondant à la libération du groupement para-nitroanilide (pNA). Le potentiel inhibiteur de l'échantillon se caractérise par une diminution de la pente comparativement au contrôle (Enzyme+substrat). De la même manière, l'activité antichymotrypsique des échantillons a été estimée en incubant 2,5 nM de chymotrypsine avec 10 µg de protéines à 37°C pendant 1 heure avant ajout de 0,3 mM du substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA. Pour l'étude des activités antipapaïniques , les expériences ont été réalisées dans du phosphate 0,1M pH6, EDTA 1 mM, DTT 2 mM avec 50 nM de papaïne, 25µg de protéines et 0,5 mM de substrat pGlu-Phe-Leu-pNA. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata.

1.4. Analyse des protéines du blanc d'oeuf par électrophorèse SDS-PAGE.

Les échantillons ont été dilués dans du tampon de Laemmli 5X en conditions non réductrices et analysés par SDS-PAGE 12,5% d'acrylamide. Les protéines ont été visualisées après coloration au bleu de Coomassie.

1.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des données ont été effectuées par une analyse de variance à deux facteurs suivie d'un test de Bonferroni en utilisant le logiciel StatView (SAS Institute Inc. version 5).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Effet du stockage à 4°C, 20°C ou 37°C

2. 1.1 Effet du stockage et de la température sur l'activité bactériostatique vis-à-vis de salmonelle.

L'activité antimicrobienne des blancs d'oeufs au cours de la conservation des oeufs (NE-E) à 4°C, 20°C ou 37°C pendant 30 jours est présentée Fig. 1A. Les résultats sont exprimés en log10 cfu/mL de blanc en fonction des jours de conservation. Une faible activité bactériostatique des échantillons se traduit par des valeurs en ordonnées élevées. Globalement, les analyses statistiques ont révélé un effet de la température ($p<0,0001$), de la durée de conservation ($p<0,0001$) et une interaction entre les deux paramètres ($p<0,0001$) sur l'activité anti-salmonelle.
Nous avons montré que l'activité anti-salmonelle des blancs d'œufs à J0 était significativement plus faible que celle des blancs d'œufs conservés pendant 2 à 9 jours ($p<0,0001$). Ces résultats peuvent s'expliquer par une augmentation rapide du pH du blanc d'oeuf au cours de la conservation (de pH 7,4 dans les œufs frais à pH 9 (Scott and Silversides, 2000)), des valeurs de pH basiques n'étant pas favorables à la croissance des salmonelles (Kang et al., 2006).
De manière surprenante, nous avons également montré que les œufs conservés à 20°C maintiennent un potentiel antibactérien élevé comparativement à ceux conservés à 4°C ou 37°C particulièrement après 14 jours de conservation ($p<0,02$). Ainsi, les oeufs stockés à 20°C avant inoculation possèdent une activité antimicrobienne plus importante que les oeufs conservés à 4°C. Il est à noter cependant que si un œuf est contaminé, on observera une prolifération plus importante des salmonelles si l'œuf est conservé à 20°C que s'il est conservé à 4°C (Chen et al., 2005).
Quant à l'effet de la conservation des oeufs à 37°C, nous avons montré que les oeufs conservés à 37 °C de 2 à 5 jours après la ponte ont une activité plus élevée comparée aux deux autres températures ($p<0,02$). Cette observation peut s'expliquer par le potentiel antimicrobien des nucléases du blanc d'oeuf qui sont actives à des températures élevées (Hytonen et al., 2003). Cependant, une durée de conservation plus longue à cette température (J12) s'accompagne d'une diminution de l'activité bactériostatique du blanc d'œuf ($p<0,02$) pouvant résulter d'une inactivation des protéines antimicrobiennes du blanc d'oeuf.

2. 1.2 Effet du stockage et de la température sur les activités antiprotéasiques.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés au potentiel antitrypsique et antichymotrypsique des blancs d'œufs. Les résultats des activités relatives par rapport à un contrôle sont présentés Fig. 1B et 1C. Plus les valeurs sont faibles plus le potentiel antiprotéasique de l'échantillon est fort. L'analyse statistique de l'activité antitrypsique (Fig. 1B) et antichymotrypsique (Fig. 1C) a révélé un effet de la température ($p<0,001$), et une interaction entre la température et la durée de conservation ($p<0,001$). Aucune différence significative n'a été observée entre les températures 4°C et 20°C. Par ailleurs, l'activité antitrypsique (Fig. 1B) et antichymotrypsique (Fig. 1C) des échantillons apparaissent fortement affectées au-delà de 14 et 20 jours de conservation à 37°C respectivement ($p<0,02$; $p<0,002$). Nous avons noté que l'activité antitrypsique des blancs d'oeufs conservés entre 5 et 14 jours à 20°C tendait à être plus importante comparés aux blancs d'oeuf conservés à 4°C ou 37°C durant cette même période. Nous avons également montré que l'activité antipapaïnique (Fig. 1D) des blancs d'oeuf dépendait de la température de conservation. ($p<0,001$). En effet, il semble que cette activité reste stable lorsque les oeufs sont stockés à 20°C alors qu'elle fluctue davantage dans les œufs stockés à 37°C ($p<0,002$) ou à 4°C.

2. 1.2 Effet du stockage et de la température sur le profil protéique des blancs d'oeuf

Aucune différence n'a pu être observée dans les profils électrophorétiques des protéines des blancs provenant d'œufs incubés à 4°C ou 20°C (résultats non présentés). En revanche, on observe l'apparition d'une bande protéique dans les blancs d'œufs dès deux jours d'incubation suivie de plusieurs bandes à partir de 12 jours d'incubation (Fig. 1E). Ces bandes ont été analysées par spectrométrie de masse. Cette étude a permis de mettre en évidence la présence de l'ovalbumine, ce qui suggère que cette protéine est dégradée ou que sa conformation a été modifiée au cours de l'incubation à 37°C. Cette observation confirme des études antérieures qui ont montré un passage de la forme ovalbumine à la forme S-ovalbumine au cours du stockage ou après exposition à des températures élevées (Smith and Back, 1962).

Comme attendu, la conservation des oeufs à 37°C a un effet négatif sur les potentiels anti-salmonelles et antiprotéasiques des blancs d'œufs. Il sera intéressant d'étudier la corrélation entre ces deux activités afin d'évaluer la part de l'activité des antiprotéases dans le potentiel anti-salmonelles des blancs d'œufs. Par ailleurs, l'analyse en SDS-PAGE et par spectrométrie de masse des échantillons a révélé une altération de l'ovalbumine à 37°C. Les analyses et données bibliographiques actuelles ne nous permettent pas de conclure sur la relation potentielle entre l'apparition de ces dérivés d'ovalbumine et la dégradation des propriétés antibactérienne du blanc d'oeufs à 37°C.

2.2. Effet du développement embryonnaire

2. 2.1 Effet du développement embryonnaire sur l'activité bactériostatique vis-à-vis de salmonelle.

Les études préliminaires des données montrent que les blancs des œufs embryonnés perdent leur potentiel antibactérien vis-à-vis des salmonelles dès 4 jours d'incubation (Fig. 2). Les analyses statistiques de ces

résultats sont en cours.

2. 2.2 Effet du développement embryonnaire sur les activités antiprotéasiques du blanc d'oeuf.

Nous avons observé un effet du développement embryonnaire sur l'activité antitrypsique ($p<0,02$) mais pas sur l'activité antichymotrypsique (résultats non présentés). Aucune interaction entre le jour d'incubation et le développement embryonnaire n'a été mise en évidence. L'activité antitrypsique et antichymotrypsique des blancs d'oeufs embryonnés incubés pendant 24 heures tend à être plus importante que celle des blancs d'œufs non embryonnés ($p=0,07$ et $p=0.1$ respectivement). Seule l'activité antitrypsique des œufs embryonnés incubés pendant 10 jours est significativement différente de celle des œufs non embryonnés ($p<0,05$). Cette tendance est également observée pour l'activité antichymotrypsique des œufs embryonnés incubés pendant 10 jours. Quant à l'activité antipapaïnique, on observe également un effet du développement embryonnaire ($p<0,02$). En effet, nous notons que l'activité antipapaïnique des blancs d'oeufs embryonnés incubés pendant 8 jours est plus élevée comparativement à celle des œufs non embryonnés ($p<0,005$), observation qui tend à perdurer jusqu'à 10 jours d'incubation (résultats non présentés).

En résumé, nous avons montré un effet du développement embryonnaire sur les propriétés antibactériennes du blanc d'œuf en particulier après 4 jours d'incubation. Nous n'avons pas observé de corrélation évidente entre ces résultats et l'activité antiprotéasique de ces mêmes blancs d'œufs. De même, l'analyse des profils protéiques des œufs embryonnés *versus* non embryonnés n'a pas permis d'identifier d'espèces moléculaires susceptibles d'expliquer cette perte du potentiel antibactérien, les profils étant similaires entre les deux conditions (résultats non présentés).

CONCLUSION

Les résultats montent que la conservation des oeufs à 37°C altère l'activité anti-salmonelles et antiprotéasique (en particulier antitrypsique et antichymotrypsique) des blancs d'oeufs. Ces résultats suggèrent qu'il pourrait y avoir une corrélation entre ces deux activités. Il serait également pertinent d'évaluer l'impact de la modification de l'ovalbumine à cette température et au cours de l'incubation sur ces activités et notamment sur l'activité antibactérienne : l'apparition d'espèces moléculaires dérivées de l'ovalbumine et présentant un profil électrophorétique différent joue t-elle un rôle dans la perte du potentiel antibactérien des blancs d'oeufs et/ou témoigne t-elle de l'effet dénaturant d'une conservation des œufs à 37°C ?
L'analyse de l'activité bactériostatique des blancs provenant d'œufs embryonnés a révélé de manière intéressante et inattendue, une rapide et nette diminution du potentiel antibactérien des blancs d'oeufs embryonnés dès 4 jours d'incubation. Les analyses actuelles ne nous permettent pas de relier cette perte d'activité à une perte du potentiel antiprotéasique du blanc d'œuf ou à des modifications du profil protéique des échantillons (la faible dénaturation de l'ovalbumine est visible dans les deux conditions embryonnés *versus* non embryonnés).

En conclusion, il reste à définir si les altérations du potentiel antibactérien observés dans l'expérience à 37°C et l'expérience sur les œufs embryonnés ont la même origine ou si les deux phénomènes font appel à des paramètres différents (altération de protéines antibactériennes qu'il restera à identifier, modification du pH dans les blancs d'œufs embryonnés…).

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent sincèrement à remercier Maryse Mills, Aurélien Brionne et Fabienne Gonnet pour leur contribution technique à ces travaux, l'Unité Expérimentale « Pôle Expérimental Avicole de Tours » et en particulier Frédéric Mercerand et Mario Tanzi pour avoir pris en charge l'incubation des œufs. Ces travaux ont été réalisés et financés par la commission européenne dans le cadre du STREP RESCAPE", contrat n° 036018, 6th Framework Programme, Priority 5, Food quality and Safety.".

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Baron, F., Cochet, M. F., Ablain, W., Grosset, N., Madec, M. N., Gonnet, F., Jan, S., Gautier, M., 2006. Le Lait, (86), 251-257.
Chen, J., Shallo Thesmar, H., Kerr, W. L., 2005. J. Food Prot., (68), 2553-8.
Hytonen, V. P., Laitinen, O. H., Grapputo, A., Kettunen, A., Savolainen, et al., 2003. Biochem. J., (372), 219-25.
Kang, H., Loui, C., Clavijo, R. I., Riley, L. W., Lu, S., 2006. Epidemiol. Infect. (134), 967-76.
Masschalck, B., Deckers, D., Michiels, C. W., 2002. J. Food Prot., (65), 1916-1923.
Réhault, S., Anton, M., Nau, F., Gautron, J., Nys, Y., 2007. INRA Prod. Anim., (20), 337-348.
Scott, T. A., Silversides, F. G., 2000. Poult. Sci., (79), 1725-9.
Smith, M. B., Back, J. F., 1962. Nature, (193), 878-9.
White, H. B., 3rd, 1987. J. Exp. Zool., Suppl 1, 53-63.

Figure 1. Effet de le température et du temps de stockage sur l'activité anti-salmonelles, antiprotéasique et sur le profil protéique des blancs d'œuf. A. Activité antisalmonellique ; B. Activité antitrypsique ; C. Activité antichymotrypsique ; D. Activité antipapaïnique ; E. Analyse SDS-PAGE des blancs d'oeufs incubés à 37°C pendant 10 jours. Le trait en pointillés apparaissant Fig. 1A donne la valeur approximative de l'inoculum initial. La figure 1E est représentative de 10 séries d'échantillons différentes. Pour les activités antiprotéasiques (B, C, D) plus les valeurs sont faibles plus le potentiel antiprotéasique de l'échantillon est fort.

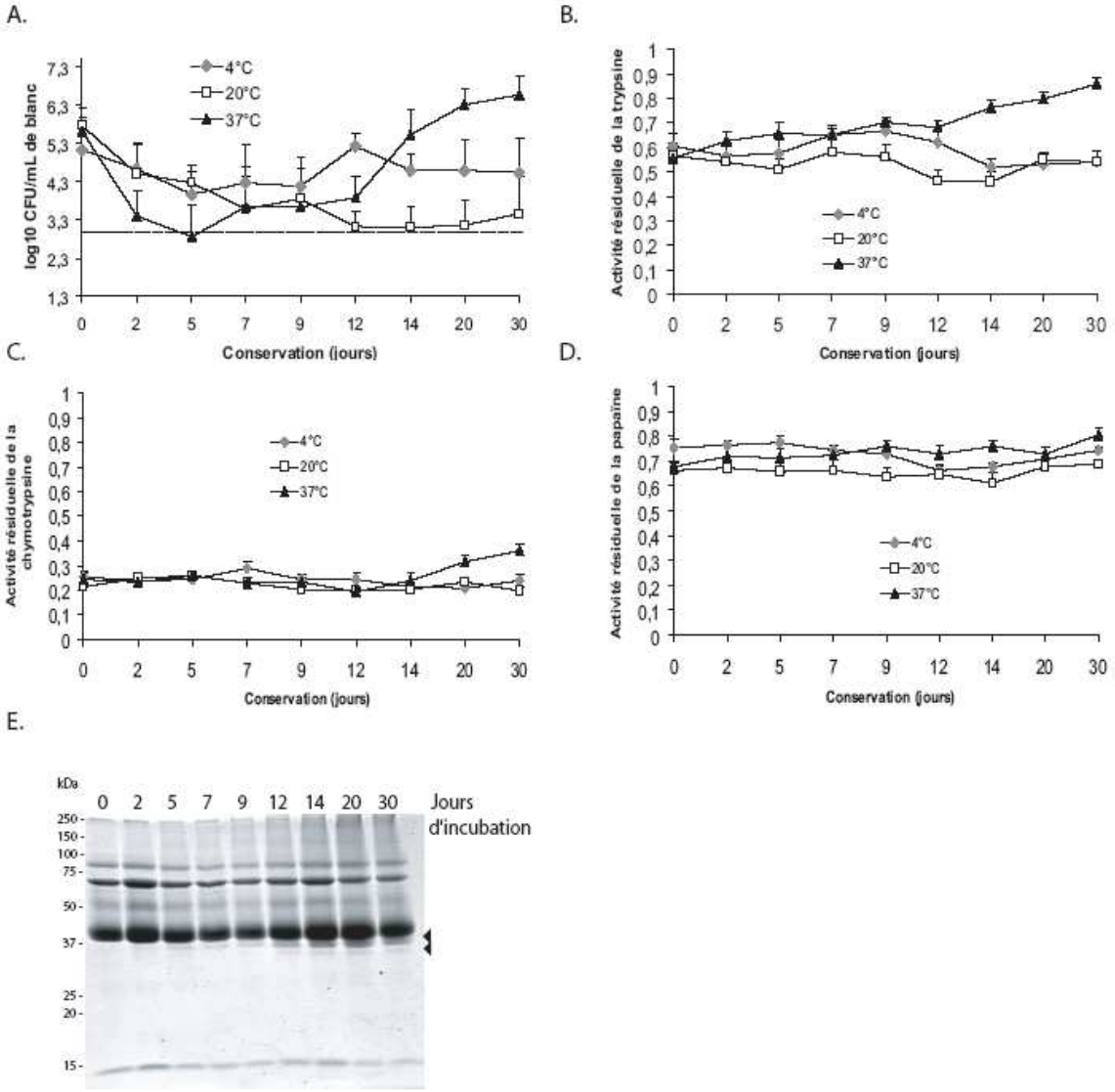
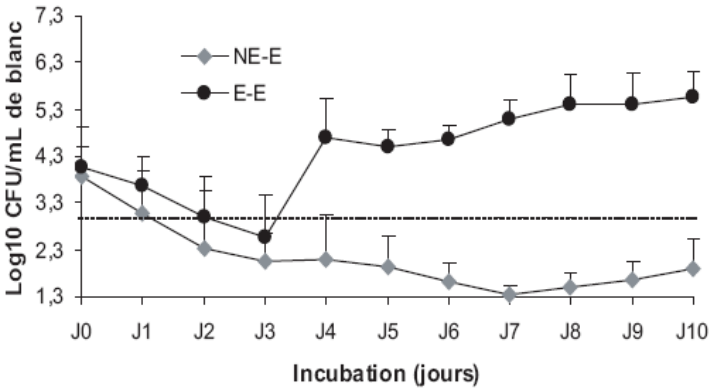
Figure 2. Effet du développement embryonnaire sur l'activité anti-salmonelles du blanc d'œuf. Le trait en pointillés donne la valeur approximative de l'inoculum initial.