

ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DU BLANC D'ŒUF AU COURS DE L'INCUBATION

**Nicolas Guyot¹, Cindy Slugocki², Aurélien Roche¹, Camille Berthault², Joël Gautron¹,
Emmanuelle Helloin², Yves Nys¹, Sophie Réhault-Godbert¹**

¹*INRA UR83 Recherches Avicoles, Fonction et Régulation des Protéines de l'Œuf,
F-37380 Nouzilly, France*

²*INRA UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, Centre International
de Ressources Microbiennes-Bactéries Pathogènes, F-37380 Nouzilly, France*

nguyot@tours.inra.fr

RÉSUMÉ

L'objectif de cette étude est de suivre l'évolution du pouvoir antibactérien du blanc d'œuf au cours de l'incubation. Des œufs embryonnés (E) et non fertilisés (NF) ont été mis en incubation pendant différentes périodes (0, 4, 8 et 12 jours) et les blancs issus de ces œufs ont été analysés pour leur pH, leur contenu protéique et pour leurs activités antibactériennes contre 5 souches pathogènes. Les résultats montrent que le pH du blanc d'œuf varie différemment entre les œufs NF et E. La concentration en protéines du blanc d'œuf reste stable au cours de l'incubation pour les œufs NF mais augmente significativement pour les œufs E. A concentration protéique identique et pour un temps d'incubation donné, les activités du blanc d'œuf contre *Listeria monocytogenes* et *Streptococcus uberis* sont semblables entre les lots NF et E. Une diminution progressive de ces activités est néanmoins observée en fonction du temps d'incubation, quel que soit le lot d'œuf (NF ou E). L'analyse SDS-PAGE des protéines du blanc d'œufs embryonnés (E) et non fertilisés (NF) ne révèle que de légères différences de profil au cours de l'incubation mais pas de différence significative entre les deux séries (E versus NF). En conclusion, nous avons montré que le pouvoir antibactérien des protéines du blanc d'œuf diminuait progressivement au cours de l'incubation, indépendamment de la présence d'un embryon, et que cette chute pourrait résulter de l'altération de l'activité de protéines antimicrobiennes qu'il reste à identifier. Ces données suggèrent donc une fragilisation du pouvoir antimicrobien du blanc d'œuf au cours de l'incubation qui est probablement compensée par d'autres systèmes de défense mis en place au cours du développement embryonnaire.

ABSTRACT

Antibacterial activity of egg albumen during incubation

The aim of the present work was to analyse the change of egg white antibacterial activities during egg incubation. Embryonic (E) and unfertilized (NF) eggs were incubated for several periods of time, from 0 to 12 days, and the resulting egg whites were analyzed for their pH, protein content and for their antibacterial properties against 5 pathogenic strains. The changes in egg white pH values differed between NF and E eggs. Egg white concentrations remained stable during incubation for NF eggs but significantly increased for E eggs. At constant protein concentration and for an identical duration of incubation, egg white activities against *Listeria monocytogenes* and *Streptococcus uberis* were similar between E and NF groups. A progressive decrease in these activities was however observed depending on the incubation time, regardless of the egg group (NF or E). A discrete change in the profile of egg white proteins is also observed during incubation but no difference was noticeable between both groups (E versus NF). To conclude, the antibacterial activity of egg white proteins progressively decreased during egg incubation. This observation could result from the alteration of specific antimicrobial proteins. Taken together, these data support that the egg white antibacterial defence is altered during egg incubation, suggesting that new compensatory protection systems might be set up during embryonic development to overcome this apparent weakening.

INTRODUCTION

L'œuf d'oiseau est une structure complexe dont la fonction est d'assurer le développement autonome d'un embryon à l'extérieur du corps de la mère. Outre les nutriments, l'œuf contient également de nombreuses molécules biactives nécessaires à la croissance de l'embryon et fournit un système de protection efficace pour lutter contre les contaminations provenant du milieu extérieur. Les défenses de l'œuf sont principalement assurées par la coquille (défense physique) et le blanc d'œuf (défense physico-chimique). Le blanc d'œuf est un fluide biologique naturellement antibactérien constitué d'environ 90% d'eau et 10% de protéines. Les conditions physico-chimiques particulières (pH, viscosité) du blanc et la présence de nombreuses protéines antimicrobiennes rendent ce milieu défavorable à la croissance des bactéries. L'effet du blanc vis-à-vis des bactéries peut être bactériostatique (inhibition de la croissance bactérienne) ou bactéricide en fonction du type de bactérie considéré et de la température environnante (Guyot *et al.*, 2013, pour revue). Deux protéines majeures du blanc, le lysozyme et l'ovotransferrine, jouent un rôle important dans cette activité. L'effet bactériostatique du blanc d'œuf vis-à-vis des bactéries à Gram- est généralement attribué à l'absence de fer due notamment à l'ovotransferrine et à ses propriétés chélatrices (Tranter & Board, 1984 ; Baron *et al.*, 1997). L'effet bactéricide sur les bactéries à Gram+ est plutôt lié à l'activité muramidase du lysozyme. Bien que le blanc d'œuf soit connu pour ses propriétés antibactériennes, il reste néanmoins sensible aux contaminations par les salmonelles qui sont capables de s'y multiplier dans certaines conditions. Une variabilité de l'activité anti-salmonelle du blanc d'œuf peut être observée en fonction de la température et du temps de stockage des œufs (Messens *et al.*, 2004 ; Réhault-Godbert *et al.*, 2010) ou lors de l'incubation (Réhault-Godbert *et al.*, 2009).

La présence de systèmes de protection de l'œuf est primordiale pour garantir le développement embryonnaire, or il semble que ces systèmes se fragilisent au fil du temps puisque l'embryon puise dans la coquille et dans le blanc un certain nombre d'éléments nécessaires à sa croissance. De nombreuses modifications sont en outre observées dans le blanc d'œuf au cours de l'incubation, notamment l'altération d'activités enzymatiques (Cunningham, 1974 ; Réhault-Godbert *et al.*, 2008) ainsi que la dégradation et la complexation de certaines protéines (Qiu *et al.*, 2012). L'objectif de cette étude était de comparer le potentiel antibactérien des protéines du blanc entre des œufs embryonnés (E) et non fertiles (NF) et de caractériser la variabilité de cette activité au cours de l'incubation.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Incubation des œufs, échantillonnage et mesure du pH des blancs d'œufs

Des œufs non fertiles (NF) et embryonnés (E) de poules SA51 (SASSO, Sabres, France) ont été conservés pendant 3 jours à 16-17°C (80-85% d'humidité relative) puis incubés dans un incubateur d'œufs à 37,7°C (45% d'humidité relative). Pour les œufs E, la présence d'un embryon a été vérifiée systématiquement par mirage. A différents temps d'incubation (0-12 jours), les blancs d'œuf ont été prélevés en conditions stériles, poolés (n = 3 œufs par pool) puis homogénéisés avec un Turrax (T 18 basic ULTRA-TURRAX®, IKA-Werke, Staufen, Allemagne). Sept pools de 3 œufs ont été échantillonnés par condition. Le pH a été mesuré dans chacun des pools de blanc d'œuf homogénéisés. Ces derniers ont été ensuite aliquotés puis conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

1.2. Détermination de la concentration protéique des blancs d'œuf

Les concentrations en protéine des échantillons de blancs d'œuf ont été déterminées avec le kit DC Protein Assay (BIO-RAD) selon les recommandations du fournisseur.

1.3. Tests antimicrobiens

Les croissances de 5 souches bactériennes pathogènes (3 Gram+ : *Staphylococcus aureus* CIRMBP-476, *Listeria monocytogenes* CIRMBP-711, *Streptococcus uberis* CIRMBP-637 ; 2 Gram- : *Escherichia coli* CIRMBP-945, *Salmonella enterica* sv Enteritidis CIRMBP-733) disponibles au Centre International de Ressources Microbiennes dédié aux Bactéries Pathogènes (CIRM-BP, INRA Nouzilly, France, <http://www6.inra.fr/cirm>) ont été mesurées en présence des différents blancs d'œuf (n=7 pools de 3 blancs d'œufs par condition). Les échantillons de blancs à différentes concentrations (25 à 3,125 mg/ml dans de l'eau ultrapure) ont été déposés dans une microplaque stérile et inoculés avec des cultures bactériennes en phase de croissance mi-exponentielle diluées en milieu frais (Tryptic Soy Broth pour *L. monocytogenes*, Mueller-Hinton + sérum de cheval à 5% pour *S. uberis*, Mueller-Hinton pour *S. aureus*, *E. coli* et *S. Enteritidis*) de façon à obtenir une concentration finale d'environ 10⁵ UFC/ml par puits. La stérilité du milieu de culture et des blancs d'œuf a été vérifiée dans chacun des tests. La microplaque a ensuite été incubée à 37°C dans un analyseur automatique de courbes de croissance par turbidimétrie (Bioscreen C®, Thermo Fisher Scientific, Saint-Herblain, France). Les lectures de DO à 600 nm ont été mesurées toutes les 45 minutes pendant 22h30. Chaque essai antimicrobien a été répété trois fois. L'activité anti-*L. monocytogenes* des différents groupes d'échantillons a été comparée sur

la base des mesures de DO à 600 nm réalisées après 9h de culture en présence de blanc d'œuf à 3,125 mg/ml.

1.4 sds-page

Les échantillons (8µg) ont été dilués dans du tampon Laemmli 5X en conditions non réductrices et analysés par SDS-PAGE 4-20% d'acrylamide. Les protéines ont été visualisées après coloration au bleu de Coomassie.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Deux lots d'œufs de poules SA51 (non fertiles NF et embryonnés E) ont été stockés pendant 3 jours dans les conditions classiques de conservation (16°C, 85% d'hygrométrie) puis mis en incubation de 0 à 12 jours pour suivre l'évolution des activités antibactériennes du blanc d'œuf. Le stockage des œufs avant la mise en incubation est une pratique courante chez les accoueurs (de 3 à 10 jours en moyenne) afin d'optimiser la capacité d'accueil des incubateurs mais également d'améliorer le taux d'éclosion. Cette période pré-incubatoire se retrouve naturellement chez les oiseaux qui pondent une série d'œufs (variable en fonction des espèces) avant de commencer la couvaison. Dans notre étude, les blancs d'œufs ont été collectés à 0, 4, 8 et 12 jours d'incubation (respectivement J0, J4, J8 et J12) et ont été analysés pour différents paramètres (pH, concentration et profil protéique, activités antibactériennes).

Le pH a une influence importante sur le pouvoir antibactérien du blanc, par son action directe sur les bactéries ou via la régulation de l'activité des protéines antibactériennes (Guyot *et al.*, 2013, pour revue). Il peut en outre impacter sur la stabilité des protéines. Nos données montrent que le pH du blanc des œufs NF et E évolue différemment au cours de l'incubation (Tableau I). Le pH du blanc d'œuf, qui est de 7,9 dans les œufs NF fraîchement pondus, augmente et atteint environ 9 après la période de stockage de 3 jours à 16-18°C. Cette dernière valeur est identique pour les lots NF et E au moment de la mise en incubation. Après 4 jours d'incubation à 37,7°C, le pH des œufs NF continue à augmenter pour atteindre 9,6 et se stabilise ensuite jusqu'à 12 jours. En revanche dans les œufs E, le pH du blanc diminue progressivement de 9 à 7,5 entre 0 et 12 jours d'incubation. Ces variations de pH sont en accord avec les données de la littérature (Cunningham, 1974 ; Qiu *et al.*, 2012). Le blanc d'œuf fraîchement pondue est enrichi en dioxyde de carbone (sous forme dissoute et combinée) qui confère au blanc un pH proche de la neutralité. Ce CO₂ s'échappe progressivement à travers les pores de la coquille une fois l'œuf pondue, ce qui a pour conséquence une diminution de sa teneur dans le blanc et donc une augmentation du pH. Cette alcalinisation du milieu est

globalement défavorable à la croissance bactérienne (Guyot *et al.*, 2013, pour revue). En présence d'un embryon en développement, le pH s'alcalinise pendant la période de stockage puis il diminue à partir de 4 jours d'incubation jusqu'à atteindre une valeur proche de la neutralité à 12 jours. Cette chute de pH pourrait s'expliquer par l'absorption par le blanc du CO₂ produit par l'embryon (Reijrink *et al.*, 2008). En termes d'effet antibactérien, cette modification de pH dans les œufs embryonnés peut avoir un impact positif sur l'activité de certaines protéines antimicrobiennes comme le lysozyme dont le pH optimal d'activité se situe autour de 7.

La concentration protéique des différents échantillons a été déterminée selon une méthode dérivée de la méthode de dosage de Lowry. Nos données montrent que la concentration protéique du blanc augmente au cours de l'incubation mais l'amplitude de variation diffère notablement entre les œufs NF et E (Tableau I) : la concentration des protéines augmente d'un facteur 3 pour les œufs E (124-384 mg/ml de 0 à 12 jours) alors que celle-ci varie très peu pour les œufs NF (134-172 mg/ml de J0 à J12). Il est à noter que le volume de blanc diminue fortement dans les œufs embryonnés à partir de J8. Une étude réalisée par Carinci et Manzoli-Guidotti a montré que le poids du blanc à 10-12 jours d'incubation représente environ 30% du poids du blanc d'œufs non incubés (Carinci et Manzoli-Guidotti, 1968). Cette perte de poids est principalement liée à une diminution de la teneur en eau, ce qui est cohérent avec l'amplitude de variation de concentration que nous avons observée.

L'activité antibactérienne des différents blancs d'œuf a été évaluée en mesurant la croissance de 5 bactéries pathogènes (*L. monocytogenes*, *S. uberis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. Enteritidis*) en présence de chacun des échantillons. Compte-tenu des écarts de concentrations protéiques observés dans les 2 groupes d'œufs, les blancs ont été dilués dans de l'eau pour compenser les pertes en eau liées à l'incubation et équilibrer les concentrations en protéines. Les échantillons ont ainsi pu être comparés à concentrations protéiques identiques. Les tests de croissance en Bioscreen ont été réalisés en milieux nutritionnels riches en présence de blancs d'œufs dilués. Aucune activité antibactérienne n'a été observée contre *E. coli*, *S. Enteritidis* et *S. aureus* à la plus forte concentration de blanc d'œuf testée (25 mg/ml). La présence de grandes quantités de nutriments est susceptible d'avoir masqué l'activité bactériostatique du blanc d'œuf vis-à-vis des bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *S. Enteritidis*), liée à la captation du fer. Seules *L. monocytogenes* et *S. uberis* (bactéries à Gram positif) ont montré une sensibilité aux protéines du blanc d'œuf à des doses inférieures à 25 mg/ml. Nos résultats montrent que la croissance de *L. monocytogenes* est inhibée en présence de 3,125 mg/ml de protéines de blanc d'œuf (Figure 1). A cette concentration, aucune différence n'est observée entre les groupes E et NF. En revanche, une perte

progressive de l'activité anti-*Listeria* est détectée au cours de l'incubation des œufs E et NF, qui se traduit par une meilleure croissance de la bactérie à J12 par rapport à J0. Des résultats similaires sont observés avec *S. uberis* pour une concentration en protéines de 6,25 mg/ml (résultats non présentés). Ces résultats suggèrent une altération de l'activité de certaines protéines antibactériennes. Une étude allant dans ce sens a en effet montré que l'activité du lysozyme dans le blanc d'œuf fertile diminuait rapidement pendant les 12 premiers jours d'incubation, pour atteindre à 17 jours seulement 20% de l'activité initiale (Cunningham, 1974). L'altération de l'activité du lysozyme a également été démontrée dans les œufs non fertiles conservés à 35°C, malgré l'importante stabilité des protéines du blanc d'œuf (Feeney *et al.*, 1952). Nos résultats laissent cependant penser que la perte d'activité observée peut être compensée au moins en partie dans les œufs E par l'augmentation progressive de la concentration en protéines (Tableau 1), d'autant que l'absorption des protéines du blanc par l'embryon ne semble débiter qu'à partir du 12ème jour d'incubation (Carinci et Manzoli-Guidotti, 1968). Cette hypothèse s'appuie aussi sur nos tests antimicrobiens qui montrent que les échantillons E à J8 et J12 utilisés à une concentration deux fois supérieure (6,25 mg/ml et 12,5 mg/ml, respectivement pour *L. monocytogenes* et *S. uberis*) retrouvent un fort pouvoir antimicrobien (résultats non présentés).

Afin de vérifier si cette altération est due au clivage de certaines protéines du blanc, les profils protéiques des échantillons E et NF ont été analysés par SDS-PAGE et comparés entre J0 et J12. Les résultats montrent que les profils des protéines majeures du blanc sont globalement stables jusqu'à 12 jours d'incubation, quel que soit le lot considéré E ou NF (Figure 2). En particulier, l'intégrité du lysozyme (14 kDa) ne semble pas compromise. Il est à noter qu'une bande de faible intensité (30-35 kDa) correspondant vraisemblablement à un fragment protéolytique apparaît distinctement à J12 (Figure 2, symbole \triangleleft). Au regard de la masse molaire apparente et des données protéomiques du blanc d'œuf incubé pendant 7 jours, cette bande pourrait correspondre à des fragments de clusterine ou d'ovalbumine (Qiu *et al.*, 2012). Un résultat similaire avait été obtenu précédemment dans les blancs d'œufs non fertiles après 12 jours de conservation à 37°C et l'analyse par spectrométrie de masse avait révélé qu'il s'agissait

vraisemblablement de fragments d'ovalbumine et d'ovotransferrine (Réhault-Godbert *et al.*, 2010).

CONCLUSION

Les données de cette étude montrent que l'activité antibactérienne du blanc d'œuf (contre *Listeria monocytogenes* et *Streptococcus uberis*) diminue au cours des 12 premiers jours d'incubation, indépendamment de la présence d'un embryon. L'origine de cette altération n'est vraisemblablement pas due à la dégradation de protéines majeures du blanc d'œuf puisque les analyses SDS-PAGE n'ont pas révélé de dégradation de protéines connues pour avoir des activités contre *Listeria* et *Streptococcus*. Outre le lysozyme, actif contre les bactéries à Gram+, de nouvelles protéines antibactériennes présentes en plus faibles quantités, comme l'ovalbumine X (OVAX) ou la défensine 11 aviaire (AvBD11), ont été identifiées dans le blanc d'œuf (Réhault-Godbert *et al.*, 2013 ; Hervé-Grépinet *et al.*, 2010). Nous envisageons d'analyser plus spécifiquement l'évolution de ces protéines au cours du développement embryonnaire pour évaluer leur implication dans la perte du pouvoir antibactérien observé. L'augmentation de la concentration des protéines du blanc observée dans les œufs embryonnés pourrait constituer un mécanisme compensatoire pour palier à cette diminution d'activité, au moins pendant la première moitié de l'incubation. Cette possible fragilisation du pouvoir antimicrobien du blanc d'œuf suggère que d'autres systèmes de défense sont mis en place au cours du développement embryonnaire afin de protéger l'embryon des agressions microbiennes.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par les régions Centre, Bretagne et Pays de la Loire dans le cadre du projet OVAL (Contrat 32000386, 2011-2014). Les auteurs remercient tous les membres de l'équipe « Fonction et Régulation des Protéines de l'œuf » (UR83 Recherches Avicoles, INRA Nouzilly) pour leur participation aux prélèvements des échantillons, ainsi que le Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours (UE PEAT, INRA Nouzilly), en particulier Jean-Marie Brigant et Olivier Callut pour l'entretien des poules, Joël Delaveau et Christophe Rat pour l'incubation des œufs.

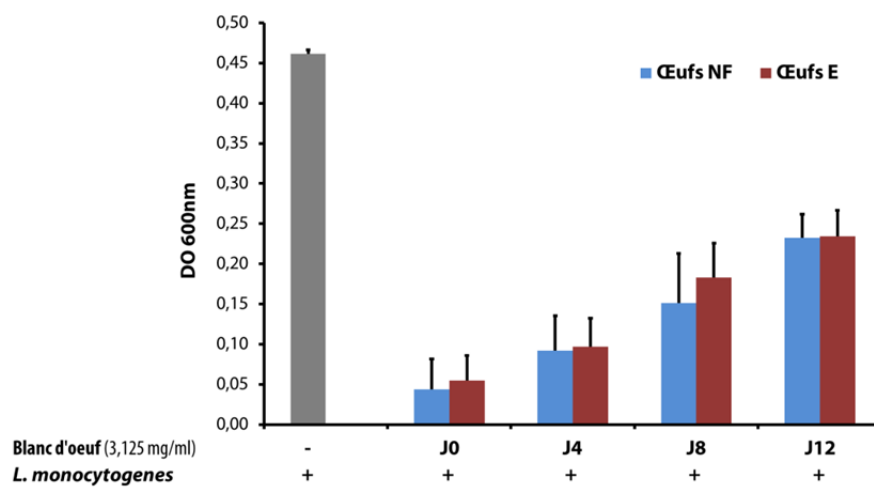
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Baron F. *et al.*, 1997. J. Food Prot., (60), 1318-1323
2. Carinci P. et Manzoli-Guidotti L., 1968. J. Embryol. Exp. Morph., (20), 107-118
3. Cunningham F.E. *et al.*, 1974. Poultry Sci., (53), 1561-1565
4. Feeney R.E. *et al.*, 1952. Poultry Sci., (31), 639-647
5. Guyot N. *et al.*, 2013. *XV European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products / XXI European Symposium on the Quality of Poultry Meat*, Bergamo (ITA)
6. Hervé-Grépinet V. *et al.*, 2010. Antimicrob. Agents Chemother., (54), 4401-4409
7. Messens W. *et al.*, 2004. Food Microbiol., (21), 25-32
8. Qiu N. *et al.*, 2012. J. Proteomics, (75), 1895-1905
9. Réhault-Godbert S. *et al.*, 2008. J. Agric. Food Chem., (56), 6294-6303
10. Réhault-Godbert S. *et al.*, 2009. *8èmes Journées de la Recherche Avicole*, St Malo (FRA)
11. Réhault-Godbert S. *et al.*, 2010. J. Food Protect., (73), 1604-12
12. Réhault-Godbert S. *et al.*, 2013. J Biol Chem (288), 17285-17295
13. Reijrink I.A.M. *et al.*, 2008. Word Poult. Sci. J., (64), 581-598
14. Tranter H.S. et Board R.G., 1984. J. Applied. Bacteriol., (56), 53-61

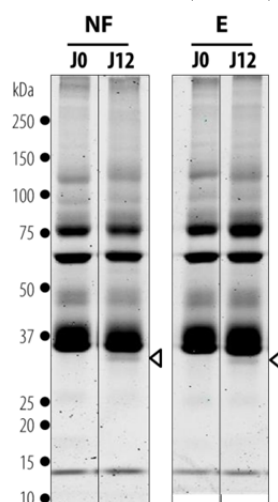
Tableau 1. pH et concentrations protéiques du blanc d'œuf au cours de l'incubation

		Œufs	Temps d'incubation (jours)				
		frais	0	4	8	12	18
pH							
	Blanc d'œuf non fertile (NF)	7,92	9,03	9,59	9,60	9,68	9,38
	Blanc d'œuf embryonné (E)		9,06	8,89	8,06	7,54	
Concentrations protéiques (mg/ml)							
	Blanc d'œuf non fertile (NF)	135,7	133,7	157,4	156,9	172,4	185,7
	Blanc d'œuf embryonné (E)		123,7	177,5	371,3	382,7	

Les valeurs correspondent à la moyenne de 7 pools (3 œufs/pool)

Figure 1. Croissance de *Listeria monocytogenes* en présence de protéines (3 mg/ml) de blanc d'œuf non fertile (NF) ou embryonné (E) après 0, 4, 8 et 12 jours d'incubation (J0, J4, J8, J12)

Les valeurs correspondent à la moyenne de 7 pools (3 œufs/pool) \pm écart-type.

Figure 2. Analyse SDS-PAGE des protéines de blanc d'œuf non fertile (NF) ou embryonné (E) après 0 et 12 jours d'incubation (J0, J12).

Le symbole ◁ montre une bande apparaissant dans les blancs d'œufs NF et E au cours de l'incubation