



Modulation des propriétés antibactériennes du blanc d'œuf par la poule en réponse à différents stimuli microbiens

Nicolas Guyot, Larbi Bedrani, Emmanuelle Helloin, Sophie Réhault-Godbert,
Yves Y. Nys

► To cite this version:

Nicolas Guyot, Larbi Bedrani, Emmanuelle Helloin, Sophie Réhault-Godbert, Yves Y. Nys. Modulation des propriétés antibactériennes du blanc d'œuf par la poule en réponse à différents stimuli microbiens. 10. Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Institut Technique de l'Aviculture et des Elevages de Petits Animaux (ITAVI). Paris, FRA., Mar 2013, La Rochelle, France. hal-02744672

HAL Id: hal-02744672

<https://hal.inrae.fr/hal-02744672>

Submitted on 3 Jun 2020

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.

MODULATION DES PROPRIETES ANTIBACTERIENNES DU BLANC D'ŒUF PAR LA POULE EN REPONSE A DIFFERENTS STIMULI MICROBIENS.

Guyot Nicolas ¹, Bedrani Larbi ¹, Helloin Emmanuelle ², Réhault-Godbert Sophie ¹, Nys Yves ¹

¹UR0083 Recherches Avicoles, INRA, 37380 Nouzilly, France

²UR1282 Infectiologie et Santé Publique, INRA, 37380 Nouzilly, France.

nicolas.guyot@tours.inra.fr

RÉSUMÉ

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'influence de stimulations microbiennes de poules sur le système de défense innée du blanc d'œuf en utilisant deux modèles expérimentaux. Le premier est basé sur la comparaison de l'activité antibactérienne des blancs d'œufs de poules axéniques élevées en conditions stériles (Ax), de poules exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) et de poules conventionnelles (C). Le second modèle compare des œufs de poules contrôles ou immunostimulées par injection de lipopolysaccharide bactérien (LPS). Les résultats ont montré que les blancs d'œufs des groupes C et EOPS ont une activité inhibitrice renforcée vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* comparée à ceux du groupe Ax. De même, une meilleure activité antimicrobienne contre ce pathogène est observée pour les blancs d'œufs du groupe LPS par rapport à ceux du groupe contrôle. En revanche, l'activité anti-*Escherichia coli* n'est pas modifiée ni par le degré de contamination du milieu des poules (Ax vs EOPS vs C) ni par l'injection de lipopolysaccharide (LPS vs contrôle). L'analyse de l'expression de gènes codants pour des protéines/peptides antimicrobiens de l'œuf et les mesures des activités du lysozyme et d'antiprotéases dans le blanc n'ont pas permis d'expliquer les stimulations de l'activité antimicrobienne du blanc d'œuf. Ces résultats suggèrent que les poules peuvent renforcer modérément l'activité antimicrobienne du blanc d'œuf en réponse à des stimuli microbiens de leur milieu et anticiper les besoins de l'embryon en termes de protection. Les mécanismes moléculaires à l'origine de cette modulation demeurent néanmoins inconnus à ce jour.

ABSTRACT

Modulation of egg white antibacterial properties by the hen in response to different microbial stimuli

The goal of this study is to evaluate the influence of microbial stimulation of hens on the innate defense system of egg whites by using two experimental models. The first model is based on the comparison of egg white antibacterial activities issued from germ-free hens reared in sterile conditions (Ax), specific pathogen free (SPF) hens and conventional (C) hens. The second model compares eggs from control hens and hens immunostimulated by injection of bacterial lipopolysaccharide (LPS). Egg whites from C and SPF groups showed increased inhibitory activity towards *Staphylococcus aureus* as compared with the Ax group. Similarly, increased antimicrobial activity against this pathogen was observed in egg whites from LPS group compared with the control group. On the contrary, anti-*Escherichia coli* activity was not affected neither by the degree of environmental contamination (Ax vs SPF vs C) nor by the injection of lipopolysaccharide (LPS vs control). The analysis of antimicrobial gene expression in the magnum and measurements of lysozyme and antiprotease activities in egg whites samples have not shed light on the origin of the enhanced egg white antimicrobial activity. These results suggest that hens can moderately enhance the egg white antimicrobial activity in response to microbial stimuli present in their environment and can anticipate the needs of the embryo in terms of protection. Nevertheless, molecular mechanisms responsible for this modulation remain unknown.

INTRODUCTION

L'œuf est un aliment couramment consommé dans le monde et caractérisé par un équilibre parfait de sa composition en acides aminés vis-à-vis des besoins nutritionnels de l'homme adulte et par une grande diversité de ses nutriments. L'œuf est une source importante de nutriments et de molécules bioactives permettant le développement d'un embryon dans un environnement extérieur en fournissant à la fois des nutriments essentiels mais aussi un système de protection efficace. Les défenses naturelles de l'œuf contribuent à maintenir la qualité hygiénique des œufs de consommation en limitant la pénétration et la croissance des microorganismes. Ce système de protection se présente sous la forme de deux composantes principales : 1) une barrière physique formée par la coquille et les membranes coquillières et 2) un système de défense complexe moléculaire comprenant des anticorps (principalement présents dans le jaune d'œuf) et une variété de protéines/peptides possédant des propriétés antimicrobiennes. Ces derniers sont les effecteurs de la défense immunitaire innée de l'œuf et fonctionnent selon trois mécanismes principaux (Réhault et al, 2007): (i) la chélation des composés nécessaires à la croissance bactérienne (ex. captage du fer et de la biotine, respectivement par l'ovotransferrine et l'avidine), (ii) l'inactivation des protéases microbiennes impliquées dans le métabolisme et le processus d'invasion des micro-organismes (inhibiteurs de protéases comme la cystatine et l'ovoinhibiteur) (iii) l'activité lytique directe exercée principalement par le lysozyme et les défensines aviaires bêta qui altèrent la paroi cellulaire des bactéries. Ces molécules antimicrobiennes sont présentes dans tous les compartiments de l'œuf, mais sont concentrées dans le blanc.

Malgré la présence de ces systèmes de défense, le contenu de l'œuf peut être contaminé par certains agents pathogènes. La consommation d'œufs à l'état cru et, dans une plus grande mesure, l'utilisation de barèmes de cuisson inadaptés pour la destruction totale de certains germes pathogènes, tels que les Salmonelles, constituent des causes importantes de toxi-infections alimentaires (notamment de salmonelloses). L'évolution actuelle des systèmes d'élevage des poules pondeuses vers des élevages au sol et en plein air laisse entrevoir un risque accru de contaminations des œufs. Dans ce contexte, il est important de savoir si la poule est capable de moduler la composition de l'œuf en protéines antimicrobiennes en fonction du degré de contamination de son milieu de vie. On sait depuis longtemps que selon la « pression microbienne » du milieu dans lequel elle se trouve, la poule est capable de déposer de manière préventive des immunoglobulines (immunité acquise) dans le jaune d'œuf afin de mieux protéger l'embryon (Rose et Orlans, 1981). L'existence d'une telle

modulation pour les composés de l'immunité innée du blanc d'œuf n'a pas été établie.

L'objectif de l'étude est donc de déterminer si le système de défense innée du blanc d'œuf peut être régulé par le degré de contamination bactérienne du milieu de la poule. Deux modèles expérimentaux ont été utilisés. Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact de la charge microbienne du milieu sur l'activité antimicrobienne de blancs d'œufs de poules élevées dans trois conditions extrêmes différentes : axéniques (Ax), exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) et conventionnelles (C). Dans le deuxième modèle, nous avons étudié l'impact sur le potentiel antimicrobien du blanc d'œuf d'une stimulation immunitaire des poules par l'injection intraveineuse de lipopolysaccharide bactérien (LPS).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Modèle expérimental 1 (élevage)

Trois lots de poules Leghorn ont été constitués afin de comparer leur œufs en début de production (23 semaines): a) un groupe axénique (Ax) (n = 8) où les animaux ont été élevés depuis l'éclosion dans un environnement stérile (isolateur) et nourris avec de l'aliment et de l'eau stériles, b) un groupe exempt d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) (n = 12) où les poules, non vaccinées, ont été élevées dans des conditions d'hygiène drastiques et enfin c) un groupe conventionnel (C) (n = 12) vacciné maintenu dans des conditions d'élevage standards. Les poules EOPS et C ont été élevées dans des cages individuelles. Pour l'ensemble des 3 lots, l'aliment et l'eau étaient disponibles ad libitum.

1.2. Modèle expérimental 2 (LPS)

Trente-six poules ISA Brown (52 semaines) ont été divisées en deux groupes expérimentaux: un groupe contrôle (Ct) (n = 12) et un groupe ayant reçu par voie intraveineuse (iv) du lipopolysaccharide (LPS) (n = 24). Les animaux ont été élevés dans des conditions d'élevage standards en cages individuelles. Les poules du groupe LPS ont reçu 3 injections intra-veineuses de lipopolysaccharide de *Salmonella enterica* Enteritidis (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) à 24 heures d'intervalle à raison de 1 mg / kg puis deux fois 0,5 mg / kg de poids corporel.

1.3. Echantillonnage

Dans le modèle 1, un total de 80 œufs par traitement a été collecté, tandis que dans le modèle 2, les œufs ont été recueillis sur une période de 21 jours après la première injection de LPS. Les œufs ont été contrôlés visuellement pour vérifier l'intégrité de la coquille et ont été stockés pendant 48 heures à 4°C. Les blancs d'œuf ont été prélevés, homogénéisés individuellement et conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

1.4. Tests antimicrobiens

La croissance de deux souches bactériennes, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (CIRM-BP, INRA Nouzilly, France), a été mesurée dans les échantillons de blancs d'œufs des deux modèles expérimentaux (10 pools de 8 blancs d'œufs par lot et 13 pools de 8 blancs d'œufs par traitement, respectivement dans les modèles 1 et 2). Les échantillons de blancs dilués au $\frac{3}{4}$ dans du tampon 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) ont été déposés dans une microplaque stérile en triplicata et inoculés avec du milieu de culture Mueller-Hinton contenant les bactéries (concentration finale : 10^6 bactéries/ml par puits) issues d'une culture en phase mi-exponentielle. 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 (Bioscreen C®, Thermo Fisher Scientific, Saint-Herblain, France) de courbes de croissance par turbidimétrie : lecture de DO à 600 nm après agitation. Chaque essai antimicrobien a été répété trois fois. Les valeurs de DO à 600 nm obtenues pendant la phase de croissance des bactéries (3h pour *E. coli* et 9h pour *S. aureus*) ont été utilisées pour comparer l'activité antimicrobienne des différents groupes d'échantillons.

1.5. Dosage de l'activité du lysozyme

L'activité du lysozyme dans les échantillons de blancs d'œufs a été déterminée selon une méthode décrite précédemment (Shawkey et al., 2008). Dans notre étude, une unité correspond à la variation de 0,001 log(unité d'absorbance à 450 nm) par minute à pH 7,4 et à 25°C en utilisant une suspension cellulaire de *Micrococcus lysodeikticus* dans un volume final de 165µL.

1.6. Dosage des activités antiprotéases

Les activités anti-trypsine, anti-chymotrypsine et anti-papaïne dans les blancs d'œufs ont été déterminées selon la méthode décrite par Réhault-Godbert et al. (2010).

1.7. Mesure de l'expression des gènes

Le magnum de poules ayant un œuf en formation (6 heures post-ovulation) a été prélevé puis stocké à -80°C. L'extraction des ARN totaux a été réalisée avec le kit RNA 1 (Macherey-Nagel, Hoerd, France) dans le modèle 1 et avec le kit RNA Now (Biogentec, Seabrook, TX) dans le modèle 2. La reverse-transcription a été réalisée avec la reverse-transcriptase M-MLV (RNase H-) (Superscript II, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) et des amorces hexamères aléatoires (Amersham, Orsay, France). Les ADN complémentaires ont été ensuite amplifiés par PCR en temps réel en utilisant le SYBER Green I et les amorces listées dans le tableau 1. Les gènes TBP (TATA box binding protein) et 18S ont été utilisés comme gènes de ménage dans les modèles 1 et 2, respectivement. L'amorce 18S est une sonde Taqman

commerciale (Life Technologies SAS, Villebon sur Yvette, France).

1.8. Analyses statistiques

La comparaison des moyennes a été réalisée par une analyse de variance ANOVA suivie d'un test de Bonferroni-Dunn (Statview version 5.0, SAS Institute, Inc.)

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons utilisé deux approches pour évaluer si l'activité antimicrobienne du blanc d'œuf est modulable ou non par l'environnement microbien de la poule.

La comparaison des œufs provenant de poules axéniques (Ax), exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) et conventionnelles (C) constitue un modèle pertinent en raison de la grande disparité des milieux d'élevage et de leur impact respectif sur le statut immunitaire des animaux. Nos résultats montrent que la croissance d'*Escherichia coli* (bactérie à Gram négatif) est similaire dans les 3 groupes d'œufs, en revanche la croissance de *Staphylococcus aureus* (bactérie à Gram positif) est significativement diminuée dans les œufs des groupes C et SPF, en comparaison du groupe Ax ($P < 0.05$) (Figure 1A). Ces données, bien que réalisées sur seulement deux pathogènes, suggèrent que les poules peuvent renforcer sélectivement l'activité antimicrobienne du blanc en fonction de la pression microbienne de leur environnement d'élevage.

Dans la seconde approche, nous avons induit expérimentalement une stimulation immunitaire chez les poules en utilisant le lipopolysaccharide bactérien (LPS). C'est un constituant hautement immunogène de la paroi cellulaire des bactéries gram-négatives, capable d'initier une réponse inflammatoire chez la poule (Sunwoo et al., 1996). Trois doses successives de LPS ont été injectées par voie intraveineuse à 24h d'intervalle afin de prolonger le temps de contact avec l'endotoxine et de mimer les conditions d'un épisode infectieux aigu. En accord avec les résultats du premier modèle, l'injection de LPS chez les poules stimule l'inhibition de la croissance de *S. aureus* en présence de blanc d'œuf ($P < 0.05$), mais pas celle de *E. coli* (Figure 1B). L'immunostimulation des poules par le LPS stimule donc le pouvoir antimicrobien du blanc d'œuf mais de manière spécifique puisque l'activité anti-*S. aureus* est augmentée sans que l'activité anti-*E. coli* ne soit modifiée.

Dans les deux modèles expérimentaux, l'augmentation de la contamination microbienne exercée sur les poules et leur exposition au LPS améliorent modérément mais significativement, par rapport aux autres groupes, l'activité antimicrobienne du blanc d'œuf contre la bactérie à Gram positif *S. aureus*. Afin d'identifier le ou les acteur(s) moléculaire(s) à l'origine de cette modulation, nous avons choisi de nous intéresser à des composés

antimicrobiens majeurs du blanc d'œuf (lysozyme, ovotransferrine, inhibiteurs de protéases) et représentatifs des 3 principaux mécanismes d'action des protéines antimicrobiennes de l'œuf (effets lytiques, chélateurs et antiprotéases). Plus précisément, nous avons mesuré leur activité dans le blanc et/ou l'expression de leur gène dans l'oviducte des deux modèles.

Le lysozyme est une protéine possédant une activité lytique essentiellement dirigée contre les bactéries à Gram positif dont elle dégrade la paroi (activité muramidase). Nos résultats montrent que l'activité du lysozyme n'est pas modifiée de manière significative, ni par le degré de contamination du milieu des poules (modèle 1), ni par l'injection immunostimulante de LPS (modèle 2) (Tableau 2). Ces observations sont également confirmées au niveau transcriptionnel puisque la quantité d'ARNs messagers dans le magnum (tissu sécrétant les protéines du blanc) est stable pour chacun des deux modèles explorés, quels que soient les lots expérimentaux (Figure 2). Le lysozyme n'est donc pas l'élément modulé responsable de l'augmentation de l'activité anti-*S. aureus* du blanc d'œuf. Cette conclusion est renforcée par le fait que *S. aureus* est capable de développer une résistance contre l'activité du lysozyme en modifiant son peptidoglycane.

Le blanc d'œuf contient une grande quantité d'antiprotéases qui peuvent potentiellement cibler les enzymes protéolytiques (protéases) produites par les bactéries et/ou avoir une action antimicrobienne directe. Cette hypothèse a été explorée car *S. aureus* est une bactérie sécrétant dans le milieu extracellulaire des enzymes protéolytiques (protéases) (Shaw et al, 2004) qui pourraient participer à sa virulence. Lors de la comparaison des poules issues des trois milieux extrêmes (Ax, EOPS, C), les activités anti-trypsine, anti-chymotrypsine et anti-papaïne du blanc d'œuf ne varient pas (Tableau 2). Ces résultats suggèrent que les activités antiprotéases majeures du blanc ne sont pas responsables du renforcement de l'activité antimicrobienne contre *S. aureus*.

La dernière molécule étudiée dans ce travail est l'ovotransferrine. Son activité antimicrobienne est liée à ses propriétés chélatrices du fer, un élément essentiel à la croissance de nombreuses bactéries. L'expression du gène de l'ovotransferrine dans le

magnum n'a pas été modifiée en réponse aux différents stimuli microbiens des modèles expérimentaux 1 et 2 (Figure 2). Ces résultats sont cohérents avec nos premières observations (Figure 1) et le fait que la présence de fer libre est importante pour la croissance de nombreuses bactéries Gram-comme *E. coli* dans le blanc d'œuf alors qu'elle ne l'est pas pour *S. aureus* (Tranter et Board, 1984).

Les mesures effectuées sur les protéines antimicrobiennes majeures du blanc d'œuf n'ont pas permis de mettre en évidence le(s) mécanisme(s) à l'origine du renforcement de l'activité anti-*S. aureus*. Ces résultats sont en accord avec la stabilité reconnue de la proportion de ces composés dans le blanc d'œuf. Ils ne semblent pas inductibles en réponse à une stimulation immunitaire de la poule. Nous émettons l'hypothèse que certains composés mineurs du blanc d'œuf, dont l'expression est plus modulable, pourraient expliquer l'augmentation de l'activité anti-*S. aureus* du blanc d'œufs lorsque les poules sont stimulées immunologiquement. L'analyse récente de la composition en protéines du blanc d'œuf par spectrométrie de masse a révélé l'existence de plus de 150 protéines (Mann, 2007 ; Mann et Mann, 2011). Outre les protéines majeures du blanc connues pour leurs propriétés antimicrobiennes, de nombreux composés mineurs récemment identifiés sont potentiellement actifs contre les bactéries. On peut citer par exemple les défensines (bêta-défensine 11, galline), les protéines de type histones et les protéines de type LBP (« LPS-binding proteins ») liant le lipopolysaccharide. Certaines de ces molécules pourraient être impliquées dans la modulation de l'activité anti-*S. aureus* observée dans notre étude.

CONCLUSION

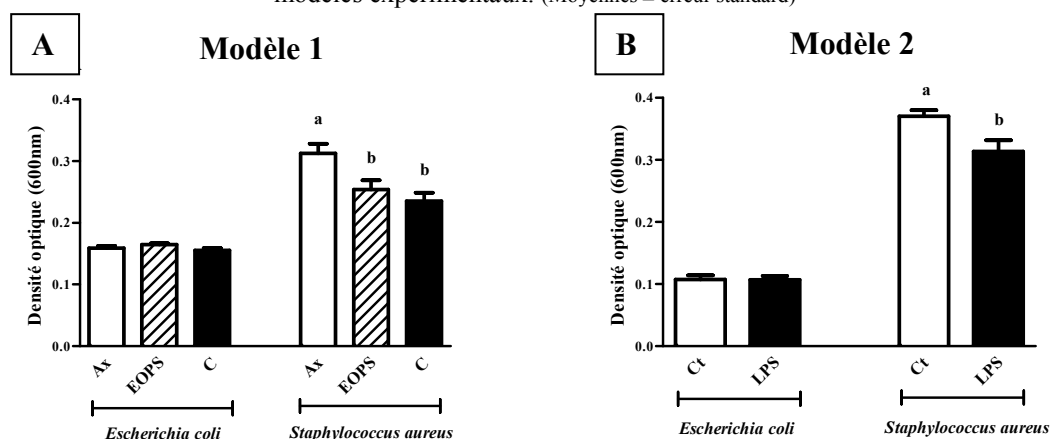
Les propriétés antibactériennes de l'œuf, en particulier l'activité anti-*S. aureus*, sont renforcées par la poule en réponse à des stimuli immunitaires exercés par son environnement microbien. La réponse antibactérienne semble sélective et d'intensité modérée au regard des effets observés sur les deux bactéries testées dans notre étude. Le renforcement de l'activité antimicrobienne ne semble pas lié aux composés antimicrobiens majeurs du blanc d'œuf, mais plus vraisemblablement à des molécules mineures qui restent à identifier.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Mann K., 2007. Proteomics. 7(19):3558-3568.
- Mann K., Mann M., 2011. Proteome Sci. 9(1), 7.
- Réhault-Godbert, S. et al, 2010. J Food Prot. 73(9), 1604-1612.
- Réhault, S. et al, 2007. INRA Productions Animales, 20(4), 337-348.
- Rose M.E., Orlans, E., 1981. Dev Comp Immunol, 5(1), 15-20.
- Shaw L. et al, 2004. Microbiology, 150(Pt 1), 217-228.
- Shawkey M.D. et al, 2008. Behav Ecol. (19), 920-927.
- Sunwoo, H.H. et al, 1996. Poultry Sci. 75(3), 342-345.
- Tranter H.S., Board R.G., 1984. J Appl Bacteriol. 56(1), 53-61.

Tableau 1. Séquence des amorces utilisées en PCR quantitative en temps réel

Gène	Amorce sens	Amorce antisens	N° accession
Lysozyme	GGGAAACTGGGTGTGTGTTGCA	TCTTCTTCGCGCAGTTCACGCT	FJ542564.1
Ovotransferrine	GACTTGCAGGGCAAGAACTC	GCTGGCAGAGAAAACTTGG	NM_205304.1
TBP	GCGTTTGTCTGCTGTTATTATGAG	TCCTTGCTGCCAGTCTGGAC	NM_205103.1

Figure 1. Croissance de *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* en présence de blancs d'œufs des deux modèles expérimentaux. (Moyennes $\pm$ erreur standard)**Tableau 2.** Activités lysozyme et antiprotéases dans les blancs d'œufs des modèles expérimentaux 1 et 2.

	Modèle 1			Effet lot	Modèle 2		Effet lot
	Ax	EOPS	C		Ct	LPS	
Activité lysozyme (U/ml)	436133 (± 48676)	442933 (± 53573)	441733 (± 46642)	NS	753583 (± 14297)	739250 (± 16921)	NS
Activités antiprotéases résiduelles (% du contrôle) :							
Anti-trypsine	46.38(± 0.92)	46.32(± 1.45)	45.93(± 0.93)	NS	n.d.	n.d.	
Anti-chymotrypsine	44.17(± 1.46)	48.61(± 1.64)	48.75(± 1.55)	NS	n.d.	n.d.	
Anti-papaine	45.42(± 1.67)	43.66(± 1.75)	41.80(± 1.10)	NS	n.d.	n.d.	

Moyenne ($\pm$ erreur standard) ; NS : non significatif ; n.d. : non déterminé**Figure 2.** Expression des gènes codant le lysozyme et l'ovotransferrine dans le magnum des poules dans les modèles expérimentaux 1 et 2. (Moyennes $\pm$ erreur standard)