



HAL
open science

Evaluation comparative de l'activité protéolytique d'une bactérie du groupe *Bacillus cereus* en milieu à base d'oeuf liquide ou gélosé

Arnaud Fichant

► **To cite this version:**

Arnaud Fichant. Evaluation comparative de l'activité protéolytique d'une bactérie du groupe *Bacillus cereus* en milieu à base d'oeuf liquide ou gélosé. Microbiologie et Parasitologie. 2019. hal-02787605

HAL Id: hal-02787605

<https://hal.inrae.fr/hal-02787605>

Submitted on 5 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.

FICHANT Arnaud

**AGRO
CAMPUS**
OUEST

Evaluation comparative de l'activité protéolytique d'une bactérie du groupe *Bacillus cereus* en milieu à base d'œuf liquide ou gélosé

Master Microbiologie

Etablissement de Formation :

Université de Rennes1
2 rue du Thabor - CS 46510
35065 Rennes CEDEX

Organisme d'accueil :

UMR 1253 Agrocampus Ouest -
INRA STLO CS 84215 65 rue de
Saint-Brieuc 35042 Rennes
FRANCE

Encadrement :

Sophie Jan
Valérie Lechevalier

Année 2018-2019

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes maîtres de stage Sophie Jan et Valérie Lechevalier pour m'avoir donné la possibilité de réaliser ce stage au sein de l'UMR STLO à Agrocampus-Ouest-INRA et pour leurs conseils et aides sur comment aborder ce sujet de stage.

Je remercie tout particulièrement Fabienne Gonnet qui m'a formée pour les manipulations de microbiologie et sur les bonnes pratiques à avoir en laboratoire P2. Je remercie aussi grandement les personnes avec qui j'ai pu interagir au laboratoire ; Louis Julien, Noël Grosset, Antoine Culot et Gwladys Chansigaud pour les aides quotidiennes durant les expériences.

Je remercie enfin toute l'équipe MICROBIO pour m'avoir accueilli pour ce stage, pour les discussions et échanges enrichissants auxquels j'ai participé ainsi que pour la bonne ambiance générale durant ces 3 mois.

Table des matières

Liste des abréviations

1.	Introduction	1
1.1	L'œuf et les ovoproduits	1
1.2	Contamination et conséquences	2
1.3	Objectifs	4
2.	Matériels et Méthodes	5
2.1	Caractéristiques des matériels biologiques	5
2.2	Préparation de l'entier liquide stérile et du milieu optimum à 2,6% d'entier	5
2.3	Suivi de l'altération de l'entier liquide	6
2.4	Suivi et analyse de l'hydrolyse en milieu optimal à 2,6% d'entier gélosé	7
2.5	Dosage des protéines totales	7
2.6	Electrophorèse Laemmli SDS-PAGE	7
3.	Résultats et Discussion	8
3.1	Capacité d'altération de l'entier liquide	8
3.1.1.	Suivi de croissance	8
3.1.2.	Mesure du pH	9
3.1.3.	Evolution de la couleur	9
3.2	Analyse de l'activité enzymatique sur milieu gélosé	11
3.3	Caractérisation de l'activité protéolytique par SDS-PAGE	12
3.3.1.	Entier liquide à 100%	13
3.3.2.	Entier liquide à 2,6%	13
3.3.3.	Milieu gélosé à 2,6% d'entier	14
4.	Conclusion et Perspectives	15
5.	Bibliographie	16

Liste des abréviations :

BCA: Bicinchoninic Acid

BSA: Bovine Serum Albumin

BHI-YE: Brain Heart Infusion Yeast Extract

DDT: Dithiothreitol

HBL: Hemolysin BL

HDLs: High –Density Lipoproteins

LDLs: Low –Density Lipoproteins

NHE: Non-Haemolytic Enterotoxin

PCA: Plate Counting Agar

SDS: Sodium Dodécyl Sulfate

SDS-PAGE: Sodium Dodécyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis

CFU: Colony-Forming Unit

1. Introduction

1.1 L'œuf et les ovoproduits

La production d'œufs au niveau mondial a atteint près de 73,5 millions de tonnes en 2017 (1). A l'heure actuelle, l'œuf représente une source de protéines, de vitamines et de lipides alimentaires pour de nombreux pays dans le monde. Le marché de l'œuf de poule pondeuse est largement dominé par la Chine suivie ensuite des Etats-Unis et de l'Inde (1). Au niveau Européen, la France est le premier producteur d'œufs coquille. La consommation d'œufs se fait majoritairement sous forme œufs coquille. Cependant, cet aliment est utilisé pour de nombreuses applications lorsqu'il est transformé. Ainsi, dans l'industrie, on retrouve l'œuf sous diverses formes ; séparé, avec le jaune d'un côté et le blanc d'un autre ou sous forme d'entier qui correspond à un mélange des deux parties (2). Par la suite, ces éléments peuvent subir différents traitements pour donner des produits liquides, séchés, congelés ou surgelés (2). Ces divers produits issus du cassage des œufs sont appelés ovoproduits de première transformation. L'entier liquide représente à lui seul 50% des ovoproduits commercialisés en Europe et représente un intérêt économique non négligeable pour l'industrie de l'œuf et des ovoproduits (3).

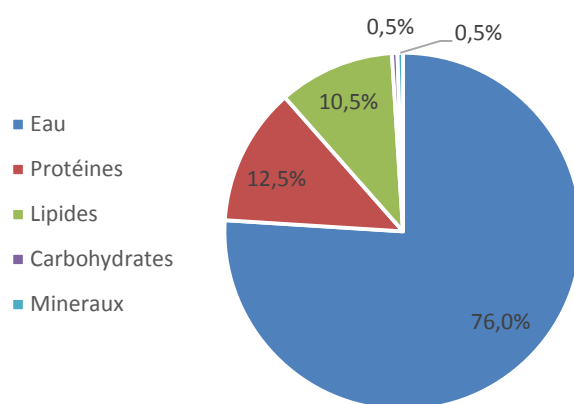


Figure 1 : Composition moyenne de l'entier en pourcentage du poids totale (2)

L'entier liquide est l'ovoproduit le plus commercialisé car il possède de nombreuses propriétés utiles dans l'industrie agroalimentaire mais aussi dans la restauration hors domicile. La Figure 1 montre que l'entier est constitué de 76% d'eau, 12,5% de protéines, 10,5% de lipides, 0,5% de minéraux et 0,5% de glucides. Les protéines proviennent majoritairement du blanc d'œuf avec notamment l'ovalbumine qui correspond à plus de 50% des protéines du blanc (2). On trouve aussi de nombreuses protéines glycosylées comme l'ovotransferrine (13%) ou l'ovomucoïde (11%). Les lipides de l'œuf proviennent du jaune et sont composés essentiellement de triglycérides, de phospholipides et de cholestérol (2,4). En effet, le jaune est un élément riche

en lipides qui sont retrouvés exclusivement liés à des protéines qualifiées de lipoprotéines de faible densité ou low-density lipoproteins (LDLs) ou de forte densité ou high –density lipoproteins (HDLs). Les LDLs correspondent à une association de phospholipides, d’apoprotéines (6 apoprotéines majeures identifiées) et de cholestérol organisés sous forme de micelles (5). Les HDLs sont des structures très riches en protéines (5 apoprotéines majeures identifiées) et plus pauvres en lipides que les LDLs ; de plus, elles ne s’organisent pas sous forme de micelles solubles. On les retrouve organisées en granules (6). Ces LDLs et HDLs peuvent être glycosylées ou phosphorylées. Les autres protéines importantes du jaune sont des protéines globulaires, les livétines et une protéine présente dans les granules, la phosvitine (4). La composition de l’entier en fait un milieu de culture idéal pour les micro-organismes et permet notamment l’expression d’activités altérantes telles que la lipolyse et la protéolyse (4).

1.2 Contamination et conséquences

L’intérieur de l’œuf est considéré comme un environnement stérile. En effet, l’œuf est doté d’une structure qui lui permet d’empêcher la pénétration des micro-organismes jusqu’au jaune, milieu favorable à leur croissance.

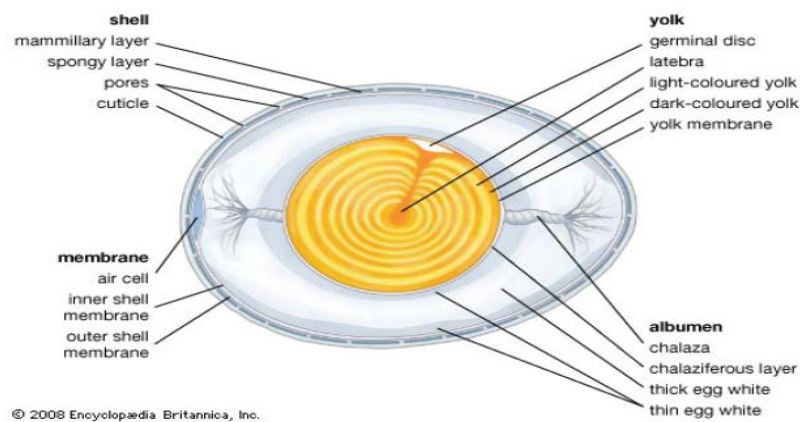


Figure 2 : Structure interne de l’œuf de poule (2)

La coquille est le premier rempart contre les micro-organismes. Cependant, cette structure calcaïque poreuse permet le passage des bactéries par les pores s’ils ne sont pas obstrués par la cuticule, couche la plus externe de l’œuf. La Figure 2 permet de voir que la cuticule ainsi que les deux membranes coquillères présentes sous la coquille assurent, quand elles sont intègres, l’inaccessibilité du contenu interne de l’œuf aux bactéries. De plus, le blanc, avec ses caractéristiques antimicrobiennes, ainsi que la membrane vitelline entourant le jaune, sont des barrières supplémentaires atténuant le risque de contamination et de développement microbien dans l’œuf (2,7).

Une contamination peut cependant survenir pendant la formation de l'œuf dans l'oviducte de la poule, si la poule est infectée. On parle alors de contamination verticale et la bactérie la plus souvent impliquée est *Salmonella* Enteritidis. Lorsque la contamination provient de l'environnement de l'œuf après la ponte (élevage, transport, centre de conditionnement, casserie), on parle alors d'une contamination horizontale. Cette contamination est considérée comme étant la source de contamination la plus fréquente de l'ovoproduit produit non transformé ou cru, et est surtout le fait de bactéries à coloration de Gram positive (7).

La contamination des œufs par les micro-organismes représente un problème sanitaire majeur. Les salmonelles, et principalement du sérotype *Salmonella* Enteritidis, sont en effet à l'origine d'épidémies liées à la consommation d'œufs ou d'ovoproduits avec près de 92% des cas reportés en Europe entre 2014 et 2016 (8). À l'heure actuelle, les pratiques d'hygiène en élevage, les campagnes de vaccination et le contrôle des élevages ont permis de réduire l'incidence de *Salmonella* en Europe (8,9). Cependant, les faibles barèmes mis en œuvre, en raison de la forte thermo-sensibilité des protéines de l'œuf, sont inefficaces vis-à-vis des cellules sporulées et les conditions de stockage réfrigéré des ovoproduits liquides pasteurisés s'accompagnent de la sélection de bactérie psychrotrophes. Ces bactéries sporulantes capables de se développer à faible température sont peu compétitives dans l'œuf et l'ovoproduit cru, mais se trouvent sélectionnées par les procédés industriels. Il s'agit notamment des bactéries appartenant au groupe *Bacillus cereus* (9).

Le groupe *Bacillus cereus* correspond à des bactéries à coloration de Gram positive, sporulantes, anaérobies facultatives, ubiquitaires et dont certaines espèces sont considérées comme des pathogènes alimentaires. À l'heure actuelle, le groupe est composé de neuf espèces : *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis*, *B. cereus (sensu stricto)*, *Bacillus cytotoxicus* et *Bacillus wiedmanni* (10). La classification est basée sur différents critères subjectifs tels que la virulence comme pour *B. anthracis*, la morphologie avec les colonies spécifiques formées par *B. mycoides* et *B. pseudomycoides*, et la physiologie, comme la capacité de se développer à de faibles températures, comme pour *B. weihenstephanensis*. Cependant, cette classification ne correspond pas à la divergence génétique du groupe au vu du fort pourcentage d'hybridation ADN-ADN entre les membres. Guinebretière et ses collaborateurs (2008) ont étudié les relations phylogénétiques d'une collection de souche du groupe *B. cereus* et ont développé une structuration en 7 groupes phylogénétiques associés à un domaine de températures (11). Parmi

ces groupes, deux sont psychrotrophes et susceptibles d'être sélectionnés par les procédés de réfrigération succédant à la pasteurisation.

Ces bactéries pouvant être retrouvées tout le long de la chaîne de production, car elles survivent à la pasteurisation et ont la capacité d'adhérer aux surfaces, peuvent présenter un risque pour la santé ainsi que pour la qualité des produits. En effet, certaines souches sont connues pour produire des entérotoxines ainsi qu'une toxine émétique pouvant provoquer des diarrhées ou des vomissements, respectivement (12). De plus, elles sont connues pour exprimer des activités protéo- et lipolytiques à l'origine d'altérations, rendant l'ovoproduit impropre à la consommation. Les souches psychrotrophes présentent un danger supplémentaire car elles sont capables de produire des enzymes, et potentiellement des toxines même à faible température.

1.3 Objectifs

L'objectif est de développer une méthode de détection simple, fiable et peu coûteuse pour l'industriel permettant d'apprécier au plus tôt les risques d'altération d'un ovoproduit tel que l'entier pasteurisé. Cet ovoproduit a été choisi comme modèle en raison de sa richesse en éléments nutritifs, et du fait qu'il représente le produit le plus commercialisé. On cherche donc à mettre en évidence une activité hydrolytique potentiellement altérante avant qu'elle ne se manifeste dans l'ovoproduit industriel. On se propose donc d'utiliser un milieu optimum PC ou PCA (Plate Counting ou Plate Counting Agar) complété avec l'ovoproduit à analyser, et de suivre l'apparition de halos d'hydrolyse autour de colonies susceptibles de se développer lors d'une incubation au froid, pour mimer les conditions de stockage industrielles. Pour valider cette méthode de détection du risque d'altération, il a été nécessaire de déterminer si l'activité retrouvée en milieu solide était une bonne représentation de ce qui se passe dans un entier liquide en cours d'altération.

Pour cela, nous avons sélectionné une souche du groupe *B. cereus*, appartenant à l'« espèce » *B. weihenstephanensis*, préalablement isolée au laboratoire à partir d'un ovoproduit (entier pasteurisé) altéré provenant d'une casserie bretonne. Cette souche a la capacité de se développer à des températures inférieures à 7°C et d'exprimer des activités hydrolytiques et toxigènes sous certaines conditions (13). On souhaite caractériser la capacité de cette bactérie à altérer l'entier au froid (10°C). Sa croissance ainsi que sa capacité d'altération ont été appréciées directement dans l'entier liquide et en milieu gélosé à base d'entier. Dans ce milieu gélosé, les activités enzymatiques se manifestent par l'apparition de halos autour des colonies, dont la nature restait à préciser (protéolyse ou lipolyse).

Dans l'entier liquide, différents paramètres ont été mesurés en parallèle de la croissance, tels que le pH et la couleur. La technique de SDS-PAGE a été mise en œuvre pour caractériser les activités protéolytiques en milieu liquide (entier liquide) et les comparer à celles exprimées en milieu gélosé (PCA à base d'entier), après les avoir localisées dans les différents halos se développant autour des colonies.

2. Matériels et Méthodes

2.1 Caractéristiques des matériels biologiques

La souche BW1, du groupe *B. cereus* et appartenant à l'« espèce » *B. weihenstephanensis*, a été préalablement isolée à partir d'un entier pasteurisé altéré fourni par une casserie (13). Elle se développe à partir de 6°C, présente une température optimum de 30°C et ne présente aucune croissance au-delà de 42°C. La souche est capable de produire l'hémolysine BL (HBL), l'entérotoxine non-hemolytique (NHE) et l'entérotoxine-T dans de l'entier liquide et elle montre une activité cytotoxique à 10°C. De plus, elle possède une forte capacité d'adhésion aux surfaces industrielles en inox.

2.2 Préparation de l'entier liquide stérile et du milieu optimum à 2,6% d'entier

L'obtention de l'entier stérile est réalisée par le cassage en condition d'asepsie d'œufs frais datant d'au moins une semaine. Pour cela, les coquilles sont lavées à l'éthanol à 70°C puis les œufs sont stérilisés par flambage à l'éthanol absolu. En condition stérile, l'œuf est cassé et son contenu est récupéré dans un bécher stérile. L'entier est homogénéisé à l'aide d'un Ultra-Turrax Blender T25 à 8000 rpm pendant 1 min (13). La tige Ultra-Turrax utilisée est au préalable stérilisée. Un contrôle de stérilité est effectué en homogénéisant 1 mL d'entier avec du milieu Brain Heart Infusion Yeast Extract (BHI-YE ; BIOKAR diagnostics, Beauvais, France) dans une boîte de Pétri, puis en incubant la boîte à 30°C pour la nuit et en vérifiant l'absence de croissance.

Une émulsion d'entier stérile à 26% (26 mL d'entier + 74 mL d'eau physiologique) est préparée. Ensuite 100 mL de l'émulsion sont ajoutés à 900 mL de milieu liquide ou gélosé (PCA ; Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) en surfusion pour obtenir une concentration finale d'entier à 2,6%. Le milieu est ensuite réparti en tubes Eppendorf de 2 mL à hauteur de 1,8 mL par tube pour le milieu liquide ou coulé dans des boîtes de Pétri à raison de 15 mL par boîte pour le milieu gélosé à base d'œuf.

2.3 Suivi de l'altération de l'entier liquide

Pour le suivi de la croissance de BW1, la suspension cellulaire, provenant d'un cryotube, est d'abord relancée à deux reprises dans le milieu BHI-YE (30°, 24 h, sans agitation). La suspension est ensuite diluée pour réaliser une inoculation à 2% dans l'entier liquide 100% ou dans le milieu optimum à 2,6% d'entier. Tous les tubes Eppendorf de 2 mL sont ensuite incubés à 10°C pendant 21 j. Le dénombrement de la population bactérienne est réalisé par la méthode de comptage miniaturisée (micro-méthode) développée par Baron *et al* (2006) (14) avec 3 échantillons et 3 témoins analysés pour chaque temps d'incubation souhaité.

Après dénombrement, une mesure de pH est effectuée pour chaque tube à l'aide du pH-mètre W.TW pH340 préalablement étalonné.

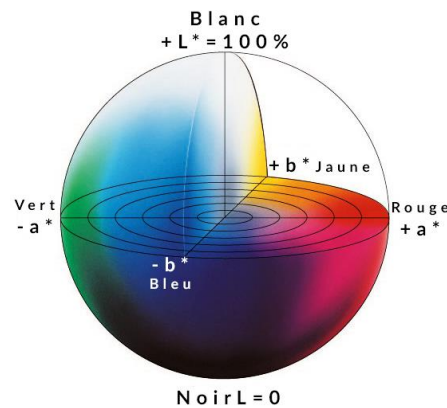


Figure 3 : Schéma de l'espace CIELAB

La mesure de la couleur est réalisée à l'aide du colorimètre MINOLTA CR-300. Pour ce faire, 1 mL est prélevé des tubes Eppendorf de 2 mL et déposé dans un puits d'une plaque 24 puits. L'appareil de colorimétrie détermine 3 paramètres : a^* , b^* et L^* . Les valeurs associées à ces paramètres en formant une représentation dans l'espace chromatique $L^*a^*b^*$ ou CIELAB, comme montré sur la *Figure 3*, sont utilisés pour calculer la différence de couleur entre les témoins et les échantillons. Cette différence, appelée ΔE , est calculée en utilisant la formule suivante : $\Delta E = \sqrt{\Delta a^{*2} + \Delta b^{*2} + \Delta L^{*2}}$ (15).

Afin de réaliser l'extraction des protéines, les échantillons d'entier 100% sont dilués au tiers avec de l'eau distillée stérile et subissent une centrifugation à 500 g pendant 10 min à 4°C pour séparer les lipides. Ensuite le surnageant d'entier 100% et le milieu à 2,6% d'entier non centrifugé sont centrifugés à 4000 g pendant 10 min à 4°C pour culotter les cellules. Le surnageant est une nouvelle fois récupéré et filtré sur un filtre stérile de 0,45 μm pour éliminer les bactéries. Les filtrats sont conservés à -20°C.

2.4 Suivi et analyse de l'hydrolyse en milieu optimal à 2,6% d'entier gélifié

L'inoculation est réalisée par dépôts de 5 μL (environ 3 log ufc/mL) au centre de la gélose d'une suspension bactérienne de BW1 déjà relancée à deux reprises dans du BHI-YE (incubation 24 h à 30°C sans agitation). Les boîtes sont ensuite incubées à 10°C pendant 21 jours. Pour chaque temps d'incubation à analyser, 3 boîtes inoculées et 3 boîtes témoin non inoculées sont sorties de l'étuve. Les boîtes sont scannées avant et après l'élimination de la colonie puis les halos formés par BW1 sont découpés à l'aide d'un scalpel. Les morceaux de gélose ainsi obtenus sont stockés à -20°C. Après décongélation, l'exsudat de gélose est récupéré pour être analysé par SDS-PAGE.

2.5 Dosage des protéines totales

Avant l'analyse par SDS-PAGE, la quantité de protéines de chacun des échantillons est déterminée par le kit de dosage protéique mettant en œuvre la méthode BCA (acide bicinchoninique) de GBIOSCIENCE (16). Les filtrats d'entier 100% sont dilués au 200^{ème} tandis que les filtrats d'entier à 2,6% et l'exsudat des gélifiés à 2,6% sont dilués au 100^{ème}. Le dosage est réalisé en plaque 96 puits à l'aide du Microplate Spectrophotometer *Thermo Scientific™ Multiskan™ GO* avec une incubation de 30 min à 37°C puis une lecture à 562 nm. Les concentrations des échantillons sont calculées à partir de l'équation de la droite d'étalonnage obtenue à partir d'une gamme de sérum albumine bovine (BSA).

2.6 Electrophorèse Laemmli SDS-PAGE

La technique SDS-PAGE permet de séparer les protéines selon leur masse moléculaire sous l'action d'un champ électrique, à travers une phase stationnaire (gel de polyacrylamide pré-coulé BioRad). Le SDS se fixe sur les chaînes polypeptidiques par formation de liaisons hydrophobes et donne ainsi la même densité de charge négative aux protéines qui migrent toutes vers l'anode (17). Afin de visualiser l'ensemble des protéines de l'œuf, on réalise un dépôt de 50 μg de protéines (1 à 2 μL pour l'entier 100% et 8 à 12 μL pour l'entier 2,6%). Les échantillons à analyser sont dilués avec la solution de dénaturation (2x Laemmli Sample Buffer + DDT 1 M BioRad) avec un ratio minimum de 1 :1 de façon à déposer la même quantité dans tous les puits. Un kit de poids moléculaire Precision Plus Protein™ unstained standards (BioRad) est aussi déposé sur chacun des gels. La migration est réalisée à tension imposée de 200 V pendant 40 min. Le gel est ensuite déposé dans une boîte en plastique contenant de l'eau distillée. La fixation des protéines est réalisée par trempage du gel dans une solution de fixation (TCA 20%) pendant 1h30. Après avoir effectué plusieurs rinçages à l'eau distillée, le gel est immergé dans une solution de coloration Bio-Safe Coomassie Stain G250 (BioRad) pendant 1 à 2 h. Enfin le

gel est décoloré dans une solution de décoloration (éthanol 20%) pendant une nuit (18). La lecture du gel est effectuée par un scanner via le logiciel *LabScan* (GE Healthcare) puis ce gel est analysé par le logiciel *Image Quant TL* (GE Healthcare).

3. Résultats et Discussion

3.1 Capacité d'altération de l'entier liquide

3.1.1. Suivi de croissance

L'entier liquide est un milieu de culture idéal pour les micro-organismes de par sa richesse en glucides, en protéines et en lipides. On cherche dans un premier temps à observer la croissance de la souche BW1 dans l'ovoproduct à 10°C pour se rapprocher des conditions de stockage appliquées dans l'industrie.

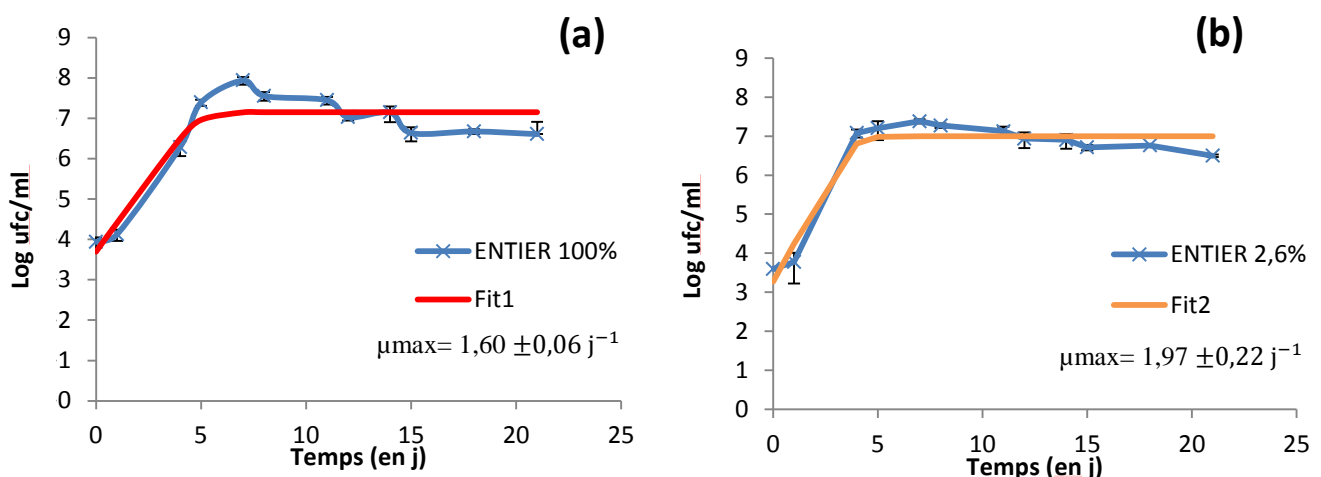


Figure 4: Croissance de BW1 à 10°C dans l'entier liquide 100% (a) ou 2,6% (b). Courbe adaptée via le logiciel DMFit (ComBase).

Le développement de BW1 à une température réfrigérée a été étudié dans l'entier liquide stérile à 100% et à 2,6%. La Figure 4 montre que BW1 a la capacité de se développer à 10°C dans l'entier à 100% aussi bien qu'à 2,6%. La phase stationnaire est atteinte après environ 4j pour l'entier 100% contre 5 j pour l'entier à 2,6%. La concentration cellulaire en phase stationnaire est supérieure dans l'entier à 100% (près de 8 log ufc/mL en 7 j), par comparaison aux 7 log ufc/mL observés après 7 j dans l'entier à 2,6%. Les taux de croissance spécifique maximum (μ_{max}) sont les mêmes dans les deux milieux (Test de Student : P value > 0,05). Après 8 j d'incubation, la population diminue pour les deux conditions.

3.1.2. Mesure du pH

Parallèlement au suivi de la croissance de BW1, une mesure du pH est réalisée. L'objectif est d'observer si le pH est un indicateur pertinent du degré d'altération de l'entier par la souche BW1. Le pH a été suivi pour les échantillons inoculés et pour les témoins non inoculés.

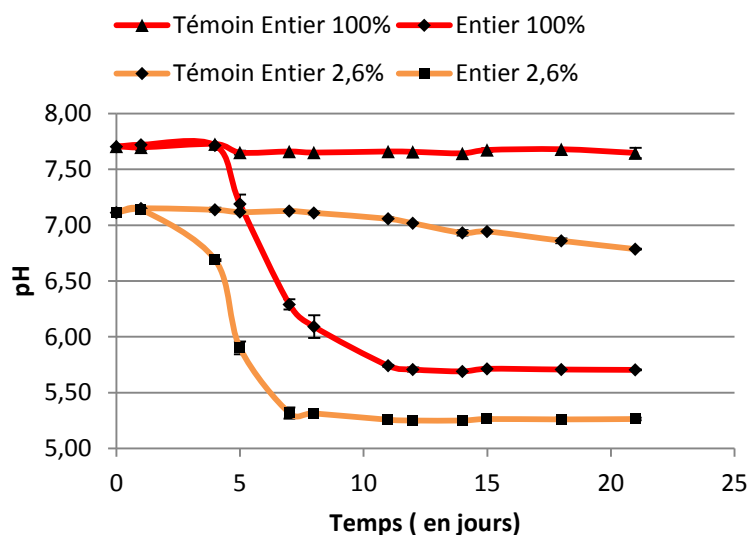


Figure 5: Mesure du pH dans l'entier liquide 100% et 2,6 %, inoculés avec BW1 et incubés pendant 21 j à 10°C

La Figure 5 permet d'observer une chute de pH de $2 \pm 0,01$ unités pour l'entier 100% inoculé et de $1,86 \pm 0,01$ unités pour l'entier à 2,6% inoculé. La chute de pH est plus précoce dans l'entier à 2,6% et est observable dès le 2^{ème} jour alors qu'on observe une décroissance à partir du 4^{ème} jour pour l'entier à 100%. On remarque aussi une légère acidification pour le témoin à 2,6%, qui commence à se manifester aux alentours du 2^{ème} jour. Sachant qu'aucune contamination n'a été détectée durant le suivi de croissance, on suspecte une dégradation des composés du milieu pouvant mener à une légère acidification du milieu. L'acidification du pH pour les milieux à base d'entier liquide peut être liée au métabolisme bactérien, tel qu'une production d'acides organiques ou la libération d'acides gras à partir des lipides de l'œuf (19).

3.1.3. Evolution de la couleur

La couleur est un indicateur direct de l'altération de l'entier liquide. Elle est due à la présence de caroténoïdes en faible quantité (carotènes, xanthophylle) originaires des lipides du jaune d'œuf (20). Ces pigments sont responsables de la coloration caractéristique du jaune, que l'on retrouve aussi dans l'entier.

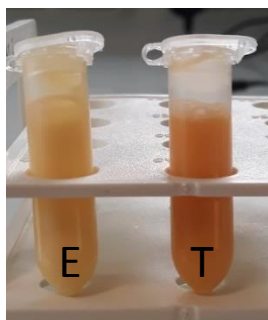


Figure 6 : Illustration de l'activité hydrolytique de *B. weihenstephanensis* sur l'entier liquide 100%; entier altéré **E**, témoin **T**

L'altération de l'entier liquide 100% se traduit par un épaissement et un blanchissement. Parallèlement au développement de BW1, il passe de l'orangé au blanc crémeux, comme illustré sur la Figure 6. Le colorimètre permet de mesurer la variation de couleur dans l'entier liquide à 100% et à 2,6%.

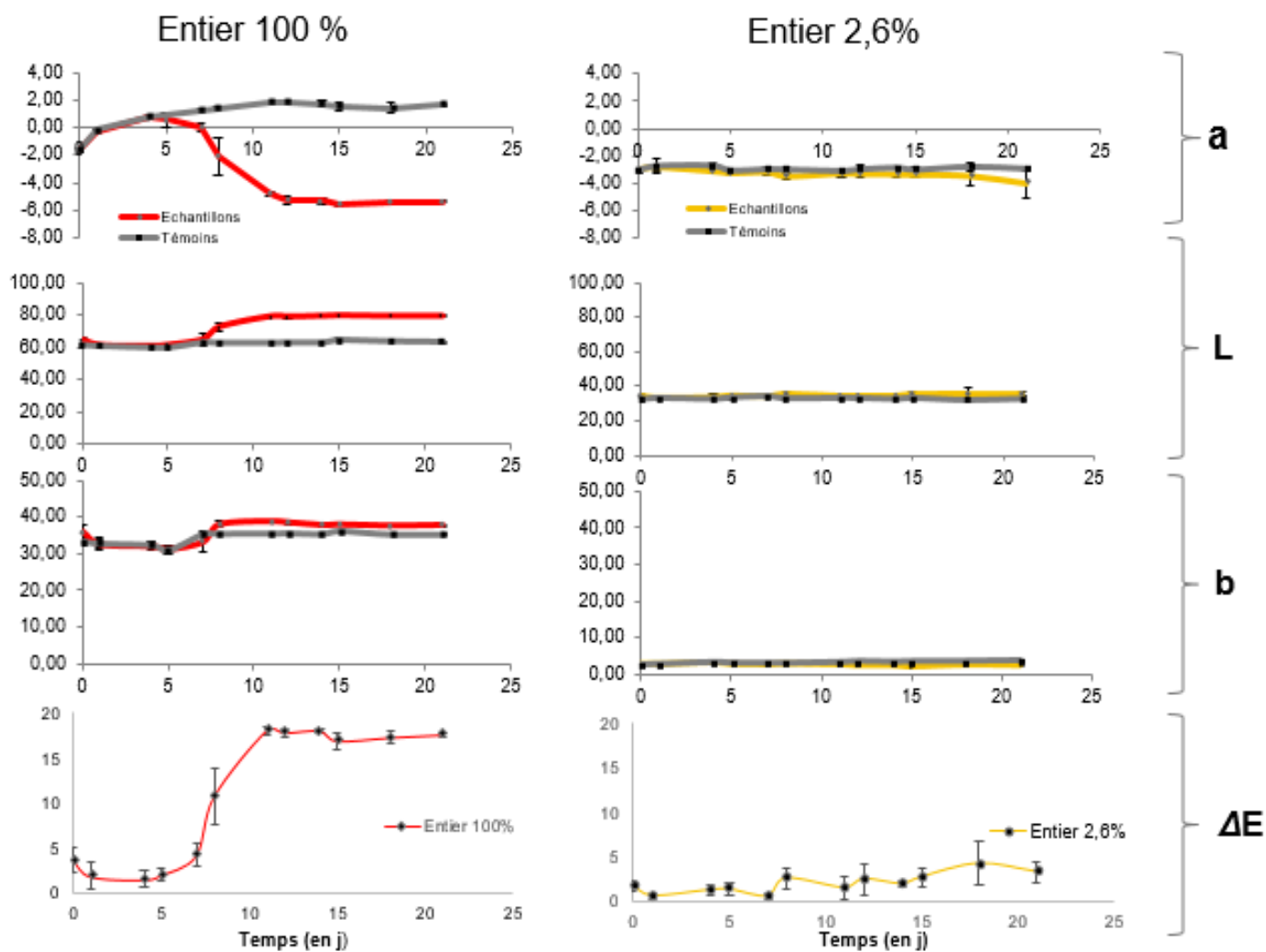


Figure 7: Mesure des paramètres de colorimétrie et détermination du ΔE dans l'entier 100% et 2,6%, inoculés avec BW1 et incubés à 10°C

Le suivi des paramètres de colorimétrie $a^*b^*L^*$ permet de donner une bonne représentation de la capacité d'altération de l'entier liquide à 100% et à 2,6% par BW1. La *Figure 7* présente les courbes obtenues pour chacun des paramètres ainsi que pour le ΔE calculé. Pour l'entier à 2,6%, on n'observe pas de variation de a^* , b^* et L^* . Cependant, le ΔE est compris entre 1,5 et 3, ce qui indique qu'une différence est détectée par le colorimètre alors qu'elle n'était pas perçue à l'œil nu (Test de Student P value < 0,05 moyennes différentes entre T_0 et T_{final}). Pour l'entier 100%, on observe une diminution du paramètre a^* à partir du 5^{ème} jour, simultanément à la diminution de pH préalablement observée (*Figure 5*). La valeur du paramètre L^* subit une augmentation autour du 7^{ème} jour, ce qui conforte l'observation visuelle d'un blanchissement de l'entier en cours d'altération. En effet, plus le L^* est proche de 100 et plus le produit est blanc. Comme pour l'entier à 2,6%, on n'observe pas de variation notable du paramètre b^* . Enfin, le ΔE déterminé pour l'entier à 100% est largement supérieur à 3, indiquant une différence très distincte entre l'entier altéré et le témoin. La dégradation des caroténoïdes peut être à l'origine du changement de la couleur de l'entier mais des modifications de la rhéologie du milieu peuvent aussi en être à l'origine, via la dégradation des protéines, modifiant la structuration interne et l'aspect de l'entier.

Ces travaux montrent que BW1 a une forte capacité de développement et d'altération dans l'entier liquide. En effet, on observe une diminution du pH et un changement de couleur très significatif dans l'entier 100%. Bien que la variation de couleur dans l'entier 2,6% soit beaucoup moins évidente que dans l'entier à 100%, la chute de pH y est plus précoce, ce qui laisse penser que la mesure du pH soit une méthode plus sensible que la mesure de couleur pour mettre en évidence l'altération de l'entier liquide.

3.2 Analyse de l'activité enzymatique sur milieu gélosé

Après avoir mis en évidence le développement et la capacité d'altération de BW1 à 10°C dans l'entier liquide, on souhaite observer son activité enzymatique, et notamment son activité protéolytique sur un milieu gélosé à 2,6%. La surface totale du halo d'hydrolyse est mesurée et son augmentation est suivie à 10°C pendant 21 jours afin d'estimer l'activité enzymatique totale (protéolyse et lipolyse). Sur la *Figure 8*, on observe que l'expression de l'activité enzymatique augmente considérablement au cours du temps, pour atteindre $5157 \pm 213 \text{ mm}^2$ après 21 j, par comparaison au développement de la colonie (surface de $670 \pm 185 \text{ mm}^2$ au même temps). L'apparition de nouveaux halos est indiquée par une flèche bleue. Au total, 5 halos sont identifiés si l'on tient compte de la zone présente sous la colonie (*Figure 9*).

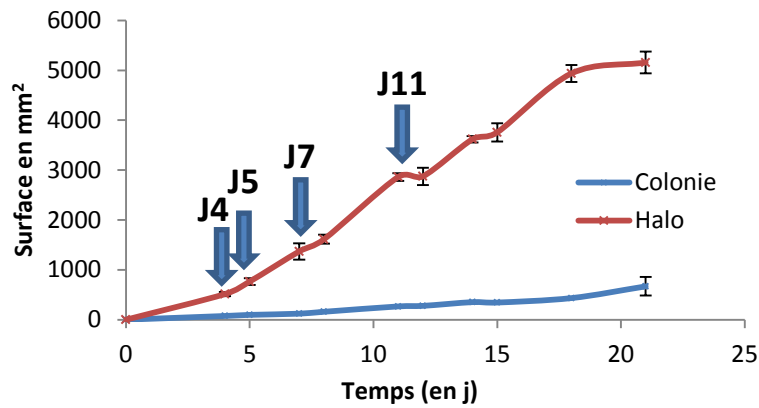


Figure 8: Evolution de la croissance et de l'activité enzymatique de BW1 sur milieu gélosé à 2,6 % d'entier incubé à 10°C. Chaque flèche correspond à l'apparition d'un nouveau halo d'hydrolyse. Réalisé avec le logiciel ImageJ (NIH).

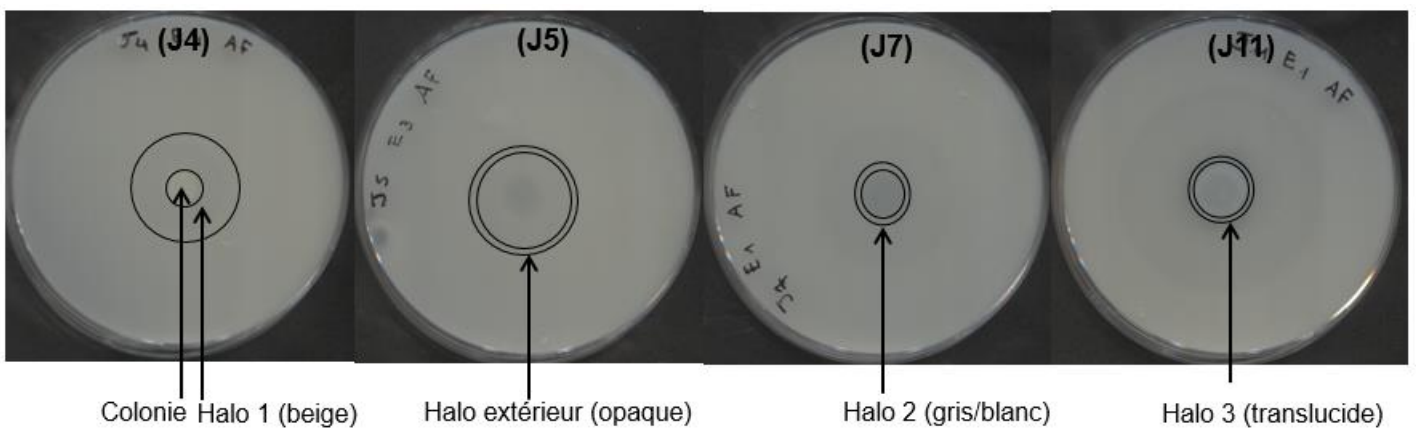


Figure 9 : Identification et apparition des halos d'hydrolyse sur milieu gélosé à 2,6% d'entier incubé à 10°C. Halo 1 au jour 4 (J4), Halo extérieur au jour 5 (J5), Halo 2 au jour 7 (J7) et Halo 3 au jour 11 (J11)

Sur d'autres milieux gélosés, l'activité lécithinase peut être identifiée pour des bactéries du groupe *B. cereus* par la formation d'un halo trouble autour de la colonie (21). Cependant, avec le milieu gélosé à 2,6% d'entier, la diversité des halos formés par BW1 ne nous permet pas de conclure sur l'activité enzymatique mise en jeu. Les différents halos sont donc découpés et analysés par SDS-PAGE afin de localiser l'activité protéolytique et de la comparer à celle exprimée par BW1 dans l'entier liquide.

3.3 Caractérisation de l'activité protéolytique par SDS-PAGE

Pour l'analyse de l'activité protéolytique de BW1 dans l'entier liquide, une extraction des protéines est réalisée à chaque temps, pour chaque échantillon et pour le témoin. La concentration en protéines est déterminée par un dosage BCA afin de déposer la même quantité de protéines (50 µg) dans les gels d'acrylamide. Les résultats pour 4 j, 8 j et 21 j sont présentés sur la Figure 10 pour l'entier 100% et sur la Figure 11 pour l'entier à 2,6%. Le jour 4 correspond à un point en phase exponentielle de croissance, le jour 8 à un point en phase stationnaire et le jour 21 comme le temps final d'incubation à 10°C.

3.3.1. Entier liquide à 100%

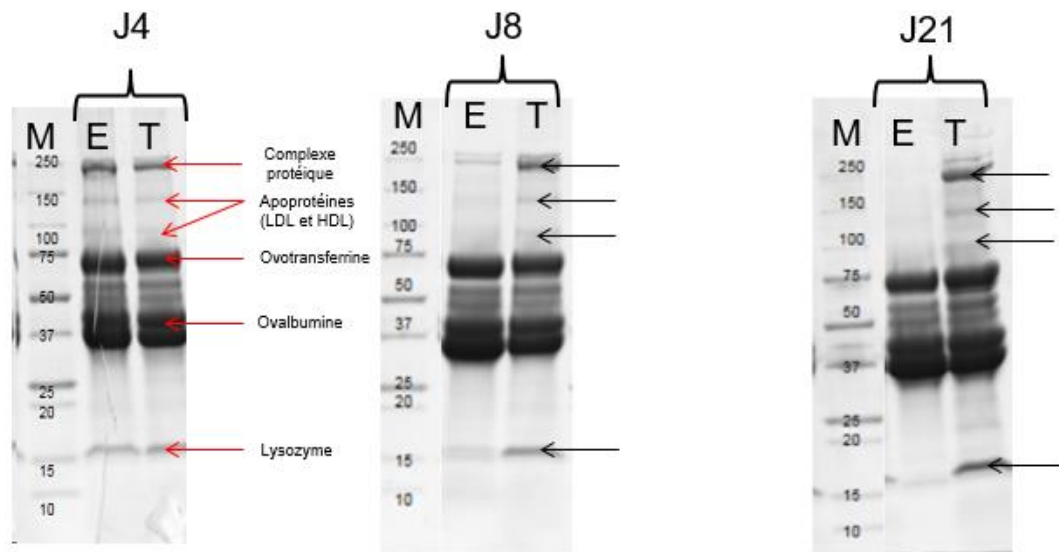


Figure 10 : Gels SDS-PAGE des filtrats protéiques de 4 j, 8 j et 21 j issus de la croissance de BW1 dans l'entier à 100% à 10°C. Marqueur de taille en kDa (M), Echantillon (E), Témoin (T)

L'analyse des témoins d'entier non inoculé de la Figure 10 permet d'identifier certaines protéines du blanc comme l'ovalbumine (45 kDa), l'ovotransferrine (75 kDa) et le lysozyme (14 kDa) et des protéines du jaune avec une protéine représentant 71% des apoprotéines des LDLs à 130 kDa et une apoprotéine des HDLs à 110 kDa. Pour les échantillons, une dégradation est observable à partir de 8 j avec une disparition des bandes des apoprotéines, du lysozyme et du complexe protéique à 250 kDa. Après 21 j, les bandes des protéines précédemment citées ne sont plus visibles.

3.3.2. Entier liquide à 2,6%

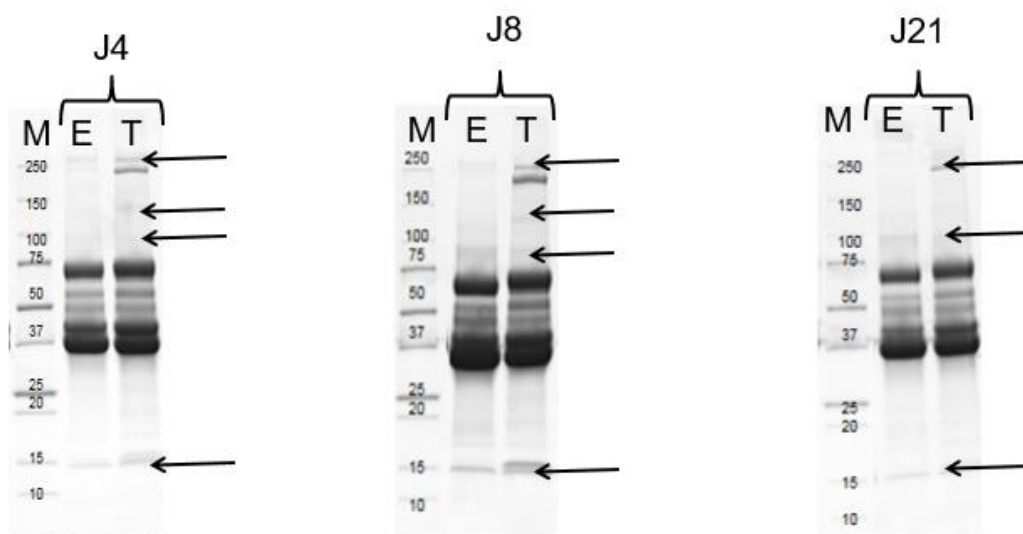


Figure 11 : Gels SDS-PAGE des filtrats protéiques de 4 j, 8 j et 21 j issus de la croissance de BW1 dans l'entier à 2,6% à 10°C. Marqueur de taille en kDa (M), Echantillon (E), Témoin (T)

Pour l'entier à 2,6%, la *Figure 11* indique que la dégradation est plus précoce qu'à 100% car la disparition des bandes du lysozyme, des apoprotéines et du complexe protéique à 250 kDa est observable à partir de 4j. La nature de l'activité protéolytique observée dans l'entier 100% et dans l'entier 2,6% semble être similaire.

3.3.3. Milieu gélosé à 2,6% d'entier

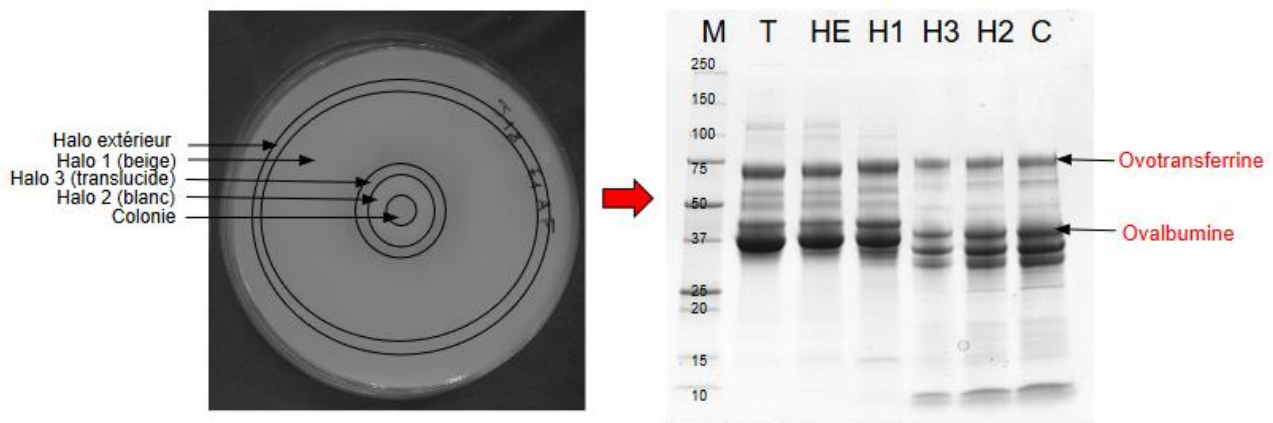


Figure 12 : Identification de l'activité protéolytique à partir des exsudats de gélose dans les halos d'hydrolyse formés après 21 j d'incubation à 10°C de BW1 sur milieu gélosé à 2,6% d'entier. Marqueur de taille (M), Témoin (T), Halo extérieur (HE), Halo 1 (H1), Halo 2 (H2), Halo 3 (H3), Halo sous colonie (C).

Pour le milieu gélosé, la dégradation est observée à partir du 5^{ème} jour (données non présentées). L'activité protéolytique mise en évidence sur la *Figure 12* permet d'identifier la dégradation de certaines protéines dans les halos C, H2, H3 et H1. Dans le halo HE, on n'observe pas de dégradation visible sur le gel, on peut donc supposer que l'activité d'altération est de nature lipolytique. Néanmoins, la nature de l'activité identifiée dans les halos semble être différente de celle observée dans l'entier liquide puisque c'est l'ovalbumine et l'ovotransferrine qui sont principalement dégradées. De plus, toutes les protéines identifiées dans les témoins d'entier liquide ne sont pas retrouvées dans les témoins d'entier à 2,6% sur milieu gélosé. La méthode de récupération des protéines par l'exsudation des morceaux de gélose ne permet peut-être pas de voir toutes les protéines de l'entier par SDS-PAGE. La présence d'agar dans la gélose peut faire office de tamis moléculaire et piéger une partie des protéines de masse moléculaire importante, ce qui expliquerait que le complexe protéique et l'apoprotéine des HDLs ne soient pas visibles à partir de l'exsudat.

4. Conclusion et Perspectives

La souche psychrotrophe BW1, de l' « espèce » *B. weihenstephanensis*, est associée à un risque d'altération des ovoproduits de par sa capacité à survivre aux procédés industriels. Les différentes expériences ont confirmé ses fortes capacités de développement et d'altération dans l'entier liquide, qui se traduisent par une diminution non négligeable du pH et une modification de la couleur. Les résultats obtenus pour l'entier liquide à 100% et à 2,6% sont similaires. Néanmoins, la détection de l'altération est plus précoce dans l'entier à 2,6%.

L'étude des différents halos sur milieu gélosé a permis de localiser l'activité protéolytique dans les halos autour de la colonie et de supposer une activité de nature lipolytique dans le halo le plus extérieur. Les résultats des analyses par SDS-PAGE laissent supposer que la nature de l'activité protéolytique est différente quand le milieu à base d'entier est sous forme liquide ou solide (gélosé). Cependant, la méthode de récupération des protéines par l'exsudation de la gélose ne permet peut-être pas de visualiser toutes les protéines identifiées dans l'entier liquide. Une optimisation de la méthode d'extraction/purification des protéines en milieu gélosé pourrait permettre d'observer toutes les protéines par SDS-PAGE et de confronter plus efficacement la nature des activités protéolytiques observées dans les deux milieux.

Pour poursuivre le développement de la méthode de détection avec un milieu à 2,6% d'entier, il faudrait tester à partir d'un entier pasteurisé contaminé si l'on observe l'apparition de colonies entourées d'un halo à 10°C. L'objectif serait de mettre en évidence l'expression d'une activité enzymatique par une flore psychrotrophe.

Toutes les expériences de croissance ont été réalisées à 10°C dans l'entier. Une analyse du protéome d'une souche de *B. weihenstephanensis* à 6 et 30°C a montré que l'expression de plusieurs centaines de protéines non caractérisées était sous la dépendance de cette température de croissance (22). Compléter l'étude de la souche BW1 à sa température optimale de croissance (30°C) serait donc intéressant pour déterminer si d'autres enzymes de dégradation sont mises à jeu à cette température.

Durant ce stage, l'étude de l'activité protéolytique n'a porté que sur une souche psychrotrophe du groupe *B. cereus* au pouvoir altérant. On pourrait continuer l'analyse en testant d'autres souches de la collection du laboratoire (toutes issues d'entiers pasteurisés industriels), appartenant aux groupes psychrotrophes II et VI décrits dans la classification de Guinebretière (11), afin d'étudier la diversité potentielle des activités enzymatiques exprimées par ces bactéries au froid.

5. Bibliographie

1. Note de conjoncture Poules pondeuses | ITAVI. 2017
2. Anton M, Lechevalier V, Nau F. 2016. From Eggs to Egg Products, p. 115–143. *In* Jeantet, R, Croguennec, T, Schuck, P, Brulé, G (eds.), Handbook of Food Science and Technology 3. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
3. Techer C, Baron F, Jan S. 2014. SPOILAGE OF ANIMAL PRODUCTS | Microbial Spoilage of Eggs and Egg Products, p. 439–445. *In* Encyclopedia of Food Microbiology. Elsevier.
4. Gonçalves O, Legrand J. 2018. Altération des ovoproduits: De la métabolomique au contrôle en ligne. ISTE Group.
5. Anton M. 2007. Low-density Lipoproteins (LDL) or Lipovitellenin Fraction, p. 7–12. *In* Huopalahti, R, López-Fandiño, R, Anton, M, Schade, R (eds.), Bioactive Egg Compounds. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
6. Anton M. 2007. High-density Lipoproteins (HDL) or Lipovitellin Fraction, p. 13–16. *In* Huopalahti, R, López-Fandiño, R, Anton, M, Schade, R (eds.), Bioactive Egg Compounds. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
7. Microbiologie de l'oeuf et des ovoproduits_F. Baron & S. Jan 2010.pdf.
8. Scientific Opinion on the public health risks of table eggs due to deterioration and development of pathogens. EFSA Journal 147.
9. Techer C, Baron F, Delbrassinne L, Belaïd R, Brunet N, Gillard A, Gonnet F, Cochet M-F, Grosset N, Gautier M, Andjelkovic M, Lechevalier V, Jan S. 2014. Global overview of the risk linked to the *Bacillus cereus* group in the egg product industry: identification of food safety and food spoilage markers. J Appl Microbiol 116:1344–1358.
10. Miller RA, Beno SM, Kent DJ, Carroll LM, Martin NH, Boor KJ, Kovac J. 2016. *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. Int J Syst Evol Microbiol 66:4744–4753.
11. Guinebretière M-H, Thompson FL, Sorokin A, Normand P, Dawyndt P, Ehling-Schulz M, Svensson B, Sanchis V, Nguyen-The C, Heyndrickx M, De Vos P. 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. Environ Microbiol 10:851–865.
12. Prüß BM, Dietrich R, Nibler B, Märtilbauer E, Scherer S. 1999. The Hemolytic Enterotoxin HBL Is Broadly Distributed among Species of the *Bacillus cereus* Group. Appl Environ Microbiol 65:5436–5442.
13. Baron F, Cochet M-F, Grosset N, Madec M-N, Briandet R, Dessaigne S, Chevalier S, Gautier M, Jan S. 2007. Isolation and Characterization of a Psychrotolerant Toxin Producer, *Bacillus weihenstephanensis*, in Liquid Egg Products. Journal of Food Protection 70:2782–2791.
14. Baron F, Cochet M-F, Ablain W, Grosset N, Madec M-N, Gonnet F, Jan S, Gautier M. 2006. Rapid and cost-effective method for micro-organism enumeration based on miniaturization of the conventional plate-counting technique. Lait 86:251–257.

15. Pathare PB, Opara UL, Al-Said FA-J. 2013. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food Bioprocess Technol* 6:36–60.
16. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150:76–85.
17. Laemmli UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680.
18. Garfin DE. 1990. [33] One-dimensional gel electrophoresis, p. 425–441. *In* Deutscher, MP (ed.), *Methods in Enzymology*. Academic Press.
19. Rosenfeld E, Duport C, Zigha A, Schmitt P. 2005. Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain. *Can J Microbiol* 51:149–158.
20. Nau F, Guérin-Dubiard C, Baron F, Thapon J-L. 2010. Science et technologie de l’oeuf. De l’oeuf aux ovoproduits.
21. Tallent SM, Kotewicz KM, Strain EA, Bennett RW. 2012. Efficient Isolation and Identification of *Bacillus cereus* Group. *J AOAC Int* 95:446–451.
22. Stelder SK, Mahmud SA, Dekker HL, de Koning LJ, Brul S, de Koster CG. 2015. Temperature Dependence of the Proteome Profile of the Psychrotolerant Pathogenic Food Spoiler *Bacillus weihenstephanensis* Type Strain WSBC 10204. *J Proteome Res* 14:2169–2176.

Résumé

L'entier liquide est un ovoproduit provenant du mélange de blanc et de jaune issus du cassage de l'œuf. Il représente près de 50% de la production d'ovoproduit en Europe. Sa composition en fait un milieu de culture idéal pour les micro-organismes et notamment la flore thermorésistante et psychrotrophe sélectionnée par les procédés industriels.

Dans l'objectif de développer une méthode de détection simple et rapide de l'altération de l'entier liquide, facile à mettre en œuvre au niveau industriel, et pouvant supplanter les méthodes classiques de détection des bactéries, la capacité de développement et d'altération (activités protéo- et lipolytiques) d'une souche psychrotrophe de *B. weihenstephanensis*, appartenant au groupe *Bacillus cereus*, a été comparée à 10°C dans des milieux liquides et gélosés à base d'entier.

Un fort pouvoir d'altération a été démontré dans l'entier liquide ainsi qu'une forte activité enzymatique sur le milieu gélosé à base d'entier, se manifestant sous forme de halos entourant les colonies. Néanmoins, la nature des activités protéolytiques mises en évidence par SDS-PAGE semble différer entre les milieux liquides et gélosés.

Mots clés : Ovoproduits, altération, groupe *Bacillus cereus*, psychrotrophie, activités enzymatiques.