



THESE



Présentée devant

**L'ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE AGRONOMIQUE
DE RENNES**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'ENSAR

Discipline: Biologie et Production Animale
Spécialité : Physiologie Aviaire

Présentée et soutenue publiquement
par

Ayman Mohamed Hassan AHMED

**Qualité sanitaire de l'œuf en cages aménagées et optimisation des
défenses naturelles de l'œuf :
Rôle de la coquille et des protéines antimicrobiennes du blanc
d'œuf**

Directeur de thèse :
Yves NYS

Soutenue le 18 novembre 2004

			Jury
SOLOMON	Sally	Professeur « Rapporteur »	Poultry Research Unit, Faculté Vétérinaire de Glasgow, Scotland « Ecosse »
LANGLOIS	Patrick	Directeur de recherches « Rapporteur »	AFSSA, Unité de Génétique Virale et Biosécurité, Zoopôle, Ploufragan
ERMEL	Gwennola	Professeur « Membre »	SVE-Interactions Cellulaires et Moléculaires, Université de Rennes 1
MARNET	Pierre Guy	Professeur « Membre »	Sciences et Production Animales, Agrocampus, Rennes
GAUTIER	Michel	Professeur « Membre »	Département Agro - Alimentaire, Agrocampus, Rennes
NYS	Yves	Directeur de recherches « Directeur de thèse »	INRA, Station de Recherches Avicoles, TOURS

A mes parents
A ma femme, *Iman*
A mes fils, *Mohamed et Mostafa*

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe Qualité des produits avicoles de la Station de Recherches Avicoles (INRA de Tours) et soutenu financièrement par le ministère de l'enseignement supérieur d'Égypte et l'Institut national de la Recherche Agronomique, centre de Tours (INRA).

Je remercie **Monsieur. Y. Nys**; directeur de la station de recherche avicoles INRA- Tours pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je le remercie vivement pour la confiance qu'il m'a accordé pour rejoindre son projet Européen (Eggdefense), pour son soutien moral et tout particulièrement sa patience et sa persistance dans les corrections des papiers et documents qui ne sont pas toujours logiques.

Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance aux **membres du Jury** de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

*Je remercie vivement tous les membres du groupe **Qualité de l'oeuf**: Mr. J. Gautron Mme ML. Vidal et également Mr. J. Michèle et Mme M. Mills pour m'avoir aidé au cours des différentes expériences et pour leur aide dans la révision du manuscrit*

*Je voulais également exprimer mes remerciements les plus chaleureuses à tous mes copains et amis qui m'ont soutenu de loin ou de près tout au long de cette période : **Néjib, Abdessalem, Sami, Hichem, Emi, Sébastien**. Enfin un grand merci aux animaliers pour leur sympathie, je tiens à remercier également l'ensemble des secrétaires*

LISTE DES ABREVIATIONS

AC	anticorps
BSA	Bovine serum albumin
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-Propanesulfonic acid $C_9H_{19}NO_3S$
EDTA	Ethylene Diamine-Tetra Acetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
kDa	Kilo Dalton
MW	Molecular Weight
OPD	Ortho PhenyleneDiamine
PAGE	PolyAcrylamid Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate buffer solution
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TPBS	(Phosphate Buffer Solution) avec 1% de Tween 20
Tris	Tris-(Hydroxymethyl) aminomethane
u.f.c.	Unité Formant Colonie

TABLE DES MATIERES

	Page
<u>INTRODUCTION GENERALE</u>	1
<u>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE :</u>	5
CHAPITRE 1 : L'œuf Structure et composition	6
I. Introduction	6
II. La formation de l'œuf (Figure 1)	6
III - Structure et composition de l'œuf (Tableau 1 & Figure 2)	8
III-1. Structure et composition de la coquille (Figure 3a,b)	9
Structure de la cuticule	10
Composition de la cuticule	10
Structure des parties calcifiées	10
Composition des parties calcifiées	11
Identification des constituants organiques de la coquille	11
A- Les protéines non spécifiques de la matrice organique de la coquille	12
A. 1. Les protéines du blanc d'œuf	12
A. 2. Les protéines ubiquitaires présentes dans d'autres tissus	13
B- Les protéines spécifiques de la matrice organique de la coquille	13
Structure des membranes coquillières	15
Composition des membranes coquillières	16
III-2. Structure et composition du blanc d'œuf	17
III-2. A. Structure du blanc d'œuf	17
III-2. B. Composition du blanc d'œuf (Tableau 2)	18
III-3. Composition du Jaune	19
CHAPITRE 2 : Risque de pénétration de microorganismes dans l'œuf	21
I. Introduction	21
II. Les microorganismes pathogènes	22
II. 1. Les Staphylocoques	22
II. 2. Les Salmonelles	22

III. Mode de contamination des œufs par les microorganismes	23
IV. Croissance des microorganismes dans l'œuf (Figure 4)	24
V. Les facteurs qui influencent la contamination des œufs	25
V-1. Les conditions d'élevage	25
V-2. L'état de l'œuf	26
V-3. Les conditions de stockage des oeufs	26
CHAPITRE 3 : Les Défenses Naturelles de L'œuf	28
I. Introduction	28
II. La coquille de l'œuf, une barrière de défense naturelle contre la pénétration des microorganismes	29
II-1. La cuticule (Figure 5)	29
II-2 Microstructure de la coquille	30
II-3. Rôle de la matrice organique dans la formation de calcite (Figure 6)	31
II-4. Les membranes coquillières	35
II-5. La coquille en tant que barrière chimique antibactérienne	35
II-6. La qualité de la coquille	36
II-6. A. Mesures de la qualité de la coquille (Figure 7 & Figure 8)	36
II-6. B. Les facteurs qui influencent la qualité de la coquille	39
a. Les facteurs physiologiques	39
b. Les facteurs nutritionnels	39
c. Les facteurs génétiques	40
d. Les systèmes d'élevages (Figure 9)	41
e. L'environnement	42
III. Le blanc : la deuxième barrière contre la croissance bactérienne dans l'oeuf	42
III-1. Le système de défense du blanc d'œuf repose sur ses propriétés physico-chimiques	42
III-2. Le blanc : une barrière chimique contre la croissance bactérienne	43
III-2. A. Le lysozyme	43
III-2. B. L'ovotransferrine (Figure 10)	45
III-2. C. L'avidine	46
III-2. D. Les inhibiteurs de protéase	46
III-3. Les facteurs pouvant moduler les propriétés antibactériennes de	47

l'albumen	
III-3. A. L'âge des poules	47
III-3. B. La génétique	48
III-3. C. Stockage des œufs	48
III-3. D. La température	49
La conclusion	50
<u>ETUDES EXPERIMENTALES :</u>	51
CHAPITRE 1 : Comparaison entre les propriétés mécaniques et hygiéniques de la coquille des œufs pondus dans des cages classiques et aménagées.	52
I. Objectifs du travail	53
II. Résultats & discussion	54
<i>Insertion de l'article 1 : Effect of beak trimming and of cage design on laying hen performance and egg quality</i>	
<i>Insertion de l'article 2 : Comparison of eggshell hygiene in two housing systems: Standard and furnished cages</i>	
CHAPITRE 2 : Modifications des propriétés mécaniques, de la structure cristallographique et de la teneur en protéines de la matrice de la coquille, induites par la mue chez la poule	58
I. Objectifs du travail	59
II. Résultats & discussion	60
<i>Insertion de l'article 3 : Changes in eggshell mechanical properties, crystallographic texture and in matrix proteins induced by moult in hens</i>	
CHAPITRE 3 : Variabilité génétique de l'activité antibactérienne du blanc d'œuf de poule	63
I. Introduction	65
II. Matériels et Méthodes	66
III. Résultats et discussion	75
IV. Références bibliographiques relatives au chapitre expérimental 3	80

<u>DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES</u>	87
I. Discussion générale	88
II. Perspectives	101
<u>ANNEXES</u>	104
ANNEXE 1. Mesure de la croissance bactérienne de <i>Salmonella enteritidis</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	105
ANNEXE 2. Insertion de l'article 4 : <i>Development of an ELISA for quantifying lysozyme in hen egg white</i>	108
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	109

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition des différents constituants d'œuf de poule (% du poids frais) d'après Sauveur, 1988, modifications extrêmes de composition selon Burley & Vadehra, 1989, d'après Board, 1969 et Thapon & Bourgeois, 1994).

Tableau 2. : Les principales protéines du blanc d'œuf de poule en % de protéines totales du blanc, leur point isoélectrique (pI) et leurs poids moléculaires (PW) en kDa (selon Sauveur, 1988 ; Burley et Vadehra, 1989 ; Mennichen et Waterloh, 1997 ; Mine, 2002 ; Lagarde, 2003).

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Schéma de synthèse de la formation de l'œuf chez la poule (selon Sauveur, 1988)

Figure 2. Structure interne de l'œuf de poule (d'après Gautron, 1994)

Figure 3 . a. Microscopie électronique à balayage (SEM x 160) d'une coupe transversale de coquille d'œuf de poule, **b.** Section radiale de coquille (selon Parsons, 1982 ; Nys et al., 1999), **1.** La cuticule, **2.** Couche des cristaux verticaux, **3.** Couche palissadique, **4.** Couche des cônes, **5.** Membrane coquillière externe, **6.** Membrane coquillière interne.

Figure 4 . Courbe de croissance de *S. enteritidis* dans l'albumen de l'œuf, 20°C (selon Humphrey, 1993).

Figure 5 . Section radiale de coquille illustrant le mouvement d'eau et l'échange des gazs (selon Board et al., 1994).

Figure 6 . La croissance des cristaux de calcite *in vitro* en présence de fluide utérin de phase de croissance de coquille. a et c : 25µg/ml ; b et d : 50µg/ml. Échelle : a,b et c= 2µm ; d= 1µm (selon Gautron et al., 1997 ; Dominguez-Vera et al., 2000)

Figure 7. Schéma de la machine de mesure de la charge à la rupture et de la rigidité statique de la coquille d'œuf (selon Coucke, 1998).

Figure 8 . Schéma et photo de la machine de mesure de la rigidité dynamique de la coquille d'œuf, 1. supporte d'œuf avec deux rouleaux, 2. marteau

provoquant l'impact, 3. microphone (selon Coucke, et al., 1999 ; De Ketelaere, et al., 2002).

Figure 9. Vues latérales et verticales des deux modèles de cages aménagées : (a) modèle de cage F15P et (b) modèle de cage F15M (Selon Guesdon, 2004).

Figure 10. Partie N-terminale demi-molécule d'ovotransferrine (N-lobe) présentant en surface des résidus d'acide aspartique (Selon Ibrahim, 2003)

Résumé en français

A partir de 2012, l'élevage des poules pondeuses en cages conventionnelles doit être remplacé par d'autres systèmes alternatifs qui risquent de favoriser la contamination bactérienne et le nombre d'œufs dégradés et, par conséquent le risque d'intoxications alimentaires. Nous avons évalué l'un de ces nouveaux systèmes de cages aménagées et avons étudié l'origine de variabilité des deux systèmes de défense naturelle de l'œuf la coquille et l'activité antibactérienne de protéines du blanc d'œuf.

Nous n'avons pas observé d'effet du type de cage sur les propriétés mécaniques des coquilles d'œuf. Par contre, la proportion d'œufs cassés, fêlés et sales ainsi que la contamination bactérienne de la coquille étaient généralement plus élevées dans les cages aménagées. Il faut donc, optimiser le design de ces cages et/ou renforcer les systèmes de défense naturelle.

Nous avons donc, étudié le rôle de la matrice organique de la coquille dans le contrôle de sa solidité sur un modèle de une mue induite sur des poules pondeuses âgées. Après la mue, les œufs étaient plus solides qu'auparavant. L'augmentation de la résistance mécanique est associée à une diminution de la taille des cristaux de calcite dans la coquille après la mue. La comparaison des constituants de la matrice organique des coquilles par SDS-PAGE ou Elisa révèle une augmentation de la proportion de protéines spécifiques de la coquille et une réduction de la teneur en ovotransferrine confirmée par ELISA. La solidité de la coquille semble corrélée négativement avec celle-ci et positivement avec certaines protéines spécifiques de la coquille (OC-116 et -17).

Sur le blanc d'œuf, nous avons étudié la possibilité de sélectionner des poules produisant des œufs exprimant une meilleure activité antibactérienne. Nous avons quantifié par ELISA le lysozyme et l'ovotransferrine du blanc d'œuf chez des poules d'une lignée pedigree commerciale et mesuré la variabilité de l'inhibition de la croissance bactérienne envers *S. enteritidis* et *St. aureus* dans le blanc. Des corrélations négatives ont été observées entre la croissance bactérienne et la teneur en protéines antimicrobiennes du blanc. Les héritabilités pour les concentrations en lysozyme, ovotransferrine et les inhibitions de croissance bactérienne dans le blanc d'œuf sont faible (<0,16).

Mots clés : qualité de coquille, cages aménagées, état physiologique, mue, matrice organique, SDS-PAGE, ELISA, protéines d'activité antibactérienne du blanc d'œuf, croissance bactérienne du blanc, héritabilité.

Résumé en anglais

Abstract: From 2012, rearing laying hens in conventional cages must be replaced by rearing in other alternative systems that may increase the eggshell contamination and that of degraded eggs, increasing, therefore, the risk of human toxi-infection due to eggs. We have evaluated two furnished cage models and have studied the variability of the two natural egg defences of the egg, the eggshell and that of the antibacterial activity of the egg white proteins.

No effect of cage model was observed on the eggshell mechanical properties. On the other hand, the proportion of broken, cracked and dirty eggs as well as the bacterial contamination of the shell was generally more elevated in the furnished cages compared with conventional cages. It is necessary therefore, to optimise the design of these cages and/or to improve the natural defence systems in eggs.

We induced an artificial moult in aged laying hens to study the role of the eggshell organic matrix proteins in the control of its crystallographic properties and mechanical properties. The increase in the eggshell solidity after moulting was associated with a reduction in the size of the eggshell calcite crystals. The comparison of the constituent of eggshell organic matrix by SD-PAGE showed a reduction of the content in egg white proteins including ovotransferrin for which it was confirmed by ELISA. Eggshell mechanical properties seem to be negatively correlated with these proteins and positively with some specific proteins of the shell (OC-116 and -17).

The feasibility of selecting hens producing eggs presenting high antibacterial activity was studied. We quantified by ELISA the lysozyme and ovotransferrin levels in albumen of eggs laid by pedigree hens. In addition, the inhibitions of the bacterial growth of *S. enteritidis* and *St aureus* were measured. Some negative interrelationships were observed between the bacterial growth and egg white proteins. Genetic heritability for lysozyme, ovotransferrin concentrations and for the inhibition of bacterial growth in egg white was low (<0.16).

Key words: eggshell quality, furnished cages, physiological status, moult, organic matrix, SDS-PAGE, ELISA, egg white proteins, antibacterial activity, bacterial growth of egg white, heritability.

Introduction générale

Introduction générale

Durant les 40 dernières années, la production mondiale d'œufs de poule a plus que doublé (268 %, 53,5 millions de tonnes). Pendant les dix dernières années seulement, elle a augmenté de 45 %, et elle croît régulièrement de 2 à 4 % par an (Gillin et Sakoff, 2003). Si la croissance se poursuit à ce rythme, on estime qu'aux environs de 2015, on dépassera le chiffre de 1 000 milliards d'œufs produits (Sources : FAO, ITAVI). En 2002, huit pays ont produit plus d'un million de tonnes d'œufs : la Chine (23,8 millions), les Etats-Unis (5,1 millions), le Japon (2,5 millions), la Russie (2,1 millions), le Mexique (1,9 millions), l'Inde (2 millions), le Brésil (1,6 millions) et finalement la France avec 1,01 millions de tonnes (Gillin et Sakoff, 2003). A l'échelle mondiale, l'Union Européenne arrive en troisième position, derrière l'Asie et l'Amérique du Nord (Sources ITAVI, Gonnier, 2003).

L'œuf de poule est un aliment de base pour une part importante de l'humanité. Il est caractérisé par la diversité de ses composants et sa haute valeur nutritionnelle. Il est ainsi composé de protéines, de lipides, de sels minéraux et de vitamines (Nys, 2001). De plus, contrairement aux autres produits d'origine animale tels que le lait ou la viande, les œufs sont les seuls nutriments qui peuvent être conservés à température ambiante durant une longue période, sans traitement préalable.

Ceci résulte en premier lieu de l'existence d'une protection mécanique naturelle constituée par la coquille de l'œuf. Cette enveloppe joue un double rôle, d'abord comme paroi d'échanges avec le milieu extérieur empêchant la pénétration de nombreuses bactéries, ensuite comme abri poreux sélectif permettant le développement de l'embryon en autorisant les échanges respiratoires.

Cette barrière mécanique est renforcée en second lieu par des constituants organiques qui présenteraient une action antimicrobienne. Récemment, Mine et ses collaborateurs (2003) ont démontré que les protéines de la matrice organique de la coquille inhibent la croissance de trois espèces de bactéries *Pseudomonas aureginosa*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*.

A cette barrière mécanique, s'ajoute le système de défense chimique du blanc d'œuf. En effet, certaines protéines du blanc d'œuf sont dotées d'activités bactéricides. Elles ralentissent ainsi la croissance bactérienne dans le blanc d'œuf (Nau et al., 2003).

Ces systèmes de protection mécaniques et antibactériens permettent de minimiser le risque de pénétration et à défaut de limiter la croissance bactérienne pendant quelques semaines dans l'œuf. Ils contribuent alors à limiter les risques de toxi-infection alimentaire pour l'homme, notamment dans le cas des Salmonelles pour lesquelles l'œuf semble être à l'origine de plus de 30 % des cas de toxi-infections alimentaires, qui peuvent être fatales chez les populations à risque. L'œuf étant consommé cru dans certaines préparations culinaires est par conséquent un aliment à risque. Il doit être irréprochable au niveau bactérien pour éviter toute intoxication alimentaire.

Le système d'élevage intensif en cages est remis en cause actuellement dans la Communauté Européenne pour des raisons de bien-être des poules. La Directive 1999/74/CE du 19 juillet 1999, concernant le « bien-être » des poules pondeuses, interdit à partir de 2012 les cages sous leur forme actuelle et stipule une production en volière ou dans des cages aménagées (avec nids et bains de poussière etc.....). Cependant, ces systèmes risquent d'augmenter la charge bactérienne des oeufs et, par conséquent, le risque de toxi-infection alimentaire (Mallet et al., 2003, Michel et al., 2003).

Deux stratégies se dessinent alors : La première est d'évaluer le design des nouveaux systèmes de production, la seconde est de renforcer les systèmes naturels de défense de l'œuf, c'est-à-dire la qualité de la coquille (solidité sans fêlures) et la défense antibactérienne du blanc d'œuf.

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse sont les suivants :

- Evaluer les conséquences du changement de système d'élevage des poules pondeuses sur la qualité des œufs. Divers paramètres de la qualité des œufs ont été comparés entre les systèmes d'élevage en cages conventionnelles et celui en cages aménagées. Par exemple, le nombre d'œufs cassés et fêlés, les caractéristiques mécaniques de la coquille, le pourcentage des œufs sales et la contamination bactérienne de la surface la coquille. Ceci