

CONSEQUENCES DE L'ALLONGEMENT DE LA DUREE DE PONTE DES POULES PONDEUSES SUR LA QUALITE DE LA MEMBRANE VITELLINE DE L'ŒUF

**Hervé Océane, Chessé Magali, Jimenez Justine, Bernardet Nelly, Mignon-Grasteau
Sandrine, Nys Yves, Réhault-Godbert Sophie, Moreau Thierry, Guyot Nicolas**

*INRAE, Université de Tours, UMR 0083 Biologie des Oiseaux et Aviculture (BOA), 37380
Nouzilly, France
oceane.herve@inrae.fr*

RÉSUMÉ

Afin d'améliorer la durabilité des élevages, les pratiques actuelles tendent vers un allongement de la période de ponte des poules pondeuses, ce qui pourrait avoir des conséquences négatives sur la qualité des œufs. L'objectif de cette étude est d'évaluer spécifiquement les effets de cet allongement sur la qualité de la membrane vitelline et son évolution au cours du stockage.

Pour cela, des œufs de poules à différentes périodes du cycle de ponte (pic de ponte, fin de cycle de ponte et fin de cycle de ponte allongé) ont été stockés jusqu'à 28 jours à 4°C ou 20°C (n≥20 par condition). Plusieurs paramètres de qualité ont été mesurés sur ces œufs : la masse du jaune, l'indice du jaune, la déformation et la force à la rupture de la membrane vitelline. En parallèle, des échantillons de membranes vitellines ont été prélevés pour en déterminer le profil protéique par SDS-PAGE.

Les résultats montrent que l'indice du jaune, la déformation et la force à la rupture de la membrane vitelline sont significativement détériorés par l'âge des poules et par les conditions de stockage des œufs, mais aucune interaction entre l'âge des animaux et le stockage n'est observée. L'analyse du profil protéique des membranes vitellines montre des modifications d'abondance de certaines protéines au cours du stockage, alors que les effets de l'âge sont difficilement perceptibles via une analyse SDS-PAGE. En conclusion, l'allongement de la carrière des pondeuses a un impact négatif sur les propriétés mécaniques de la membrane vitelline mais ne modifie pas significativement sa cinétique de dégradation au cours du stockage. L'analyse protéomique par spectrométrie de masse permettra d'identifier les protéines incriminées dans les altérations liées à l'âge des animaux et aux conditions de stockage.

ABSTRACT

CONSEQUENCES OF EXTENDING THE LAYING PERIOD OF LAYING HENS ON THE QUALITY OF EGG VITELLINE MEMBRANE

In order to improve farm sustainability, current practices are tending towards a lengthening of the laying period for laying hens, which might have negative consequences on egg vitelline membrane quality. The aim of this study is therefore to determine the effects of this extension on the quality of the vitelline membrane and its evolution during storage.

In this study, eggs from hens at different periods of the laying cycle (peak of lay, late laying period, very late laying period) were stored for up to 28 days at 4°C or 20°C (n≥20 per condition). Several quality parameters were measured on these eggs: yolk mass, yolk index, deformation and breaking strength of the vitelline membrane. In parallel, vitelline membrane samples were collected to determine protein profiles by SDS-PAGE.

The results show that the yolk index, the deformation and the breaking strength of the vitelline membrane are significantly deteriorated with hen age and egg storage, but no interaction between age and storage was observed. The protein profile analysis of vitelline membranes shows changes in the abundance of some proteins during egg storage, while hen age effects are not easily distinguishable using the SDS-PAGE approach. In conclusion, extending layer's career has a negative impact on the mechanical properties of the vitelline membrane, but does not significantly alter its degradation kinetics during storage. Proteomic analyses by mass spectrometry will allow the identification of proteins involved in the alterations associated to hen age and egg storage conditions.

INTRODUCTION

La membrane vitelline de l'œuf de poule, située à l'interface entre le jaune et le blanc, est une structure protéique complexe constituée de deux couches de fibres protéiques organisées en réseau (Bellairs et al., 1963). D'origine ovarienne, la couche interne est formée pendant le développement folliculaire. Suite à l'ovulation, la couche externe est ensuite sécrétée par la partie supérieure de l'oviducte. Dans l'œuf à couver, la membrane vitelline joue un rôle majeur dans divers processus biologiques comme la fécondation, l'embryogenèse et la défense antimicrobienne de l'œuf (Brégeon et al., 2022). Dans l'œuf de consommation, la membrane vitelline contribue à la qualité sanitaire de l'œuf ainsi qu'à la bonne séparation entre le jaune et le blanc après cassage. L'intégrité et le maintien de ses propriétés mécaniques constituent donc un enjeu sanitaire, technologique, et économique pour la filière des œufs et des ovoproduits. A l'instar du blanc d'œuf, la qualité de la membrane vitelline est dégradée sous l'effet de l'âge des poules (Kraus et al., 2021; Marzec et al., 2019; Ngoka et al., 1983) et du stockage des œufs (Caudill et al., 2010; Kirunda & McKee, 2000; Marzec et al., 2019; Woodward et al., 1987). L'altération de la membrane vitelline pendant le stockage serait liée à l'augmentation du pH du blanc ainsi qu'au passage d'eau du blanc vers le jaune (Fromm, 1966; Sharp & Powell, 1930).

Afin d'améliorer la durabilité des élevages de poules pondeuses, les pratiques actuelles tendent vers un allongement de la carrière des poules de 70-80 semaines actuellement à environ 100 semaines d'âge. Cet allongement de la période de production des pondeuses pourrait considérablement affecter la qualité des œufs, notamment la coquille mais aussi les structures internes telles que la membrane vitelline. Bien que l'effet de l'âge des poules sur la qualité de la membrane vitelline soit connu, l'impact de cycles de production aussi étendus reste largement inexploré à ce jour. Par ailleurs, il est possible que la membrane vitelline soit plus sensible aux altérations induites par le stockage en fin de cycle où la coquille est de mauvaise qualité. Des travaux récents montrent en effet que les défauts de coquille ont un impact important sur la qualité interne au cours du stockage (Wengerska et al., 2023). Cette dégradation des structures internes durant le stockage (liquéfaction du blanc, fragilisation de la membrane vitelline) est due à des modifications physicochimiques notamment liées à la diffusion de CO₂ et d'eau, de l'intérieur vers l'extérieur de l'œuf, à travers les pores de la coquille. Au cours du cycle de ponte, l'épaisseur de la coquille de l'œuf diminue (Banaszewska et al., 2019; Roberts et al., 2013). Par conséquent, une diminution de l'épaisseur de la coquille pourrait être en faveur d'une diffusion plus importante d'eau et de CO₂, et donc

d'une altération plus rapide de la qualité interne des œufs.

Dans le contexte d'allongement de la période de production des poules pondeuses, l'objectif de l'étude est donc de caractériser les effets combinés de l'âge des poules et des conditions de stockage sur la qualité de la membrane vitelline.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Production des œufs et stockage

Les œufs utilisés dans cette étude ont été produits par des poules pondeuses (Lohmann Tradition) élevées au sol au Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours (PEAT, INRAE Nouzilly), à différents âges : 32-34, 71-73 et 94-99 semaines (correspondant au pic de ponte, la fin de cycle actuel et la fin de cycle allongé). Le stockage des œufs a été réalisé pendant 7, 14 ou 28 jours dans des enceintes climatiques (type ICH260, Memmert, Schwabach, Allemagne) à 4°C (75-85% d'humidité relative) ou à 20°C (50% d'humidité relative).

1.2. Mesures de qualité des œufs

Les mesures de qualité ont été réalisées sur des œufs frais du jour (n=40 par âge) ou stockés (n=20 pour chaque condition d'âge, de temps et de température de stockage). Plusieurs paramètres ont été mesurés sur le jaune : masse, indice (rapport hauteur/diamètre du jaune), déformation et force à la rupture de la membrane vitelline. L'indice du jaune a été mesuré à l'aide d'un testeur numérique d'œufs (Digital Egg Tester, DET6000, Nabel, Japon). La déformation et la force à la rupture de la membrane vitelline ont été mesurées sur des jaunes séparés du blanc et placés sur une surface plane (dans une barquette en plastique), à l'aide d'une machine d'essai universelle (Modèle 5543, Instron, Elancourt, France) équipée d'un capteur de force de 50N et d'une sonde circulaire plane d'un diamètre de 6 cm (vitesse de déplacement : 10 mm/min), selon un protocole adapté de Woodward et al., 1987.

1.3. Prélèvement des membranes vitellines

Des œufs frais (n=48 par âge) et stockés (n=24 pour chaque condition d'âge, de temps et de température de stockage) ont été cassés afin de prélever les membranes vitellines individuellement. Pour cela les jaunes d'œufs isolés ont été plongés dans de l'eau déminéralisée préalablement réfrigérée à 4°C. La membrane vitelline, enveloppant le jaune, a été prélevée à l'aide de deux pinces puis rincée dans deux bains successifs d'eau déminéralisée. Chaque prélèvement a été déposé dans un microtube de 1,5 mL, congelé puis lyophilisé.

1.4. Solubilisation et analyse SDS-PAGE des protéines

Chaque membrane vitelline lyophilisée a été entièrement solubilisée dans 1 mL de tampon de

solubilisation (63 mM Tris-HCl pH 6,8 / 2% (m/v) SDS / 2,5% (v/v) β -mercaptoéthanol) pendant 10 min sous forte agitation puis pendant 24 h sous légère agitation et à température ambiante. Les extraits protéiques, préalablement dosés à l'aide du kit « Pierce Detergent Compatible Bradford Assay Reagent » (Biorad), ont été déposés sur des gels SDS-PAGE gradient 4-20% (15 μ g par puits). La migration a été réalisée pendant 40 min à 220V et les gels ont été colorés au bleu de Coomassie.

1.5. Traitements statistiques

Les effets de l'âge, de la durée et de la température de stockage ainsi que leurs interactions sur la qualité des œufs ont été estimés par analyse de variance avec la procédure GLM de SAS. Les moyennes des moindres carrés (LSMEANS) ont ensuite été estimées pour chaque niveau de traitement. La correction de Siegel-Tukey a été utilisée pour prendre en compte les comparaisons multiples.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Dans le but d'évaluer l'effet de l'allongement de la période de ponte des poules pondeuses sur la qualité de la membrane vitelline, ainsi que son évolution au cours du stockage, nos travaux se sont déroulés en deux temps. La première partie de ce travail a consisté à réaliser des mesures de qualité du jaune et de la membrane vitelline sur des œufs produits à différentes périodes du cycle de ponte (pic de ponte, fin de cycle actuel et fin de cycle allongé), et stockés dans différentes conditions de temps (0, 7, 14 et 28 jours) et de température (4°C ou 20°C). La deuxième partie a porté sur l'étude des profils protéiques des membranes vitellines en fonction des conditions d'âge et de stockage précédemment étudiées, afin de visualiser d'éventuelles modifications de la membrane vitelline à l'échelle moléculaire.

L'analyse des données de qualité (Tableau 1) montre que l'âge des poules ainsi que la durée de stockage ont un impact négatif significatif sur les quatre paramètres de qualité mesurés, à savoir la masse et l'indice du jaune, la déformation et la force à la rupture de la membrane vitelline. La température de stockage a également un effet significatif sur ces mêmes paramètres, sauf sur la masse du jaune qui n'est pas significativement modifiée entre un stockage à 4°C et un stockage à 20°C. De façon très intéressante, l'âge des poules n'interagit ni avec la température, ni avec la durée de stockage des œufs sur les paramètres de qualité étudiés. Cette absence d'interaction suggère donc que les effets du stockage sur les indicateurs de qualité du jaune et de la membrane vitelline suivent globalement une même cinétique, quel que soit l'âge de la poule. Ainsi, contrairement à l'hypothèse de départ, la diminution d'épaisseur de la coquille au cours du cycle de ponte ne semble pas accélérer la vitesse de dégradation de la

membrane vitelline pendant le stockage. Cependant, nos résultats diffèrent de ceux d'une étude précédente montrant, au contraire, une interaction significative entre l'âge des poules et le temps de stockage pour la masse et l'indice du jaune, ainsi que la déformation de la membrane vitelline (Marzec et al., 2019). Toutefois, il est important de noter que les conditions d'âge (25-26, 45-46, 55-56, 69-70 semaines) et de stockage (0, 3, 6, 9 jours à 30°C) ne sont pas les mêmes que celles utilisées dans notre étude. Plusieurs publications montrent que le vieillissement des poules est associé à une augmentation de la masse du jaune (Chung & Lee, 2014; Rossi & Pompei, 1995; Silversides et al., 2006) et à une altération des propriétés physiques de la membrane vitelline (estimée par des paramètres tels que l'indice du jaune, la déformation et/ou la force à la rupture) (Kraus et al., 2021; Marzec et al., 2019; Ngoka et al., 1983). Cependant, les données disponibles pour de longs cycles de production sont limitées.

Etant donné l'absence d'interaction entre l'âge des poules et les conditions de stockage des œufs dans nos conditions, nous avons examiné l'effet principal de l'âge des poules sur les paramètres de qualité du jaune et de la membrane vitelline (Figure 1). Nos résultats montrent une différence significative de la masse (augmentation) et de l'indice du jaune (diminution) entre 32-34 et 71-73 semaines d'âge, puis ces deux paramètres restent stables jusqu'à 94-99 semaines (Figures 1A et 1B). Les valeurs de déformation et de force à la rupture de la membrane vitelline, en revanche, ne sont pas significativement différentes entre 32-34 et 71-73 semaines, mais elles diminuent de façon significative à 94-99 semaines (Figures 1C et 1D). La diminution de l'indice du jaune semble être essentiellement liée à l'augmentation de la masse du jaune, alors qu'une baisse de la résistance à la rupture de la membrane vitelline survient plus tardivement, sans que celle-ci soit liée à une diminution significative de l'indice du jaune. Cette fragilisation de la membrane observée entre 71-73 et 94-99 semaines peut avoir des conséquences importantes, notamment pour la séparation du blanc et du jaune dans l'industrie des ovoproduits.

Les figures 2A et 2B montrent respectivement les profils protéiques des membranes vitellines en fonction de l'âge (Figure 2A) et des conditions de stockage (Figure 2B). Ces profils protéiques de membranes vitellines sont très similaires aux trois périodes du cycle de ponte étudiées (Figure 2A). Cela suggère que les altérations liées à l'âge des animaux ne font pas intervenir des protéines majeures de la membrane vitelline. En revanche, des différences d'abondance sont nettement plus visibles au cours du stockage (Figure 2B), ce qui est cohérent si l'on compare l'amplitude des effets liés à l'âge et au stockage sur les paramètres de qualité. Plusieurs bandes semblent présenter des modifications

d'intensité en fonction du temps et de la température de stockage. Parmi celles-ci, une bande majeure à environ 17 kDa (notée par un astérisque sur la Figure 2B), correspondant vraisemblablement à la protéine VMO1 (Vitelline Membrane Outer layer protein 1), diminue d'intensité après 28 jours de stockage à 20°C. Ces résultats sont cohérents avec une étude précédente qui a montré que l'abondance de cette protéine diminue après 10 jours de stockage à 30°C (Zhou et al., 2020). Une diminution de la quantité de VMO1 a également été observée lors d'un stockage à 20°C (Schäfer et al., 1998). La Figure 2B montre également l'apparition d'une bande de faible intensité (indiquée par une flèche) à une masse légèrement supérieure à 25 kDa, qui pourrait correspondre à la formation d'un dimère de lysozyme (Back, 1984; Schäfer et al., 1998). Les profils protéiques que nous avons obtenus par SDS-PAGE illustrent donc bien les résultats présents dans la littérature. Une étude du protéome de membranes vitellines d'œufs stockés pendant 10 jours à 4°C, 20°C ou 30°C a montré que l'abondance de 203 protéines est impactée par le stockage. Parmi ces protéines, la majorité (61%) sont de moins en moins présentes au cours du stockage (Zhou et al., 2020). Une analyse protéomique par spectrométrie de masse sera également conduite sur nos échantillons afin d'identifier les protéines dont l'abondance varie en fonction de l'âge et des conditions de stockage.

CONCLUSION

En conclusion, nos résultats montrent que les propriétés physiques de la membrane vitelline sont altérées au cours du cycle de ponte. La déformation et la force à la rupture sont notamment altérées en fin de cycle de ponte chez les poules de 94-99 semaines. L'allongement du cycle de ponte peut donc avoir des conséquences importantes pour la filière œuf et l'industrie des ovoproduits. Ces premiers résultats seront prochainement complétés par une approche protéomique afin de déterminer plus précisément l'impact de l'âge des poules et des conditions de stockage sur le protéome de la membrane vitelline. Cette approche permettra d'identifier les protéines potentiellement impliquées dans les altérations mécaniques de la membrane vitelline. Les modifications d'abondance des protéines impliquées dans la protection antimicrobienne seront également regardées avec attention au regard des enjeux liés à la qualité sanitaire des œufs.

REMERCIEMENTS

Ces expérimentations ont été réalisées dans le cadre du contrat ANR EQLIPSE (Enhancing the Quality and the Level of Internal Protections of Shell Eggs, ANR-19-CE21-0006). Les auteurs remercient l'ANR, le CNPO et le SNIPO pour leur soutien financier, Christophe Souchet et Marie Bourin (ITAVI) ainsi que Emmanuel Ledru et Jérémy Bernard (PEAT, INRAE, Nouzilly, DOI : 10.15454/1.5572326250887292E12) pour l'élevage des poules pondeuses, le suivi des performances et la fourniture des œufs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Back, J. F., 1984. *Biochim et Biophys Acta Gen Subj*, 799(3), 319–321.
- Banaszewska, D., Biesiada-Drzazga, B., Ostrowski, D., Drabik, K., & Batkowska, J., 2019. *Turkish J. Vet. Anim. Sci*, 43(5), 583–589.
- Bellairs, R., Harkness, M., & Harkness, R. D., 1963. *J. of Ultrast. Res.*, 8(3–4), 339–359.
- Brégeon, M., Tomas, D., Bernay, B., Zatylny-Gaudin, C., Georgeault, S., Labas, V., Réhault-Godbert, S., & Guyot, N., 2022. *J. Proteomics*, 258, 104489.
- Caudill, A. B., Curtis, P. A., Anderson, K. E., Kerth, L. K., Oyarazabal, O., Jones, D. R., & Musgrove, M. T., 2010. *Poult. Sci.*, 89(1), 160–168.
- Chung, S., & Lee, K. W., 2014. *Int. J. Poult. Sci.*, 13, 634–636.
- Fromm, D., 1966. *Poult. Sci.*, 45(2), 374–379.
- Kirunda, D. F. K., & McKee, S. R., 2000. *Poult. Sci.*, 79(8), 1189–1193.
- Kraus, A., Zita, L., Kront, O., Härtlová, H., & Chmelíková, E., 2021. *Poult. Sci.*, 100(2), 1142–1153.
- Marzec, A., Damaziak, K., Kowalska, H., Riedel, J., Michalczyk, M., Koczywas, E., Cisneros, F., Lenart, A., & Niemiec, J., 2019. *J. Appl. Poult. Res.*, 28(2), 290–300.
- Ngoka, D. A., Froning, G. W., & Babji, A. S., 1983. *Poult. Sci.*, 62(4), 718–720.
- Roberts, J. R., Chousalkar, K., & Samiullah, 2013. *Anim. Prod. Sci.*, 53(12), 1291–1297.
- Rossi, M., & Pompei, C., 1995. *Poult. Sci.*, 74(1), 152–160.
- Schäfer, A., Drewes, W., & Schwägele, F., 1998. *Zeitschrift Für angewandte Chemie*, 206(5), 329–332.
- Sharp, P. F., & Powell, C. K., 1930. *Ind. Eng. Chem.*, 22(8), 908–910.
- Silversides, F. G., Korver, D. R., & Budgell, K. L., 2006. *Poult. Sci.*, 85(7), 1136–1144.
- Wengerska, K., Batkowska, J., & Drabik, K., 2023. *Poult. Sci.*, 102(7), 102749.
- Woodward, S. A., Fluck, R. C., Ouart, M. D., & Janky, D. M., 1987. *Poult. Sci.*, 66(8), 1414–1416.
- Zhou, Y., Qiu, N., Mine, Y., Meng, Y., Keast, R., & Zhu, C., 2020. *J. Agric. Food Chem.*, 68(36), 9816–9825.

Tableau 1. Significativité (valeurs de p) des effets étudiés (âge des poules, température et durée de stockage) sur différents paramètres de qualité du jaune d'œuf et de la membrane vitelline.

	Indice du jaune	Déformation de la membrane vitelline	Force à la rupture de la membrane vitelline	Poids du jaune
Age de la poule	<0,0001 ↓	0,0018 ↓	0,0195 ↓	<0,0001 ↑
Durée de stockage	<0,0001 ↓	<0,0001 ↓	<0,0001 ↓	<0,0001 ↑
Température de stockage	<0,0001 ↓	<0,0001 ↓	<0,0001 ↓	0,1392
Age de la poule x durée de stockage	0,9662	0,2443	0,2267	0,8954
Age de la poule x température de stockage	0,6131	0,2250	0,4587	0,5698

En gras : les valeurs de $p < 0,05$.

↓ / ↑ : tendance à la baisse / hausse des paramètres de qualité en fonction des effets

Figure 1. Paramètres de qualité du jaune d'œuf en fonction de l'âge des poules pondeuses : masse du jaune (A), indice du jaune (B), déformation de la membrane vitelline (C), force à la rupture de la membrane vitelline (D).

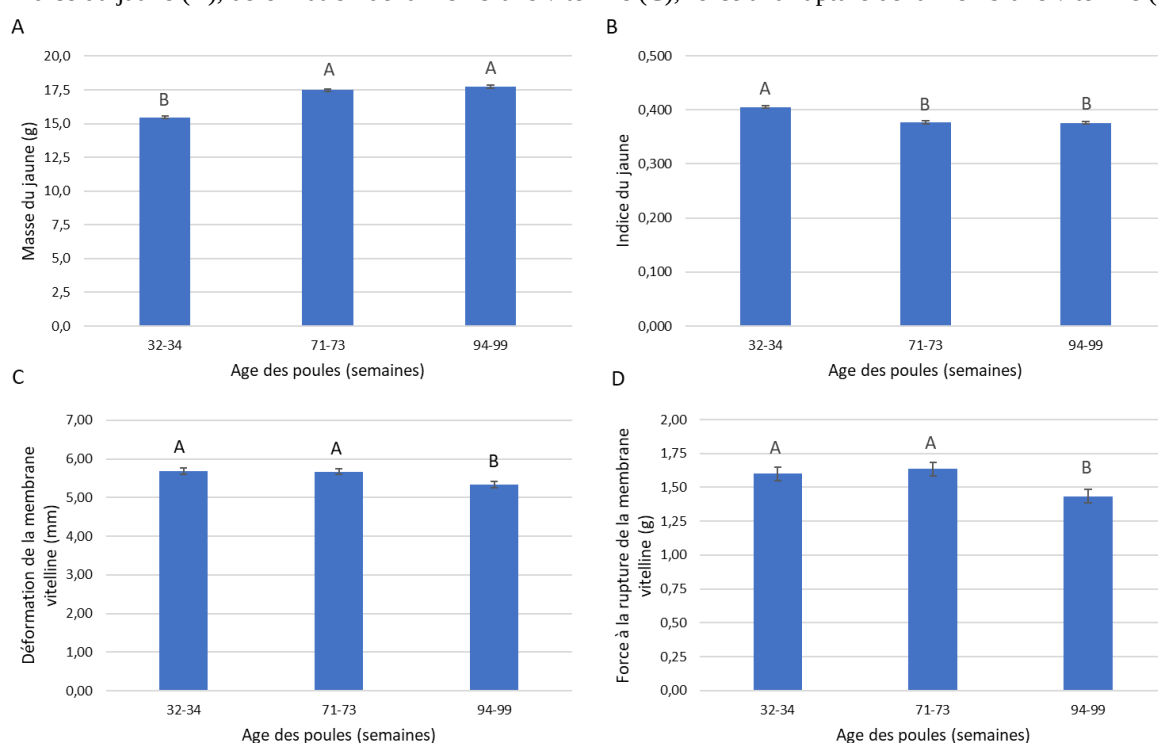


Figure 2. Effet de l'âge des poules pondeuses (A, œufs frais) et des conditions de stockage des œufs (B, œufs produits à 71-73 semaines d'âge) sur le profil protéique SDS-PAGE des membranes vitellines.

