

SESSION
HYGIENE ET QUALITE
DES PRODUITS

SESSION
HYGIENE ET QUALITE
DES PRODUITS

Communications orales

LA VIANDE DE DINDES REPRODUCTRICES EST-ELLE SI DIFFERENTE DE CELLE DE DINDES STANDARDS ?

Chartrin Pascal¹, Bordeau Thierry¹, Godet Estelle¹, Méteau Karine², Gicquel Jean-Christian³, Drosnet Estelle³, Brière Sylvain⁴, Bourin Marie⁵, Baéza Elisabeth^{1*}

¹ BOA, INRA, Université de Tours, 37380 NOUZILLY, France

² EASM, INRA, Le Magneraud, Saint-Pierre d'Amilly, BP 52, 17700 SURGÈRES, France

³ STVO, ZI les Riantières, BP 22, 44540, SAINT-MARS LA JAILLE, France

⁴ HENDRIX GENETICS TURKEYS FRANCE, La Bohardière, BP 1, St Laurent de la Plaine, 49290 MAUGES SUR LOIRE, France

⁵ ITAVI, BOA, INRA, Université de Tours, 37380 NOUZILLY, France

*elisabeth.baeza-campone@inra.fr

RÉSUMÉ

La qualité technologique, nutritionnelle et sensorielle des filets de dindes et dindons reproducteurs a été caractérisée par comparaison avec des filets de dindes et dindons standards de souche Grademaker (Hybrid Turkeys) avec un effectif de 20 animaux par sexe et par stade physiologique. Les animaux reproducteurs ont été abattus aux âges de 397 et 410 jours et aux poids de 10,42 et 32,67 kg pour les femelles et les mâles, respectivement. Les animaux en croissance (dindes de type standard) ont été abattus aux âges de 75 et 103 jours et aux poids de 5,89 et 13,48 kg pour les femelles et les mâles, respectivement. Les différences observées entre mâles et femelles d'une part et entre animaux standards et reproducteurs d'autre part sont essentiellement dues aux différences d'âges à l'abattage et au dimorphisme sexuel sur le poids vif. La viande de dindes reproductrices présente des caractéristiques très proches de celles des dindes et dindons standards alors que la viande des dindons reproducteurs se distingue nettement en présentant, en particulier, une texture plus ferme et un pouvoir de rétention en eau moins élevé.

ABSTRACT

Is meat of turkey breeders so different from that of standard turkeys?

The technological, nutritional and sensorial quality of breast meat from turkey male and female breeders was characterized by comparison with breast meat from growing male and female turkeys of Grademaker line (Hybrid Turkeys) and analyzing 20 birds per sex and per physiological stage. The turkey breeders were slaughtered at 397 and 410 days of age and 10.42 and 32.67 kg of body weight for the females and males, respectively. The growing turkeys (standard birds) were slaughtered at 75 and 103 days of age and 5.89 and 13.48 kg of body weight for the females and males, respectively. The differences observed between males and females on one hand and between standard and breeder turkeys on the other hand were mainly induced by differences in slaughter ages and sexual dimorphism on body weight. The meat of female breeders had characteristics close to those of female and male standard turkeys whereas the meat of male breeders was clearly distinguishable particularly by displaying lower tenderness and water holding capacity.

INTRODUCTION

En 2015, la production de viande de dindes en France représentait 350 000 tonnes équivalent carcasses (FranceAgriMer, 2016). La consommation de viande de dindes était de 4,6 kg par an et par habitant en 2015 (ITAVI, 2016). La production provient essentiellement de dindes standards. Les mâles sont abattus à l'âge de 16 semaines et à un poids vif de 14-15 kg et les femelles à l'âge de 12 semaines et à un poids vif de 6-7 kg. La très grande majorité de la production de dindes est destinée à la découpe, mais il subsiste une production de dindes légères destinées à la vente en carcasses entières et dont les ventes sont concentrées autour des fêtes de fin d'année. Enfin, lorsque la période de reproduction des dindes et dindons arrive à son terme, les animaux sont abattus en conditions industrielles et leur viande est également valorisée essentiellement en produits transformés. La production française de dindes reproductrices peut être estimée à 8 797 et 9 174 tec respectivement pour 2015 et 2016 (Gicquel, données non publiées). Au niveau de l'UE à 28, la production européenne peut être estimée à 36 224 et 37 776 tec respectivement pour 2015 et 2016 (Gicquel, données non publiées). Il existe de nombreuses études qui portent sur la qualité de la viande de dindes standards. Par contre, à notre connaissance, aucune étude n'a été publiée sur les caractéristiques de la viande de dindes reproductrices mâles et femelles. Cette étude avait donc pour objectif d'évaluer la qualité technologique, nutritionnelle et sensorielle de la viande de dindes reproductrices en comparaison avec celle de dindes standards.

1. MATERIELS ET METHODES

Afin de réaliser cette caractérisation, des carcasses de dindes mâles et femelles reproductrices de souche Grademaker (Hybrid Turkeys) ont été comparées avec des carcasses de dindes mâles et femelles standards de la même souche avec un effectif de 20 animaux par sexe et par stade physiologique. Les animaux ont été fournis par la société Hendrix Genetics Turkeys (Saint-Laurent de la Plaine, France). Ils ont été abattus sur un site industriel (= J0). Les carcasses ont été découpées par la société STVO (Saint-Mars la Jaille, France) 24 h après l'abattage (= J1) afin de déterminer **les rendements en découpe**. A partir de chaque filet gauche, 4 escalopes de 200 g et 2 cm d'épaisseur ont été découpées et emballées individuellement dans un sac mis sous vide et identifiées. Ces échantillons ont été stockés à -20°C pour réaliser ultérieurement l'analyse sensorielle.

A J2, les filets droits ont été utilisés pour effectuer différentes mesures et prélever plusieurs échantillons. **Le pH ultime** (pHu) a été déterminé avec un pHmètre portable (model WTW pH 330i, Fisher Bioblock Scientific, Rungis, France) par insertion directe d'une

électrode en verre dans le muscle *Pectoralis major* (PM) (Honikel, 1998). **La couleur** a été mesurée avec un spectrophotomètre portable Hunterlab (Reston, VA) selon Honikel (1998) dans le système trichromatique CIELAB.

Les pertes en jus lors d'un stockage au froid ont été mesurées sur une escalope de 150 g environ mise en suspension dans un sachet zippé à +4°C pendant 6 jours (Honikel, 1998).

Les pertes en jus à la cuisson ont été mesurées à J3 sur une escalope épaisse pesant 150 à 200 g et emballée dans un sachet sous vide (Honikel, 1998). Les escalopes ont été cuites au bain-marie pendant 16 minutes à 85°C. Elles ont ensuite été refroidies pendant 15 minutes dans de la glace pilée. Après déconditionnement, elles ont été essuyées puis pesées afin de déterminer les pertes à la cuisson.

La mesure de **la texture** a été réalisée juste après l'évaluation des pertes à la cuisson. Elle sert à évaluer la tendreté de la viande. La résistance à une force de compression-cisaillement a été déterminée avec une cellule de Warner-Bratzler selon Honikel (1998).

Le rendement technologique après saumurage-cuisson a été déterminé à J4 sur une escalope de 100 g environ tel que décrit par Debut *et al.* (2003).

La teneur en fer héminique a été mesurée selon la technique de Hornsey (1956) sur des échantillons stockés à 20°C. **La teneur en protéines** a été déterminée par la méthode Kjeldhal. **La teneur en eau** a été quantifiée par pesée différentielle de 5 g d'échantillon placés en étuve à 105°C pendant 24 h.

La teneur en lipides a été mesurée avec la méthode de Folch *et al.* (1957). Puis les lipides ont été méthylés (Morrison et Smith, 1964) et **la composition en acides gras** (AG) a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse et exprimée en % des AG totaux. **Les classes de lipides** ont été déterminées par chromatographie en couche mince (TLC-FID) en utilisant un Iatroscan (Iatron, Tokyo, Japon) comme décrit par Christie et Hunter (1979). **La peroxydation des lipides** a été évaluée par la méthode de Lynch et Frei (1993) permettant d'obtenir l'indice TBARS.

Les séances d'**analyse sensorielle** ont été réalisées au laboratoire INRA du Magneraud (Surgères, France) dans des conditions conformes à la norme AFNOR NF V 09 105 « Analyse sensorielle – Directives générales pour l'implantation de locaux destinés à l'analyse sensorielle ». Les escalopes ont été décongelées avant cuisson pendant 24 h à +4°C puis placées entre 2 feuilles de papier aluminium et cuites au grill (5 min à 250°C afin d'atteindre à cœur une température de 80°C). Les 4 traitements ont été dégustés à chaque séance par 12 jurés. Pour chaque critère, la notation s'effectuait sur une échelle continue bornée de 0 à 10. Les critères de jugement pour la dégustation des filets étaient : la couleur, la tendreté, la jutosité, les caractères fibreux et collant, les flaveur globale, acide et rance et l'appréciation globale.

Les résultats ont été traités en utilisant le logiciel Stview par analyse de variance à deux facteurs : les

effets des facteurs « sexe » et « stade physiologique » ainsi que leur interaction ont été analysés en comparant les moyennes avec un test de « t » et un seuil de signification à $P < 0,05$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Rendements en découpe

Les animaux reproducteurs abattus à des âges beaucoup plus élevés que les animaux standards présentent des poids et des rendements « Prêts à cuire » (PAC) et filets supérieurs (Tableau 1). Pour le rendement en cuisses-pilons c'est l'inverse qui est observé en particulier pour les femelles. Les différences les plus importantes observées concernent les dindons comparés aux dindes et ce quel que soit le type de production (standard ou reproduction). En effet, le poids vif moyen des dindons reproducteurs est 3,1 fois supérieur à celui des femelles reproductrices et celui des dindons standards est 2,3 fois supérieur à celui des dindes standards. Ces différences se répercutent sur le poids PAC, le poids des filets et des cuisses-pilons. Le rendement PAC des dindons reproducteurs est supérieur à celui des dindes reproductrices pour lesquelles la grappe ovarienne enlevée lors de l'éviscération représente un poids non négligeable (environ 270 g). Le rendement PAC des dindons standards est également supérieur à celui des dindes standards. Pour les animaux reproducteurs, le rendement en filets et en cuisses-pilons des dindons est supérieur à celui des dindes. Il en est de même pour les animaux standards.

2.2. Qualité technologique de la viande

Les pHu mesurés dans les filets de dindes et ce quel que soit le sexe ou le type de production sont proches de 5,70 (Tableau 2). Les dindes standards ont un pHu du filet supérieur à celui des dindons standards. Les dindons standards ont des filets plus foncés que ceux des autres groupes. Les animaux standards ont également des filets moins rouges que les animaux reproducteurs et les femelles ont des filets moins rouges que les mâles. Kokoszynski *et al.* (2016) ont aussi montré que le filet était plus rouge chez les poules et coqs reproducteurs abattus à l'âge de 64 semaines comparés à des poulets mâles et femelles abattus à l'âge de 6 semaines. Il en est de même chez des canards reproducteurs âgés de 500 jours comparés à des canards en croissance abattus à l'âge de 38 jours (Qiao *et al.*, 2017). Les filets des dindons reproducteurs présentent une résistance au cisaillement supérieure à celle des filets des autres groupes. Globalement, l'exsudat du filet après conservation à +4°C est faible. Il est supérieur chez les mâles par comparaison avec les femelles. La différence est surtout importante pour les animaux reproducteurs (x 1,7). Les pertes en jus après cuisson des filets des animaux mâles sont supérieures à celles des femelles. Celles des filets des animaux reproducteurs en particulier des mâles sont

supérieures à celles des filets des animaux standards. Les filets des mâles présentent des rendements technologiques inférieurs à celui des femelles. Les filets des animaux reproducteurs en particulier les mâles présentent des rendements technologiques inférieurs à ceux des animaux standards. En effet, ce sont les dindes reproductrices qui présentent le meilleur rendement technologique. Ceci corrobore les observations sur les paramètres précédents concernant le pouvoir de rétention en eau du filet. La corrélation entre les pertes en jus après stockage à +4°C et après cuisson est de 0,46 ($P < 0,05$). Celle entre les pertes en jus après stockage à +4°C et le rendement technologique est de 0,63 ($P < 0,05$) et celle entre les pertes en jus après cuisson et le rendement technologique est de 0,67 ($P < 0,05$). L'indice TBARS est plus élevé chez les animaux reproducteurs comparés aux animaux standards. Le sexe n'a pas d'effet sur la peroxydation des lipides dans le filet.

2.3. Qualité nutritionnelle de la viande

Les animaux reproducteurs ont une teneur en lipides supérieure aux animaux standards ce qui pourrait expliquer en partie la sensibilité supérieure à l'oxydation. Les dindons reproducteurs ont une teneur en protéines inférieure à celle mesurée pour les autres groupes ce qui pourrait expliquer en partie le pouvoir de rétention en eau moindre. La teneur en fer et donc en pigments héminiques n'est pas influencée par le stade physiologique. Par contre, les mâles, abattus à des âges plus tardifs ont des teneurs supérieures à celles des femelles. Le sexe n'a pas d'effet sur les teneurs en triglycérides, cholestérol et phospholipides du filet (Tableau 2). Le stade physiologique n'a pas d'effet sur la teneur en cholestérol. Par contre, les animaux reproducteurs présentant une teneur en lipides supérieure à celle des animaux standards ont également des teneurs en triglycérides (lipides de dépôt) et phospholipides plus importantes. Le filet présente une teneur élevée en AG n-6 et un rapport AG n-6/AG n-3 de 10-12 (Tableau 2). Le sexe a peu d'effet sur la composition en AG. Le filet des dindes reproductrices présente une teneur en AGS supérieure à celle des dindons reproducteurs. La teneur en lipides plus élevée dans le filet des animaux reproducteurs se traduit par un enrichissement en AGMI qui sont néo-synthétisés par l'animal au détriment des proportions en AGS et surtout AGPI.

2.4. Qualité sensorielle de la viande

Lors des séances de dégustation, les filets des animaux reproducteurs ont été jugés moins tendres, moins juteux, plus fibreux et moins collants que ceux provenant des animaux standards (Tableau 2). Ils ont également une saveur moins acide et ils sont moins appréciés en particulier ceux des dindons reproducteurs. Il n'y a pas eu d'effet du type d'animal sur la couleur des filets cuits et sur les saveurs globale et rance dont les notes sont très faibles. La conservation à -20°C des filets sous vide pendant 5 à 7

mois n'a pas entraîné de phénomènes d'oxydation ce qui est corroboré par les mesures d'oxydation des lipides. Les filets des mâles, en particulier ceux des reproducteurs sont moins tendres. Ils sont plus fibreux et moins collants. Ceci est probablement lié à la taille des fibres musculaires dont l'aire de section transversale est visuellement beaucoup plus importante chez les dindons reproducteurs. Les filets et les cuisses de canards reproducteurs sont jugés aussi plus fermes que ceux des canards en croissance (Qiao *et al.*, 2017). Les filets des dindons reproducteurs ont les notes de flaveur globale et d'appréciation les plus faibles.

différences d'âges à l'abattage et au dimorphisme sexuel sur le poids vif. La viande de dindes reproductrices présente des caractéristiques très proches de celle des dindes standards alors que la viande des dindons reproducteurs se distingue nettement en présentant, en particulier, une texture plus ferme et un pouvoir de rétention en eau moins élevé. Pour cette dernière, les procédés de transformation et/ou de cuisson doivent clairement être adaptés en suggérant par exemple une utilisation en viande hachée pour réaliser des paupiettes, ou en morceaux découpés pour faire des sautés avec une cuisson longue.

CONCLUSION

Les différences observées entre mâles et femelles d'une part, et entre animaux standards et reproducteurs d'autre part, sont essentiellement dues aux

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Christie W.W., Hunter M.L., 1979. *J. Chromat.*, 171, 517-518.
 Debut M., Berri C., Baéza E., Sellier N., Arnould C., Guémené D., Jehl N., Boutten B., Jégo Y., Beaumont C., Le Bihan-Duval E., 2003. *Poult. Sci.*, 82, 1829-1838.
 FranceAgriMer, 2016. Données et bilans : les filières animales terrestres et aquatiques. Bilan 2015 et perspectives 2016, 137 pages.
 Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H., 1957. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
 Honikel K.O., 1998. *Meat Sci.*, 49, 447-457.
 Hornsey H.C., 1956. *J. Sci. Food Agric.*, 7, 534-540.
 ITAVI, 2016. Situation de la production et des marchés des volailles de chair. Bilan 2015, 10 pages.
 Kokoszynski D., Bernacki Z., Steczny K., Saleh M., Wasilewski P.D., Kotowicz M., Wasilewski R., Biegniewska M., Grzonkowska K., 2016. *European Poult. Sci.*, 80, 11 p.
 Lynch S.M., Frei B., 1993. *J. Lipid Res.*, 34, 1745-1753.
 Morrisson W.R., Smith M.L., 1964. *J. Lipid Res.*, 5, 600-608.
 Qiao Y., Huang J., Chen Y., Chen H., Zhao L., Huang M., Zhou G., 2017. *Anim. Sci. J.*, 88, 156-165.

Tableau 1. Rendements en découpe de dindes et dindons standards ou reproducteurs (n = 20)

	Femelles reproductrices	Mâles reproducteurs	Femelles standards	Mâles standards	Effet type d'animal	Effet sexe	Effet interaction
Age à l'abattage (jours)	397	410	75	103			
Poids vif à l'abattage (kg)	10,42 ± 0,75 c	32,67 ± 1,51 a	5,89 ± 0,35 d	13,48 ± 0,56 b	0,001	0,001	0,001
Poids PAC (kg)	7,46 ± 0,56 c	25,08 ± 1,33 a	4,15 ± 0,31 d	9,74 ± 0,42 b	0,001	0,001	0,001
Poids filets (kg)	2,64 ± 0,23 c	9,20 ± 0,99 a	1,22 ± 0,13 d	2,97 ± 0,19 b	0,001	0,001	0,001
Poids cuisses-pilons (kg)	2,22 ± 0,18 c	7,83 ± 0,78 a	1,43 ± 0,10 d	3,40 ± 0,19 b	0,001	0,001	0,001
Rendement PAC (%)	71,62 ± 1,09 c	76,75 ± 1,58 a	70,36 ± 1,59 d	72,25 ± 1,36 b	0,001	0,001	0,001
Rendement filets (%)	25,31 ± 1,16 b	28,15 ± 2,51 a	20,69 ± 1,27 d	22,01 ± 1,02 c	0,001	0,001	0,001
Rendement cuisses-pilons (%)	21,26 ± 0,70 b	23,98 ± 2,26 a	24,32 ± 0,73 a	25,19 ± 0,91 a	0,001	0,001	0,002

Les rendements sont exprimés en % du poids vif à l'abattage. Les filets comprennent les 2 muscles pectoraux (*P. major* et *P. minor*) sans la peau. Les cuisses-pilons comprennent les os et la peau. PAC = Prêts à cuire
 a, b, c, d : moyennes significativement différentes à P < 0,05 pour un paramètre donné.

Tableau 2. Qualité technologique (n = 20), nutritionnelle (n = 10) et sensorielle (n = 10) des filets de dindes et dindons en croissance ou reproducteurs

	Femelles reproductrices	Mâles reproducteurs	Femelles standards	Mâles standards	Effet type d'animal	Effet sexe	Effet interaction
pHu	5,68 ± 0,08 b	5,70 ± 0,13 ab	5,77 ± 0,07 a	5,68 ± 0,05 b	0,09	0,04	0,005
L*	49,14 ± 3,01 a	51,00 ± 3,24 a	49,30 ± 2,07 a	46,00 ± 2,21 b	0,001	0,23	0,001
a*	-0,38 ± 0,90	0,48 ± 1,02	-0,75 ± 0,73	-0,62 ± 0,86	0,001	0,01	0,07
b*	7,69 ± 1,44 a	6,27 ± 1,56 b	7,06 ± 1,23 ab	7,00 ± 1,31 ab	0,87	0,02	0,03
Texture (N/cm²)	16,62 ± 1,65 b	27,00 ± 4,12 a	15,73 ± 1,63 b	16,68 ± 1,78 b	0,001	0,001	0,001
Exsudat (%)	0,77 ± 0,34	1,29 ± 0,72	0,76 ± 0,31	0,97 ± 0,32	0,12	0,001	0,14
Pertes en jus après cuisson (%)	11,08 ± 1,48 b	15,29 ± 2,43 a	8,59 ± 0,94 c	9,78 ± 1,08 bc	0,001	0,001	0,001
Rendement technologique (%)	86,38 ± 2,16 a	72,38 ± 4,68 c	84,28 ± 2,72 ab	81,35 ± 2,03 b	0,001	0,001	0,001
Indice TBARS	0,80 ± 0,35	0,79 ± 0,25	0,44 ± 0,19	0,66 ± 0,34	0,001	0,13	0,09
Matières sèches (%)	27,70 ± 0,87	24,11 ± 1,82	25,60 ± 0,70	26,16 ± 0,51	0,001	0,26	0,23
Protéines (%)	24,72 ± 0,87 a	21,68 ± 1,80 b	25,21 ± 0,89 a	25,41 ± 0,52 a	0,001	0,001	0,001
Lipides (%)	3,01 ± 0,86	2,51 ± 0,96	1,01 ± 0,33	1,02 ± 0,15	0,001	0,26	0,23
Matières minérales (%)	1,08 ± 0,04 b	1,05 ± 0,04 b	1,42 ± 0,05 a	1,10 ± 0,13 b	0,001	0,001	0,001
Fer (µg/g)	3,03 ± 0,56	3,42 ± 1,31	2,37 ± 1,15	3,77 ± 1,45	0,65	0,01	0,14
Myoglobine (µg/g)	922 ± 170	1042 ± 399	722 ± 349	1147 ± 441	0,65	0,01	0,14
Triglycérides	2,51 ± 0,81	2,02 ± 0,90	0,54 ± 0,21	0,64 ± 0,13	0,001	0,33	0,14
Cholestérol	0,04 ± 0,02 b	0,07 ± 0,02 a	0,05 ± 0,02 ab	0,04 ± 0,01 b	0,31	0,15	0,001
Phospholipides	0,46 ± 0,08	0,42 ± 0,07	0,40 ± 0,13	0,34 ± 0,07	0,01	0,09	0,77
AGS	34,16 ± 0,82 a	29,77 ± 1,79 b	35,74 ± 2,16 a	36,04 ± 1,55 a	0,001	0,001	0,001
AGMI	39,86 ± 1,43	39,45 ± 2,10	27,20 ± 2,21	27,57 ± 1,38	0,001	0,96	0,50
AGPI	25,99 ± 1,05 c	30,78 ± 2,55 b	37,05 ± 2,63 a	36,38 ± 1,28 a	0,001	0,01	0,001
AG n-6	23,66 ± 0,98 c	27,91 ± 2,18 b	34,13 ± 2,31 a	33,31 ± 1,11 a	0,001	0,01	0,001
AG n-3	2,32 ± 0,57	2,87 ± 0,89	2,92 ± 0,36	3,08 ± 0,24	0,03	0,06	0,29
AG n-6/AG n-3	10,70 ± 2,47	10,27 ± 2,14	11,79 ± 0,91	10,87 ± 0,68	0,13	0,23	0,65
Couleur	2,25 ± 1,43	2,49 ± 1,35	2,23 ± 1,37	2,45 ± 1,36	0,83	0,07	0,93
Tendreté	3,79 ± 1,16 b	2,07 ± 1,14 c	4,71 ± 1,39 a	4,41 ± 1,33 a	0,001	0,001	0,001
Jutosité	3,05 ± 1,46	2,78 ± 1,61	3,33 ± 1,50	3,15 ± 1,31	0,02	0,11	0,74
Fibreux	2,28 ± 1,26 b	3,15 ± 1,61 a	1,69 ± 1,24 c	2,03 ± 1,21 bc	0,001	0,001	0,04
Collant	1,63 ± 1,13	1,11 ± 1,00	1,83 ± 1,33	1,71 ± 1,19	0,001	0,004	0,07
Flaveur globale	3,41 ± 0,94 a	3,00 ± 1,04 b	3,37 ± 1,03 a	3,38 ± 0,99 a	0,06	0,03	0,03
Flaveur acide	1,11 ± 0,80	1,03 ± 1,00	1,36 ± 1,13	1,26 ± 1,02	0,01	0,31	0,93
Flaveur rance	0,33 ± 0,29	0,37 ± 0,42	0,33 ± 0,34	0,29 ± 0,28	0,23	0,82	0,23
Appréciation	2,27 ± 1,16 a	1,60 ± 1,03 b	2,28 ± 1,23 a	2,42 ± 1,25 a	0,001	0,02	0,001

L* = luminance ; a* = indice de rouge ; b* = indice de jaune ; La texture du filet est estimée par sa résistance à une force de compression-cisaillement (N/cm²). L'exsudat correspond à une perte en jus. Il a été mesuré après 8 jours de conservation des filets à +4°C. Le rendement technologique est estimé après saumurage-cuisson d'un échantillon de filet. L'indice TBARS est exprimé en mg équivalent MDA/g muscle. MDA = malondialdéhyde. Les triglycérides, le cholestérol et les phospholipides sont exprimés en g/100 g muscle. AGS, AGMI, AGPI = Acides Gras Saturés, Mono-Insaturés et Poly-Insaturés, respectivement. Les différentes catégories d'AG sont exprimées en % AG totaux.

a, b, c : moyennes significativement différentes à P < 0,05 pour un paramètre donné.

**QUALITE NUTRITIONNELLE DES ŒUFS DE CONSOMMATION DE CAILLES
(*COTURNIX COTURNIX JAPONICA*) PRODUITS EN COTE D'IVOIRE**

**Kouakou N'Goran David Vincent¹, Koffi Kouadio Frédéric², Amoikon Kouakou Ernest²
et Kouba Marlyne³**

¹*Institut National Polytechnique Félix Houphouët-Boigny, B.P 1093 Yamoussoukro, 0000 Yamoussoukro, Côte d'Ivoire,*

²*Université Félix Houphouët-Boigny, B.P 582 Abidjan 22, 0000 Abidjan, Côte d'Ivoire,*
³*Agro campus Ouest, 65 rue de Saint-Brieuc, 35042 rennes, France*

david.kouakou@inphb.ci

RÉSUMÉ

L'alimentation des cailles (*Coturnix coturnix japonica*) dans les fermes ivoiriennes est basée principalement sur les aliments commerciaux de poules pondeuses. Cependant, cette pratique pourrait nuire à la qualité nutritionnelle des œufs. L'objectif de cette étude était de déterminer l'impact de cet aliment (régime témoin) ou de sa supplémentation avec 5 % de graines d'euphorbe (*Euphorbia heterophylla*) (régime R5) sur le profil en acide gras des jaunes d'œufs de 30 cailles de 172±2 g durant 15 jours. Les résultats ont montré que le régime R5 a induit une baisse significative de la teneur en cholestérol total du jaune d'œuf (P<0,05). Aussi ce régime ne modifie-t-il pas les teneurs en acides gras saturés, en acides gras mono-insaturés et en acides gras polyinsaturés oméga 6 (AGPI n-6) (P>0,05). Cependant, il a induit une amélioration de la teneur en acides gras polyinsaturés oméga 3 (AGPI n-3) (P<0,05) qui était cinq fois plus élevée que celle du régime témoin. Les proportions des acides gras C18:3 n-3, C20:5 n-3 et C22:6 n-3 des jaunes d'œufs issus de R5 ont été multipliées respectivement par 17, 11 et 3. Par ailleurs, le rapport AGPI n-6/AGPI n-3 était inférieur à 4. Ainsi, l'incorporation de 5% de graines d'euphorbe dans l'aliment commercial de poules pondeuses a permis d'améliorer la qualité nutritionnelle des œufs de cailles.

ABSTRACT

Nutritional quality of table eggs of quails (*Coturnix coturnix japonica*) produced in Côte d'Ivoire

The feeding of quails (*Coturnix coturnix japonica*) in Côte d'Ivoire's farms is mainly based on the commercial feed for laying hens. However, this practice could affect the nutritional quality of eggs. The aim of this study was to determine the impact of this diet (used as control), or its supplementation with 5% euphorbia seeds (*Euphorbia heterophylla*) (R5 diet), on the fatty acid profile of egg yolks of 30 quails of 172±2 g for 15 days. The results showed that the R5 diet induced a significant fall of the total cholesterol content of the egg yolk (P<0.05). Moreover, this diet did not affect saturated fatty acids, mono-unsaturated fatty acids, and omega-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA n-6) (P>0.05). However, it improved omega-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA n-3) contents (P<0.05), which were five times higher than those of the control diet. The proportions of C18:3 n-3, C20:5 n-3 and C22:6 n-3 fatty acids in R5 egg yolks, of were respectively multiplied by 17, 11 and 3. In addition, the ratio of PUFA n-6/PUFA n-3 was less than 4. Thus, the incorporation of 5% euphorbia seeds into the commercial feed of laying hens improved the nutritional quality of quail eggs.

INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la première cause de mortalité (31%) dans le monde (OMS, 2014) et parmi les mesures préventives figure la consommation régulière d'acides gras polyinsaturés n-3 (l'acide α -linoléique (C18:3 n-3, ALA), l'acide eicosapentaénoïque (C20:5 n-3, EPA) et l'acide docosahexaénoïque (C22:6 n-3, DHA)) (Rymer et al., 2010). Chez l'Homme, le rendement de cette voie métabolique de transformation de l'ALA en ses dérivés AGPI à longue chaîne (AGPI-LC) est faible, contrairement aux poissons, lapins et les volailles (Mourot, 2010). Aussi, l'enrichissement en AGPI n-3 des œufs de cailles, œufs de plus en plus prisés par la population ivoirienne, est-il une stratégie alternative pour apporter les AGPI-LC à l'Homme et prévenir ainsi les maladies cardiovasculaires. Parmi les sources naturelles d'enrichissement disponibles en Côte d'Ivoire, figure *Euphorbia heterophylla* dont les graines contiennent 30% MS de matière grasse composé à plus de 50% d'ALA (Kouakou et al., 2013 ; Kouakou et al., 2015).

Les cailles pondeuses sont aussi très appréciées par les éleveurs car elles sont nourries avec le même aliment commercial de poules pondeuses qu'elles consomment trois fois moins (35 g vs 120 g) pour un prix de vente de l'œuf (2000 F CFA/30 œufs) et un taux de ponte identiques (Koffi et al., 2016). Cependant, au regard du rapport des AGPI n-6 et AGPI n-3 du jaune d'œuf des poules pondeuses nourries avec l'aliment commercial pendant 28 jours (Kouakou et al., 2015), il est important de déterminer l'impact de cet aliment ou de sa supplémentation en graines d'euphorbe (*Euphorbia heterophylla*) sur le profil en acides gras des jaunes d'œufs de cailles japonaises.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Site expérimental

L'étude a été réalisée au Laboratoire de zootechnie de l'Institut national polytechnique Félix Houphouët-Boigny (INP-HB) de Yamoussoukro. La température et l'humidité relative durant l'essai ont varié respectivement de 20 à 30 °C et de 80 à 85 %. La pluviométrie moyenne mensuelle a été de 1100 mm.

1.2. Dispositif expérimental et conduite de l'essai

Les cailles ont été élevées conformément aux normes de bonnes pratiques en expérimentation animale. Trente cailles pondeuses (*Coturnix coturnix japonica*), de six mois d'âge ayant un poids vif moyen de 172 ± 2 g, ont été réparties de manière aléatoire en deux groupes de 15 cailles. Un groupe a reçu l'aliment commercial de poules pondeuses (100 %, régime témoin [RC]). Le second groupe a reçu un régime constitué de 95 % du régime témoin RC et de 5 % de graines d'euphorbe (R5) (tableau I). L'essai a duré 31 jours répartis en deux phases. La première phase dite d'adaptation des cailles aux conditions d'élevage a duré 15 jours. Au cours de cette phase, toutes les cailles ont été soumises à l'aliment commercial des poules pondeuses. La seconde phase dite expérimentale a duré 15 jours et a débuté par le

réajustement pondéral des différents lots puis l'attribution aléatoire des deux régimes aux cages. Durant l'essai, les cailles par cage recevaient chaque jour 200 g d'aliment et de l'eau à volonté. Les aliments ingérés ont été quantifiés. Les œufs ont été collectés et pesés chaque jour. A la fin de l'essai, tous les animaux ont été pesés avant d'être abattus (Koffi et al., 2016). Les œufs recueillis au cours des trois derniers jours de l'essai ont été cassés et les jaunes ont été stockés à -8°C jusqu'à l'analyse. L'étude économique a été réalisée sur la base du coût de production lié à l'aliment d'un kilogramme d'œuf de caille. Le coût du kilogramme de graines d'euphorbe a été calculé sur la base du gain financier journalier d'un paysan qui est de 1,5 € pour huit heures de travail. Un paysan récolte en moyenne cinq kilogrammes de graines en huit heures. Le coût du kilogramme de l'aliment commercial de poule pondeuse est de 0,4 € environ.

1.3. Lipides totaux, cholestérol total et profil en acide gras

Les lipides des jaunes d'œufs ont été extraits selon la technique de Delsal (1944) et la teneur en cholestérol total a été déterminée selon la méthode de Pasin et al. (1998). Les profils en acides gras des jaunes d'œufs ont été déterminés selon la technique de Morrison et Smith (1964) par chromatographie en phase gazeuse au Laboratoire de biochimie-nutrition humaine d'Agrocampus Ouest à Rennes, France.

1.4. Analyses statistiques

Les différences entre les deux lots ont été testées par le test-t de Student. L'effet fixe était le régime. Le seuil de signification était de 5%. Les tests ont été réalisés à l'aide du logiciel STATA/IC version 12.0

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Ingestion alimentaire et production d'œufs

L'ingestion du régime R5 par les cailles n'a pas significativement modifié leurs poids vifs ni la consommation journalière ($P > 0,05$) (tableau II). De même le poids moyen des œufs et du jaune d'œuf n'a pas été affecté par l'ingestion du régime R5 ($P > 0,05$). L'absence de différence significative entre les régimes sur ces paramètres est conforme aux résultats des études de Rowghani et al. (2007). L'étude économique a révélé que la supplémentation du régime témoin par 5 % de graine d'euphorbe induisait une augmentation de 16,2 % du coût de production lié à l'aliment d'un kilogramme d'œuf de caille, essentiellement due à la réduction non significative du taux de ponte (tableau II).

Lipides totaux, cholestérol total et profil en acide gras du jaune d'œuf

Les teneurs en lipides totaux du jaune d'œuf n'ont pas été affectées par les régimes testés ($P > 0,05$). Ceci s'expliquerait par le fait que les enzymes de la lipogenèse ne sont pas affectés par la nature du régime alimentaire (Benatmane, 2012). La teneur en cholestérol (27 mg/g) du jaune d'œuf des cailles nourries avec RC était supérieure ($P < 0,05$) à celle du jaune des œufs obtenus avec R5 (16 mg/g), de même, qu'à celle de la teneur de référence (12 mg/g) de jaune d'œuf de cailles. Le régime R5 n'a pas modifié significativement les teneurs des acides gras saturés et des acides gras mono-insaturés

($P > 0,05$). Mais, ce régime a induit une augmentation de la teneur en AGPI ($P < 0,01$). La teneur de l'ensemble des AGPI n-6 n'a pas été affectée par l'incorporation de 5% de graines d'euphorbe, contrairement à l'ensemble des AGPI n-3 dont la teneur a été cinq fois plus importante que dans le régime RC ($P < 0,05$). Toutefois les particularités observées au niveau de certains acides gras (C20 :3 n-3, ou C22 :5 n-6, C22 :4 n-6) pourraient être liées d'une part, au étape intermédiaire très brève du métabolisme et d'autre part, à une utilisation équilibrée de la Δ -6 désaturase pour le métabolisme des PUFA n-6 et n-3 suite à un apport de la teneur en ALA et en général de l'ensemble des PUFA n-3 (Ander et al., 2010). Les teneurs en ALA, EPA et DHA du jaune d'œuf issu du régime R5 ont été multipliées respectivement par 17, 11 et 3. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Kouakou et al. (2015) chez les poules pondeuses. Le régime R5 a réduit le rapport n-6/n-3 (14 pour RC contre 3 pour R5) ($P < 0,05$) (tableau III). Ce ratio a été inférieur à celui de 4 rapporté par Kazmierska et al. (2007) qui ont utilisé comme source d'enrichissement en AGPI n-3 un mélange de 1 % d'huile de lin et de 0,5 d'huile de poisson dans l'alimentation des cailles pendant trois mois. Ces résultats sont en accord avec les recommandations nutritionnelles de l'ANSES (n-6/n-3 inférieur à 4) (ANSES, 2011). Ils confirment, par ailleurs, l'intérêt nutritionnel de la supplémentation en graines

d'euphorbe du régime des cailles dans le but d'améliorer la qualité nutritionnelle de leurs œufs. Aussi, le prix de vente certainement plus élevé de ce type d'œuf permettra-t-il aux producteurs d'obtenir une marge financière satisfaisante, et ce, malgré l'augmentation constatée du coût de production lié à l'aliment.

CONCLUSION

Cette étude montre que l'incorporation des graines d'*Euphorbia heterophylla* dans l'alimentation des cailles, pourrait être une stratégie alternative pour apporter les AGPI-LC aux humains dans les régions du monde où cette plante est présente et non encore valorisée. Ainsi, les produits animaux pourraient contribuer à la prévention des maladies cardiovasculaires. Toutefois, il importe que des études complémentaires de longue durée soient entreprises afin d'évaluer l'impact de cet apport en graines d'euphorbe sur un nombre plus important de cailles.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Prof Philippe Legrand et Dr Daniel Catheline pour leurs contributions techniques et la Direction Générale de l'INP-HB pour sa contribution institutionnelle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANSES, 2011. Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras, Rapport d'expertise collective, Maisson-Alfort.
2. Benatmane F., 2012. Thèse Doct., Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie, 172 p.
3. Delsal L., 1944. Bull. Soc. Chim. Biol., (26), 99-105.
4. Kazmierska M., Korzeniowska M., Trziszka T., Jarosz B., 2007. Pol. J. Food Nutr. Sci., (57), 281-284.
5. Koffi K. F., Kouakou N. D. V., Angbo-Kouakou C. E. M., Kouassi G. F., Koné G. A., Amoikon K. E., Kouba M., 2016. J. Appl. Biosci., (101), 9610-9617.
6. Kouakou N. D. V., Grongnet J. -F., Assidjo E. N., Thys E., Marnet P -G., Catheline D., Legrand P., Kouba M., 2013. Meat Sci., (93), 821-826.
7. Kouakou N. D. V., Traoré G. C. M., Angbo C. E. M., Kouamé K. B., Adima A. A., Assidjo N. E., Grongnet J.-F., Kouba M., 2015. Int. J. Biol. Chem. Sci., (9), 1902-1909.
8. Morrison W. R., Smith L. M., 1964. Lipid Res., (5), 600-608.
9. OMS, 2014. www.who.int/cardiovascular_diseases/fr/ (Consulté le 30/09/2015).
10. Pasin G, Smith G. M., O'mahony M., 1998. Food Chem., (61), 255-259.
11. Rowghani E., Arab M., Nafizi S., Bakhtiari Z., 2007. Int. J. Poult. Sci., (6), 111-114.
12. Rymer C., Gibbs R. A., Givens D. I., 2010. Poult. Sci., 89 (1), 150-159.

Tableau 1. Ingrédients et compositions physicochimiques des différents régimes des poules pondeuses (régime contrôle (RC) ou supplémenté par 5% de graines d'euphorbe (*Euphorbia heterophylla*) (R5).

Ingrédients (%)	Régimes alimentaires	
	RC	R5
Aliment commercial	100	95
Graines d'euphorbe	-	5
Compositions chimiques (% MS)		
Matière sèche (%)	91,5	94,32
Protéine brute (%)	18,9	19,2
Matière grasse (%)	1,9	3,4
Matière minérale (%)	12,8	12,7
Cellulose brute (%)	1,6	1,8
Calcium (%)	3,6	3,5
Phosphore (%)	1,8	1,8
Calcium / Phosphore	2	2
Énergie métabolisable (MJ/kg MS)	14,01	14,38
Acides gras (mg/g de régimes)	11,9	20,4

Moyenne ± écart-type, RC = Régime contrôle (100% aliment commercial) ; R5 = 95% du régime contrôle associé à 5% de graines d'euphorbe ; 1 Euro = 656 F CFA.

Tableau II: Caractéristiques zoo-économiques des cailles et caractéristiques physiques de leurs œufs (n=15 par régime)

Paramètres	Régimes alimentaires		
	RC	R5%	
Paramètres zootechniques des cailles			
Poids des cailles à 2 semaines (g)	199,3±15,8	191,1±17,0	0,28
Poids des cailles 4 semaines (g)	199,3±15,9	191,9±17,1	0,96
Consommation moyenne (g)	33,5±2,7	33,7±2,2	0,92
Paramètres physiques des œufs			
Taux de ponte (%)	98,0±10,9	82,0±4,5	0,18
Poids moyen des œufs (g)	10,0±0,5	10,2±0,9	0,42
Poids moyen du jaune (g)	4,0±0,4	4,1±0,5	0,97
Coût de production d'un kilogramme d'œufs lié à l'aliment (en Euros)²			
Ingrédients	Régimes alimentaires		
	RC	R5%	
	100% RC	95% RC	5% graines d'euphorbe
Quantité (kg)	1	0,95	0,05
Coût du kg	0,4	0,38	0,015
Coût total aliment/kg	0,4	0,395	
Indice de consommation	3,4	4,0	
Coût de production ²	1,36	1,58	

RC = Régime contrôle (100% aliment commercial) ; R5 = 95% du régime contrôle associé à 5% de graines d'euphorbe ;

Tableau III: Teneurs en lipides (%) et profil en acides gras (% des acides gras totaux) du jaune d'œuf de poules recevant un régime contrôle (RC) ou supplémenté par 5% de graines d'euphorbe (*Euphorbia heterophylla*) (R5).

Profils	Régimes expérimentaux		Effet du régime
	RC	R5	
Matière sèche du jaune (%)	47,5±12,8	41,2±18,8	0,68
Lipides totaux (% MS)	25,0±7,1	25,0±7,1	0,56
AG (mg/g de jaune sec)	141,0±17,2	149,8±19,8	0,39
Acides gras, % des AG totaux			
C14:0	0,5±0,0	0,4±0,1	0,28
C14:1 n-5	0,1±0,0	0,1±0,0	0,67
C15:0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,27
C16:0	25,1±0,1	23,8±1,0	0,23
C16:1 n-9	0,6±0,0	0,6±0,0	0,45
C16:1 n-7	3,5±0,3	3,1±0,2	0,22
C17:1	0,1±0,0	0,1±0,0	0,39
C18:0	10,5±0,2	11,3±0,0	0,04
C18:1 trans	0,2±0,0	0,2±0,0	0,29
C18:1 n-9	41,8±0,1	39,4±1,2	0,11
C18:1 n-7	2,5±0,1	2,1±0,1	0,06
C18:2 n-6	11,2±0,4	12,6±0,6	0,09
C18:3 n-6	0,2±0,0	0,2±0,0	0,75
C18:3 n-3	0,1±0,0	2,1±0,7	0,06
C20:1 n-9	0,1±0,0	0,1±0,0	0,24
C20:3 n-3	0,1±0,0	0,0±0,0	0,01
C20:3 n-6	0,1±0,0	0,1±0,0	0,67
C20:4 n-6	2,1±0,1	1,6±0,2	0,12
C20:5 n-3	0,0±0,0	0,1±0,0	0,02
C22:4 n-6	0,1±0,0	0,0±0,0	0,00
C22:5 n-6	0,6±0,0	-	
C22:5 n-3	0,1±0,0	0,3±0,0	0,02
C22:6 n-3	0,6±0,1	2,0±0,2	0,01
Σ AGS	36,1±0,3	35,6±1,1	0,56
Σ AGMI	48,9±0,3	45,5±1,1	0,06
Σ AGPI	12,8±0,5	17,3±0,3	0,01
Σ AGPI n-6	12,0±0,4	12,9±0,6	0,21
Σ AGPI n-3	0,9±0,1	4,4±0,9	0,03
Σ AGPI n-6/ Σ AGPI n-3	14,0±1,5	3,0±0,7	0,01
ΣAGS: somme des acides gras saturés (C14:0+C15:0+C16:0+C18:0+C20:0) ; ΣAGMI: somme des acides gras mono-insaturés (C14:1+C16:1+C18:1+C20:1) ; ΣAGPI n-3: somme des acides gras polyinsaturés n-3 (C18:3+C18: 4+C20:3+C20:5+C22:5+C22:6) ; Σ AGPI n-6: somme des acides gras polyinsaturés n-6 (C18:2+C18:3+C20:2+C20:4+C22:4) ; ΣAGPI: somme des acides gras polyinsaturés (Σ AGPI n-3 + Σ AGPI n-6)			

IDENTIFICATION DE VESICULES EXTRACELLULAIRES IMPLIQUEES DANS LA MINERALISATION DE LA COQUILLE DE L'ŒUF DE POULE

L. Stapane¹, N. Le Roy¹, J. Ezagal¹ et J. Gautron¹

I.BOA, INRA, Université de Tours, Centre Val de Loire, 37380 Nouzilly, France

lilian.stapane@inra.fr

RÉSUMÉ

La coquille d'œuf constitue une barrière physique contre les chocs mécaniques et la pénétration microbienne. Son intégrité est cruciale pour assurer la qualité hygiénique de cet ingrédient de base de la consommation humaine et limiter le nombre d'œufs déclassés pour défaut de coquille. Dans ce contexte, nous caractérisons différents marqueurs qui influencent l'ultrastructure de la coquille et déterminent sa solidité. Ces marqueurs constituent des candidats biologiques utilisables en sélection génomique pour renforcer la solidité de la coquille. La coquille est constituée à 95 % d'une phase minérale de carbonate de calcium (calcite) et à 3,5 % d'une matrice organique principalement constituée de protéines. La formation de la coquille résulte d'un processus de biominéralisation contrôlé et extracellulaire qui a lieu dans l'utérus. Ce processus implique un fluide dans lequel baigne l'œuf lors de la formation de la coquille et une forme transitoire de carbonate de calcium amorphe (ACC). Cette forme transitoire serait stabilisée et transportée par des vésicules extracellulaires du fluide utérin jusqu'au site de la minéralisation. Ce travail vise à mettre en évidence et caractériser le rôle des vésicules extracellulaires dans le processus de minéralisation. Dans un premier temps, la RT-qPCR en temps réel a permis de quantifier l'expression de gènes cibles vésiculaires dans différents tissus. Les résultats confirment une forte expression des acteurs moléculaires clés de ce système (*edil3*, *anxa1*, *anxa2*) au niveau des régions de l'oviducte impliquées dans la formation de la coquille. Dans un second temps, une analyse par microscopie électronique à transmission a été couplée à une analyse élémentaire sur le fluide utérin collecté pendant la minéralisation. Les vésicules extracellulaires (~300 nm) ont pu être visualisées ainsi que le carbonate de calcium qu'elles contiennent. Des Western Blots ont permis de confirmer la présence d'un des acteurs clés dans les vésicules purifiées. Les résultats de cette étude montrent pour la première fois l'implication du transport vésiculaire du calcium dans la biominéralisation de la coquille d'œuf.

ABSTRACT

Identification of extracellular vesicles involved in the biomineralization of the hen eggshell.

The eggshell is a crucial barrier against mechanical stresses and microbial attacks. Its integrity is essential to maintain the hygienic quality of this basic human food and to restrict the growth of downgraded eggs. In such a context, we are looking for markers specific to eggshell strength, in order to optimize egg quality. The eggshell is made of a mineral (calcite, calcium carbonate) phase (95%) and an organic matrix (3.5%) mostly containing proteins. The eggshell formation arises from an extra-cellular biomineralization process, which takes place in a fluid that contains eggshell precursors and involves a transient phase of calcium carbonate (ACC). This ACC could be stabilized and carried to the mineralization site through extracellular vesicles. This work aims at exploring the presence and the role of extra-cellular vesicles in the process of eggshell mineralization. In a first approach, we assessed, by real time qRT-PCR, the expression of vesicular target genes in several tissues. The results confirmed a high expression of target genes (*edil3*, *anxa1*, *anxa2*) in the portions of the oviduct where mineralization takes place. In a second approach, observation by electronic microscopy coupled with elementary analysis of the uterine fluid collected during eggshell biomineralization highlighted the presence of extracellular vesicles (~ 300 nm) containing calcium carbonate. Finally, a Western Blot analysis confirmed the presence of a key protein in the purified vesicle fraction. The results of this study shows for the first time the involvement of extra-cellular vesicle in the transport of calcium carbonate for the biomineralization of the hen eggshell.

INTRODUCTION

La coquille d'œuf constitue une barrière physique contre les chocs mécaniques et la pénétration microbienne. Son intégrité est cruciale pour assurer la qualité hygiénique de cet ingrédient de base de la consommation humaine et limiter le nombre d'œufs déclassés pour défaut de coquille. La qualité de la coquille a été fortement améliorée grâce à la sélection de poules aux coquilles renforcées. Cette sélection a porté principalement sur la masse de coquille. Elle n'est cependant pas le seul critère déterminant sa qualité. En effet, à masse égale, les coquilles peuvent présenter des ultrastructures différentes qui déterminent leurs propriétés mécaniques (Nys et al., 2004). Pour obtenir de nouveaux gains en terme de sélection et de génétique, les acteurs moléculaires impliqués dans les processus qui déterminent la texture et la solidité de la coquille devront être pris en compte. Dans ce contexte, nous étudions les mécanismes de minéralisation pour caractériser les acteurs moléculaires influençant l'ultrastructure de la coquille et potentiellement utilisables en sélection génomique.

La coquille est constituée à 95 % d'une phase minérale de carbonate de calcium (calcite) et à 3,5 % d'une matrice organique principalement constituée de protéines (Nys et al., 1999). La formation de la coquille dans l'utérus de la poule résulte d'un processus de biominéralisation contrôlé et extracellulaire. Le fluide utérin baigne l'œuf lors de la formation de la coquille et joue un rôle central dans ce processus, apportant les précurseurs organiques et minéraux et régulant le processus de calcification. Une étude récente a démontré le rôle clef du carbonate de calcium amorphe (ACC) dans la synthèse de la coquille de l'œuf de poule et mis en évidence son ultrastructure (Rodríguez-Navarro et al., 2015). L'ACC constitue une forme transitoire instable vers la forme cristalline stable. L'ACC correspond à une réserve temporaire de calcium soluble fournissant les ions nécessaires durant la minéralisation rapide et permettant une cristallisation dans des conditions physiologiques (Ziegler, 1994). Cette forme amorphe de carbonate de calcium est plus soluble mais moins stable que la forme cristalline (Brecevic and Nielsen, 1989; Addadi et al., 2003). En conditions physiologiques l'ACC doit être stabilisée, ce qui nous a logiquement conduit au questionnement sur le mécanisme de maintien de cette forme dans le fluide utérin de la poule. Une hypothèse indiquant le rôle de vésicules extracellulaires stabilisant cette forme amorphe a émergé en confrontant des données vésiculaires obtenues *in vitro* (Tester et al., 2011), et *in situ* sur des systèmes de minéralisation d'invertébrés et osseux (Flores et Livingston, 2017; Vidasky et al., 2015; Balcerzak et al., 2008; Hasegawa et al., 2017; Mahamid et al., 2011). Des observations au microscope de la jonction

utérovaginale et de la coquille montrent un nombre important de vésicules (Wyburn et al., 1973; Dennis et al., 1996; Chien et al., 2009; Waqas et al., 2016). Des données transcriptomiques récentes de notre équipe montrent qu'un nombre important de gènes est impliqué dans le transport vésiculaire dans l'utérus de poule (Gautron, 2018). L'ensemble de ces observations conforte l'hypothèse de la nécessité que l'ACC soit stabilisé dans des vésicules pour qu'il permette l'élaboration de la structure cristalline de la coquille. Ces vésicules permettraient de stabiliser et de transporter l'ACC jusqu'aux sites de nucléation situés au niveau de noyaux mamillaires présents sur les membranes coquillières de l'œuf.

A partir de données transcriptomiques utérines obtenues dans notre équipe et de données bibliographiques sur l'implication de vésicules dans la minéralisation des systèmes osseux (Shapiro et al., 2015), nous avons évalué le rôle potentiel d'acteurs protéiques préalablement identifiés dans le système vésiculaire utérin. Ce travail vise donc à mettre en évidence et à caractériser le rôle de vésicules extracellulaires dans le processus de minéralisation de la coquille de l'œuf de poule.

1. MATERIELS ET METHODES

Les différentes expériences ont été réalisées en respectant les "European Communities Council Directives" sur le bien-être des animaux. Le protocole d'expérimentation a été validé par le Comité d'éthique d'expérimentation animale de Val de Loire (comité d'éthique national pour l'expérimentation animale n°19) et le ministère sous #16099-015902. Des poules (ISA-Hendrix, 35 semaines au prélèvement), ont été sacrifiées durant la phase active de minéralisation. Plusieurs tissus (os, duodénum, rein, foie) et segments d'oviducte (magnum, isthme blanc, isthme rouge, utérus), ont été collectés et directement plongés dans l'azote liquide. Les tissus ont été conservés à -80°C en cryo-tubes jusqu'à l'extraction des ARNs (RNA now™).

Du fluide utérin a été recueilli par l'induction de l'expulsion de l'œuf par injection de 50 µg de prostaglandine-F2α durant la phase de minéralisation (Gautron et al., 1997). Une partie du fluide utérin a été diluée dans du tampon phosphate (PBS, 5 : 1 (v : v)) et immédiatement utilisée pour la purification des vésicules extracellulaires. Le reste du fluide utérin a été déposé dans l'azote liquide de manière à obtenir des billes cryo-conservées pour l'analyse au microscope. Afin de contrôler le profil protéique du fluide récolté, une aliquote a été collectée et diluée dans du tampon Laemmli pour électrophorèse SDS-PAGE.

Les vésicules extracellulaires ont été purifiées du fluide utérin par un système de centrifugations en

série. Le fluide utérin dilué dans du PBS a d'abord été centrifugé à 100 g pendant 15 min puis à 12 000 g pendant 15 min pour éliminer les débris cellulaires. Après ces étapes, deux centrifugations successives de 90 min à 100 000 g ont été effectuées afin de culoter les vésicules. Le culot vésiculaire a ensuite été suspendu dans du PBS et conservé à -20°C jusqu'à son analyse par Western Blot.

Le fluide utérin et la fraction vésiculaire ont été dilués dans du tampon Laemmli et soumis à une électrophorèse SDS-PAGE en gel de polyacrylamide à 12 %. Les protéines séparées ont été transférées sur membranes de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées avec un anticorps anti-EDIL3 (rabbit polyclonal; SAB2105802, Sigma-Aldrich) puis un anticorps secondaire Alexa Fluor® 680 (Invitrogen) avant d'être révélées à l'aide d'un imageur à infrarouge (LI-COR Odyssey® imaging system).

Les ARNs totaux ont été extraits à partir des tissus congelés et ont ensuite été soumis à un traitement à la DNase du kit TURBO DNA-free™ (Invitrogen) permettant d'éliminer l'ADN génomique restant. La concentration des ARNs a été mesurée par absorption à 260 nm au NanoDrop™. Les ADNc ont été synthétisés en utilisant des Oligo(dT)™ (Promega) et une transcriptase inverse Superscript II™ (Promega). L'expression des gènes a été évaluée par High Throughput quantitative PCR (Fluidigm Biomark HD) sur les ADNc. Les ADNc ainsi que les couples d'amorces permettant d'amplifier une portion des gènes cibles vésiculaires *edil3*, *anxa1*, *anxa2* et *pdc6ip* ont été utilisés pour analyser l'expression quantitative de ces gènes pour chaque tissu et segment d'oviducte. L'expression des gènes est exprimée en quantité relative de chaque transcript cible normalisée par la moyenne de quantité de transcripts de huit gènes de ménage par l'intermédiaire du logiciel GenNorm. Les niveaux d'expression des gènes étudiés ont été comparés dans différentes situations physiologiques, à l'aide d'une analyse de variance suivie d'une comparaison par paire (Tukey).

Une bille de fluide utérin prélevée durant la minéralisation de la coquille a été déposée congelée sur une grille en Nickel pour observation en microscopie électronique. La préparation a été contrastée avec de l'acétate d'uranyle aqueux 2% et immédiatement observée au microscopie électronique à transmission (TEM-1400 Plus electron microscope-JEOL). Une analyse élémentaire a été réalisée avec le mode STEM du microscope électronique de manière à obtenir une cartographie des éléments chimiques présents dans les vésicules observées.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Surexpression de gènes vésiculaires dans les segments de l'oviducte responsables de la minéralisation

L'expression de 4 gènes vésiculaires cibles (*edil3*, *anxa1*, *anxa2* et *pdc6ip*) a été mesurée (i) dans les régions de l'oviducte impliquées dans la minéralisation de la coquille (isthme rouge et utérus) et dans la formation des membranes coquillières (isthme blanc), (ii) dans l'os et (iii) dans d'autres tissus et segments non impliqués dans la minéralisation (duodénum, rein, foie et magnum).

On observe une surexpression des 4 gènes vésiculaires dans les segments de l'oviducte impliqués dans la formation de la coquille (isthmes rouge et blanc, utérus ; Tableau.1). Le gène *edil3* est surexprimé dans les trois segments de l'oviducte impliqués dans la formation de la coquille. Le niveau d'expression d'*Anxa1* est maximum dans l'isthme rouge, qui est le lieu de l'initiation de la minéralisation. Ce niveau reste élevé dans l'isthme blanc, lieu de formation des membranes coquillières et plus faiblement dans l'utérus, l'os et le magnum (lieu de formation du blanc). *Anxa2* est exprimé à un niveau comparable à celui d'*Anxa1*, avec toutefois une expression maximum dans l'utérus et l'isthme rouge, mais aussi dans le duodénum. Le gène marqueur vésiculaire *pdc6ip* est exprimé dans l'ensemble des tissus et segments testés et on note une surexpression dans l'utérus et l'isthme rouge (p-value < 0.05). Ces résultats ainsi que les données bibliographiques montrant la présence des protéines ANXA1, ANXA2 et PDCD6IP dans les vésicules de l'os (Shapiro et al., 2015), confortent l'hypothèse de l'implication de vésicules extracellulaires dans la minéralisation de la coquille. La base de donnée Vesiclepedia, qui recense les protéines vésiculaires les plus fréquemment retrouvées (www.microvesicles.org/), mentionne la protéine PDCD6IP comme étant le plus important marqueur vésiculaire. Sa surexpression dans l'utérus et l'isthme rouge confirmerait donc l'implication du transport vésiculaire lors de la formation de la coquille.

Ces données et des éléments bibliographiques nous ont permis de proposer des rôles pour les protéines EDIL3, ANXA1 et ANXA2. EDIL3 présente des domaines fonctionnels qui lui permettraient de se lier à la fois aux phospholipides de la vésicule et au calcium. Elle participerait à l'adressage des vésicules au niveau des sites de nucléation de la minéralisation. Les protéines ANXA1 et ANXA2 joueraient le rôle de canaux permettant l'entrée de calcium dans les vésicules (Rojas et al., 1992 ; Kirsch et al., 2000). Ce système vésiculaire minéralisant nécessite que le gaz carbonique du fluide utérin alimente la vésicule en carbonate. L'anhydrase carbonique CA4 pourrait intervenir dans ce phénomène (Sauer et al., 1994).

Ainsi, il est possible que le carbonate de calcium vésiculaire soit formé sous forme amorphe et que les vésicules endossent le rôle de stabilisateurs lors de son acheminement jusqu'au site de minéralisation.

2.2 Identification et composition des vésicules extracellulaires dans le fluide utérin

Afin de vérifier cette hypothèse, la présence de vésicules a été explorée dans le fluide utérin, par microscopie électronique à transmission. Les images obtenues ont permis de visualiser des vésicules extracellulaires en nombre important. Les vésicules observées possèdent une taille moyenne de ~ 300 nm (Figure 1A). L'aspect morphologique de ces vésicules est comparable à celui des vésicules identifiées dans l'os (Thouverey et al., 2009).

Des Western Blots réalisés avec des anticorps spécifiques ont confirmé la présence d'EDIL3 au niveau de la fraction vésiculaire (Figure 1B).

La présence de calcium intra-vésiculaire a été recherchée par analyse élémentaire couplée à la microscopie électronique à transmission. La cartographie d'élément obtenue démontre clairement la présence de calcium intra-vésiculaire. On observe également la présence d'oxygène et de carbone dans les vésicules.

CONCLUSION

A travers différentes approches, cette étude a permis de mettre en évidence le rôle de vésicules extracellulaires dans le transport de carbonate de calcium sur le site de la minéralisation de la coquille de l'œuf de poule. Les mesures d'expression génique confirment une activité vésiculaire sur le site de la minéralisation, et les résultats des Western Blots et de l'analyse élémentaire démontrent la présence de carbonate de calcium et de matière organique dans les vésicules extracellulaires. Ces vésicules contiendraient de l'ACC, qui serait stabilisé par la matrice organique. Ces vésicules seraient adressées au site de minéralisation de par leur liaison à EDIL3. Des analyses complémentaires seront nécessaires pour confirmer la forme carbonate de calcium identifiée dans les vésicules, la présence d'autres acteurs protéiques et ainsi valider cette hypothèse de transport sur le site de minéralisation par l'intermédiaire de protéines guides. Les protéines ainsi identifiées pourront être confrontées aux protéomes des vésicules de l'os (Balcerzak et al., 2008 ; Rosenthal et al., 2011).

A terme, les données obtenues permettront sur la base de leur polymorphisme, la sélection de marqueurs biologiques de la minéralisation. Leur potentiel d'utilisation en sélection génomique devra être exploré par des études d'association.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient, l'université François Rabelais de Tours, la région Centre Val de Loire, la plateforme IBiSA de Microscopie Electronique de l'Université de Tours pour son expertise et l'UE PEAT pour le soin et la prise en charge des animaux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Addadi L., Raz S., Weiner S., 2003. *Adv Mater*, (15), 959-70
- Balcerzak M., Malinowska A., Thouverey C., Sekrecka A., Dadlez M., Buchet R., Pikula S., 2008. *Proteomics*, (8), 192-205
- Brevecic L., Nielsen A.E., 1989. *J Cryst Growth*, (98), 504-10
- Dennis J.E., Xiao S.Q., Agarwal M., Fink D.J., Heuer A.H., Caplan A.I., 1996. *J Morphol*, (228), 287-306
- Flores R.L., Livingston B.T., 2017. *Bmc Evol Biol*, (1), 17-125
- Gautron J., Hincke M.T., Nys Y., 1997. *Connect Tissue Res*, (36), 195-210
- Gautron J., 2018. *Compte rendu de fin de projet, ANR IMPACT*, 17p
- Hasegawa T., Yamamoto T., Tsuchiya E., Hongo H., Tsuboi K., Kudo A., Abe M., Yoshida T., Nagai T., Khadiza N., Yokoyama A., Oda K., Ozawa H., de Freitas P.H.L., Li M., Amizuka N., 2017. *Jpn Dent Sci Rev*, (53), 34-45
- Kirsch T., Harrison G., Golub E.E., Nah H.D., 2000. *J Biol Chem*, (275), 35577-83
- Mahamid J., Sharir A., Gur D., Zelzer E., Addadi L., Weiner S., 2011. *J Struct Biol*, (174), 527-35
- Nys Y., Hincke M.T., Arias J.L., Garcia-Ruiz J.M., Solomon S.E., 1999. *Poult Avian Biol Rev*, (10), 143-66
- Nys Y., Gautron J., Garcia-Ruiz J.M., Hincke M.T., 2004. *Cr Palevol*, (3), 549-62
- Rodriguez-Navarro A.B., Marie P., Nys Y., Hincke M.T., Gautron J., 2015. *J Struct Biol*, (190), 291-303
- Rojas E., Arispe N., Haigler H.T., Burns A.L., Pollard H.B., 1992. *Bone Miner*, (17), 214-8
- Rosenthal A.K., Gohr C.M., Ninomiya J., Wakim B.T., 2011. *Arthritis Rheum-Us*, (63), 401-11
- Sauer G.R., Genge B.R., Wu L.N., Donachy J.E., 1994. *Bone Miner*, (26), 69-79
- Shapiro I.M., Landis W.J., Risbud M.V., 2015. *Bone*, (79), 29-36
- Tester C.C., Brock R.E., Wu C.H., Krejci M.R., Weigand S., Joester D., 2011. *Crystengcomm*, (13), 3975-8
- Thouverey C., Bechkoff G., Pikula S., Buchet R., 2009. *Osteoarthr Cartilage*, (17), 64-72
- Vidavsky N., Masic A., Schertel A., Weiner S., Addadi L., 2015. *J Struct Biol*, (192), 358-65
- Waqas M.Y., Yang P., Ahmed N., Zhang Q., Liu T., Li Q., Hu L., Hong C., Chen Q., 2016. *Poultry Sci*, (95), 2112-9
- Wyburn G.M., Johnston H.S., Draper M.H., Davidson M.F., 1973. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*, (58), 143-51
- Ziegler A., 1994. *J Struct Biol*, (112), 110-6

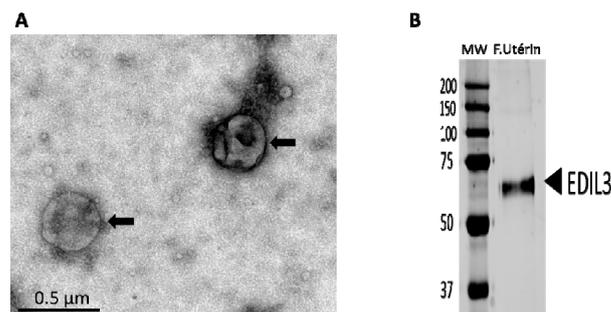
Tableau 1. Mesure de l'expression de gènes vésiculaires dans plusieurs tissus et dans différents segments de l'oviducte.

Les valeurs d'expression ne partageant aucune lettre sont significativement différentes ($P < 0.05$).

Genes	Tissus				Segments de l'oviducte			
	Os	Duodenum	Rein	Foie	Magnum	Isthme blanc	Isthme rouge	Utérus
<i>edil3</i>	0.1875	0	0.00125	0	0	0.825	1.101	0.737
Stat.	B	B	B	B	B	A	A	A
<i>onxa1</i>	0.2046	0.0015	0.0093	0.0004	0.1936	2.19	3.338	0.891
Stat.	CD	D	D	D	CD	B	A	C
<i>onxa2</i>	0.3068	0.5208	0.0062	0.0009	0.543	1.208	2.884	1.904
Stat.	CD	CD	D	D	CD	BC	A	AB
<i>pdcd6ip</i>	0.2128	1.1499	0.7271	0.4929	0.777	0.842	1.454	2.03
Stat.	E	BC	CDE	DE	CD	CD	B	A

Figure 1. Transport vésiculaire impliqué dans la biominéralisation de la coquille d'œuf de poule.

A. Image de microscopie électronique des vésicules du fluide utérin avec coloration à l'acétate d'uranyle aqueux à 2 %. **B.** Western Blot avec l'anticorps anti-EDIL3 testé sur la fraction vésiculaire isolée du fluide utérin.



**LE MAINTIEN D'UNE BONNE QUALITE DE COQUILLE SE FAIT AU DETRIMENT DE LA QUALITE
OSSEUSE DE LA POULE : LA PREUVE EN IMAGES**

Thomas JANVIER¹, Agnès NARCY², Léonie DUSART³, Michel Duclos², Vérane GIGAUD⁴, Gaëlle BENZONI⁵, Eric LESPESSAILLES¹, Hechmi TOUMI¹

¹ Université d'Orléans – 45067 Orléans,

² UMR BOA, INRA, Université de Tours – 37380 Nouzilly

³ ITAVI- Centre INRA Val de Loire – 37380 Nouzilly

⁴ DSM Nutritional Products, 71 Boulevard National, 92400 La Garenne Colombes

⁵ Néovia – 56250 Saint Nolff

thomas.janvier@univ-orleans.fr

RÉSUMÉ

L'allongement du cycle de production des poules pondeuses a conduit à une accentuation des problèmes de qualité de coquille et de fragilité osseuse. D'une part le vieillissement des poules s'accompagne d'une moindre qualité des coquilles et l'augmentation du nombre d'œufs cassés en fin de cycle de production génère une perte économique. D'autre part le nombre de fractures lors de l'enlèvement traduit une certaine fragilité osseuse et pose la question du bien-être animal. Cette première étude exploratoire vise à utiliser des techniques d'imagerie médicale pour mieux décrire la qualité des os de poules âgées au travers d'indicateurs de composition structurale et de microarchitecture pour répondre à la question suivante : quel est le profil osseux de poules caractérisées par une bonne ou une mauvaise qualité de coquille ? Pour cela, 40 poules âgées de 86 à 87 semaines ont été sélectionnées parmi 634 de façon à constituer deux groupes de 20 spécimens représentatifs des extrêmes de qualité de coquille. Les poules ont passé une densitométrie corps entier puis les diaphyses et épiphyses proximales des tibias ont été imagées au micro-scanner. L'imagerie par micro-tomographie des tibias montre des différences significatives pour le volume minéral osseuse (VMO) supérieure chez le groupe présentant une moins bonne qualité de coquille. De plus, l'observation qualitative des scans révèle que l'augmentation volumique de l'os épiphysaire se fait au détriment de l'os structurel. En revanche, les résultats ne montrent pas de différences statistiques entre les groupes pour une mesure de densité minérale osseuse (DMO), ni pour les paramètres macromorphologiques des tibias. Les résultats de DMO et VMO semble indiquer que la capacité à maintenir une bonne qualité de coquille serait corrélée à une plus grande capacité de mobilisation de l'os médullaire et du contenu minéral des os longs.

ABSTRACT

Laying hens' eggshell and bone quality are negatively correlated: the proof is in the pictures

Longer laying cycle (50 additional days between 2004 and 2013) induced a decrease of the eggshell quality and bone strength. On the one hand, the lower eggshell quality and increased number of broken eggs in the late stages of the laying cycle is an economical burden. On the other hand, the amount of fractures during the manipulation process raises the question of the animal wellbeing. This first study aims to use medical imaging technics (densitometry and micro tomography) in order to better describe the quality of elder hens through various body composition and bone microarchitecture markers. The question behind this work is: does eggshell quality fit a specific bone profile? To answer that, 40 hens from 86 to 87 weeks were chosen among a 634 specimens' population and divided into groups of 20 representatives of extremely good/bad eggshell quality. Hens underwent full body densitometry, then tibial diaphysis and proximal epiphysis were scanned using microcomputed tomography (μ CT). Results of the μ CT analyses showed higher bone mineral volume (BMV) in the poor eggshell quality group. The details of the epiphysis microarchitecture revealed that higher VMO occurred in line with a degradation of the trabeculae network. However, no differences in the bone mineral density (BMD) were found on the full body scans. DMO, VMO and microarchitecture results seems to indicate that maintaining a good eggshell quality might be correlated to the ability of mobilizing mineral content, especially medullary bone.

INTRODUCTION

Avec l'allongement du cycle de production des poules pondeuses (+50 jours entre 2004 et 2013), de nouvelles problématiques ont fait surface. D'une part, la coquille des œufs se fragilise avec l'âge des poules induisant de fait une augmentation du nombre d'œufs déclassés ou cassés en fin de cycle, ce qui engendre d'importantes pertes économiques. D'autre part, la fréquence des fractures au niveau des os des pattes, notamment lors de l'enlèvement des poules réformées, tend à augmenter, laissant supposer une fragilisation du squelette des poules en fin d'élevage ce qui soulève une question de bien-être de l'animal.

Pour former la coquille de l'œuf, la poule exporte quotidiennement 10% de son calcium corporel en provenance du squelette et plus particulièrement de l'os médullaire des os longs (Nys and Guyot, 2011). L'allongement du cycle de ponte induit une sollicitation plus importante du squelette de la poule en fin d'élevage, ce qui pourrait également expliquer les coquilles plus fragiles. Pour confirmer cette hypothèse, il est nécessaire de pouvoir suivre l'évolution de la qualité du squelette au cours de la vie d'une poule et de la mettre en relation avec la qualité de la coquille. Cela suppose de mettre au point des méthodes non invasives qui permettraient d'obtenir des critères aussi pertinents que les méthodes actuelles (prélèvements d'os) pour évaluer la qualité du squelette. La tomographie s'impose comme une technologie de choix pour suivre la distribution de la densité minérale du squelette, en particulier en médecine humaine pour le diagnostic de l'ostéoporose. Elle s'avère actuellement très peu utilisée sur le modèle aviaire mais serait en mesure de mettre en évidence des dommages chez la poule pondeuse qui ne sont pas détectables avec des méthodes traditionnelles (ex: teneur en cendres). Il n'en reste pas moins que les informations obtenues par les différentes méthodes sont complémentaires et donnent une idée plus globale de la structure de l'os, des réserves minérales et de la résistance aux fractures.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux

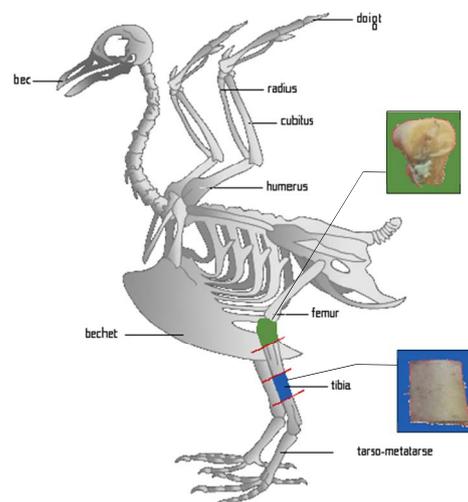
40 individus âgés de 86 à 87 semaines ont été sélectionnés dans une population de 634 poules pondeuses brunes, issues d'un élevage de sélection Novogen. Les poules ont été choisies de façon à constituer 2 groupes similaires en termes de taux de ponte ($\geq 95\%$), mais extrêmes en ce qui concerne les critères de force à la fracture (27,72N vs. 33,15N ; $p < 0,0001$) et déformation des coquilles (146,8N vs. 178,8N ; $p < 0,0001$).

Les 40 poules ont été abattues (plumées et vidées) pour analyse puis congelées à -20°C et anonymisées pour une analyse en aveugle.

1.2. Préparation des échantillons

48h avant analyse densitométrique, les spécimens sont déplacés dans un environnement à 4°C . Afin d'éviter une recongélation, les dissections ont été réalisées le lendemain de l'ostéodensitométrie. Après séparations des pattes et dissections des chairs, 2 échantillons de 2cm de long ont été prélevés sur chaque tibia. Un premier échantillon sur la partie centrale de la diaphyse et le second correspond à l'extrémité proximale (métaphyse + diaphyse) du tibia comme illustré sur la **Figure 1**.

Figure 1: Illustration du squelette de la poule et plans de coupe pour la préparation des échantillons. Sur fond vert, l'épiphyse distale et sur fond bleu, la diaphyse du tibia gauche.



Les 160 échantillons (80 diaphyses et 80 métaphyses) ont été fixés au paraformaldéhyde 4% pendant 5 jours à température ambiante puis lavés deux fois pendant 4h au tampon phosphate salin 1X avant d'être conservés dans l'alcool 70% à température ambiante.

1.3. Acquisitions radiographiques

Les analyses de densitométrie corps entier ont été réalisées sur un densitomètre Discovery (HOLOGIC). Afin de standardiser l'acquisition, et suivant les recommandations de l'équipementier, les poules entières ont été plongées dans un volume d'eau constant et scannées sur le mode petit animal. Les clichés ont été analysés via la solution logicielle du fabricant (Apex v4.6.0.2) afin de quantifier la composition corporelle des individus (DMO, masse grasse, masse maigre).

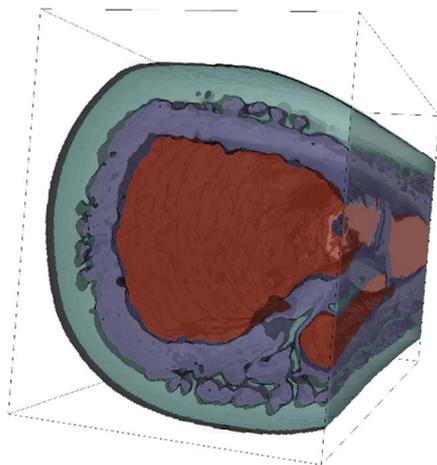
Chaque échantillon, une fois disséqué et fixé (épiphyse/métaphyse et diaphyse), a été imagé sur un

micro-scanner Skyscan 1072 (BRUKER) à 50kV avec un pas angulaire de 0,68°. La reconstruction tomographique a été réalisée via la solution logiciel du fabricant (NRecon v1.7.0.4) produisant des coupes de résolution isotrope à 19,88µm.

1.3. Analyse de la microarchitecture

Les scans 3D ont été analysés par des scripts automatiques afin d'éliminer tout problème de reproductibilité. On distingue deux phases d'analyse, dans un premier temps la segmentation des tissus qui permet d'identifier et de labéliser les voxels puis dans un second temps, la quantification de la microarchitecture osseuse.

Figure 3 : Visualisation 3D de la diaphyse et segmentation de l'os structurel (cyan), de l'os médullaire (pourpre) et de la moëlle osseuse (rouge). On observe une forte porosité sur la face interne de l'os cortical (visible dans la longueur).

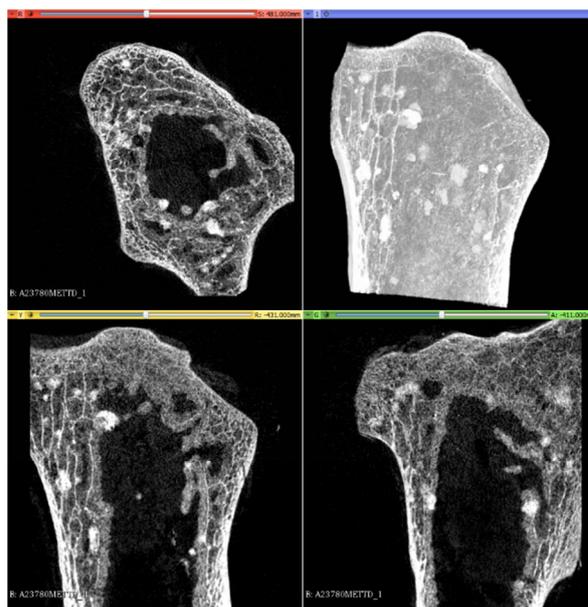


Sur les diaphyses, on distingue clairement trois niveaux d'intensité correspondant à la moëlle osseuse de faible densité, à l'os médullaire de densité moyenne et à l'os structurel de haute densité (**Figure 3**). En revanche, cette décomposition à trois niveaux n'a pas été possible sur les épiphyses où le seuil d'intensité entre os médullaire et os structurel n'est pas marqué. Ainsi, on se limitera à une décomposition tissus minéralisés / tissus mous pour ces échantillons. En l'absence d'unité quantitative standard de l'intensité des pixels et pour pallier aux différentes doses utilisées pour l'acquisition, les seuils ont été calculés automatiquement par minimisation de la variance intra-classe (Otsu, 1979).

La quantification des paramètres de microarchitecture a été réalisée selon les standards appliqués aux rongeurs (Bouxsein *et al.*, 2010), à savoir la densité minérale volumique ou fraction osseuse (BV/TV), la densité trabéculaire (Tb.N), l'épaisseur et l'espacement des travées (Tb.Th et Tb.Sp). Cependant, la notion d'os médullaire étant inexistante dans ce modèle, nous avons décomposé la notion d'os

(BV) en os structurel (sBV) et os médullaire (mBV) en se basant sur leur densité relative. De plus, un nouveau descripteur a été défini et quantifié, à savoir l'occupation médullaire (%Me), correspondant à la proportion de la cavité médullaire occupée par de l'os non-structurel. Les mesures volumiques ont été calculées directement par décompte des voxels tandis que les mesures d'épaisseur et d'espacement ont été calculé indirectement par la méthode du Mean Intercept Length (MIL) (Whitehouse, 1974; Vimort, McCormick and Paniagua, 2017) sous l'hypothèse d'un modèle de poutres (structures trabéculaires cylindriques).

Figure 2 : Plans de coupe d'une métaphyse proximale de tibia illustrant l'apparition de nodules de densité élevée constatée chez certains individus.



Enfin, l'observation des plans de coupe dans la longueur (plan sagittal/frontal) des métaphyses a montré l'apparition de structures anormales chez différents sujets formant des nodules aux nœuds des travées (**Figure 2**). Faute de précédent, ces nodules ont été gradées visuellement, 0 en cas d'absence totale, 1 si évidence géométrique sans condensation (nodule de densité homogène à l'épiphyse) et 2 pour la présence de nodules de densité supérieure au reste de l'épiphyse.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Toutes les analyses statistiques présentées dans la Table 1 ont été réalisées en aveugle quant à la nature des deux groupes étudiés (qualité de coquille). Les différences statistiques entre les groupes ont été mesurées par des tests de Student, Welch ou Mann-Whitney selon les paramètres des distributions.

Les mesures de composition corporelle (masse grasse, masse maigre) n'ont pas pu être exploitées car

biaisées par l'effilage des carcasses (présence de variations de $\pm 300\%$ sur les ratios de masse grasse selon les spécimens d'un même groupe). Les mesures de DMO corps entier n'ont pas permis de différencier les deux groupes montrant une constance dans la minéralisation globale du squelette des poules pondeuses quelle que soit la qualité des œufs.

Concernant les mesures spécifiques réalisées au tibia, il n'a pas été montré de différences significatives entre les membres droits et gauches dans la population étudiée. Les mesures à la diaphyse du tibia montrent un plus grand volume minéralisé (BV/TV +3%, p 0,01) chez le groupe à moindre qualité de coquille. La différenciation entre os structurel et médullaire permet de mettre en évidence une plus grande occupation médullaire (%Me +4%, p 0,02) chez ces individus sans variation significative de l'os structurel (sBV/TV +0,2%, p NS).

A l'épiphyse, on observe le même phénomène de VMO supérieur chez les poules ayant une faible qualité de coquille (BV/TV +2%, p 0,03). On observe une réduction de l'espacement des structures (Tb.Sp -28 μ m, p 0,05) sans que leur épaisseur (Tb.Th +22 μ m,

p NS) ou densité (Tb.N -0,2%, p NS) ne change significativement. Ce maillage plus resserré pourrait contribuer à une plus grande solidité de l'os.

La gradation semi-quantitative des nodules n'a pas montrée de différences significatives dans la fréquence d'apparition de ces structures parmi les deux groupes.

CONCLUSION

La DMO globale en fin de cycle de production ne semble pas corrélée à la qualité de coquille. Cependant, le détail des mesures spécifiques au tibia a permis de mettre en évidence des différences dans la répartition minérale des os longs chez les individus des deux groupes. Ces différences peuvent s'expliquer par une plus grande capacité à mobiliser l'os médullaire de la part des meilleures pondeuses. En effet, les différences de VMO et %Me au tibia (et par extension dans les os longs) témoignent d'une moindre quantité de minéral rapidement mobilisable chez les spécimens ayant maintenu une bonne qualité de coquille.

Tableau 1 : Résultats des mesures réalisées dans cette étude : mesures corps entier de densitométrie, mesures physiques des tibias disséqués et mesures numériques sur μ -scanner des paramètres osseux. Le groupe A représente le groupe ayant une faible qualité de coquille et le B celui ayant une qualité de coquille supérieure.

		Min.	1st Qu.	Median	Mean	3rd Qu.	Max.	P	
densitometry	BMC (gr)	A	42.450	44.850	47.230	51.140	56.670	76.170	0.46
		B	38.560	42.600	47.920	47.800	49.990	62.830	
		all	38.560	44.460	47.550	49.470	52.130	76.170	
	BMD (gr/cm ²)	A	0.279	0.297	0.304	0.324	0.346	0.452	0.66
		B	0.235	0.293	0.311	0.311	0.329	0.396	
		all	0.235	0.295	0.309	0.318	0.335	0.452	
dissection	We.T (gr)	A	11.890	13.100	13.260	13.730	14.230	15.830	0.34
		B	11.970	12.710	13.260	13.300	13.700	14.900	
		all	11.890	12.860	13.260	13.520	14.170	15.830	
	Ld.T (gr/cm)	A	0.983	1.077	1.109	1.130	1.183	1.318	0.25
		B	1.015	1.062	1.085	1.099	1.125	1.227	
		all	0.983	1.070	1.089	1.114	1.166	1.318	
μ CT diaphyses	BV/TV	A	57%	66%	69%	70%	73%	82%	0.03
		B	54%	62%	67%	67%	70%	92%	
		all	54%	65%	68%	68%	71%	92%	
	Me%	A	39%	47%	50%	52%	55%	76%	0.05
		B	34%	43%	48%	49%	54%	84%	
		all	34%	45%	49%	51%	55%	84%	
	Co/TV	A	24%	31%	36%	36%	38%	60%	0.77
		B	26%	31%	35%	36%	40%	54%	
		all	24%	31%	35%	36%	38%	60%	
	Me/TV	A	19%	29%	32%	34%	38%	58%	0.15
		B	23%	28%	31%	31%	34%	44%	
		all	19%	29%	31%	33%	36%	58%	
μ CT metaphyses	BV/TV	A	59%	67%	71%	71%	77%	82%	0.04
		B	56%	63%	69%	69%	75%	80%	
		all	56%	65%	70%	70%	75%	82%	
	Tb.N (px ⁻¹)	A	9.77E-03	1.37E-02	1.69E-02	1.65E-02	1.97E-02	1.97E-02	0.45
		B	9.60E-03	1.36E-02	1.60E-02	1.66E-02	1.80E-02	1.80E-02	
		all	9.60E-03	1.35E-02	1.62E-02	1.66E-02	1.93E-02	1.97E-02	
	Tb.Sp (px)	A	10.549	15.620	18.227	17.867	20.364	23.465	0.06
		B	13.788	17.589	19.758	19.287	21.037	26.815	
		all	10.549	16.089	18.712	18.568	20.956	26.815	
	Tb.Th (px)	A	26.593	33.929	45.018	46.107	52.770	52.770	0.41
		B	22.397	35.765	44.178	44.998	54.218	54.218	
		all	22.397	35.132	45.018	45.560	53.196	54.218	

Cependant, les faibles différences observées pourraient être expliquées par une mesure trop tardive dans le cycle de ponte. En effet, si la modification du contenu minéral avec une transition vers de l'os médullaire se fait dès le début de ponte, la calcification des nodules n'est pas observée avant 70 semaines (Whitehead, 2004). Ils pourraient constituer des indices de dégénérescence osseuse liée à la fin de cycle. Une analyse longitudinale serait nécessaire pour confirmer ces mécanismes et leurs différences inter-groupe et également identifier d'éventuels indicateurs précoces de bonne ou mauvaise qualité d'os et de coquille

Enfin, la micro-tomographie n'apporte qu'une idée relative de la densité minérale osseuse propre à chaque échantillon, ne permettant pas une

comparaison quantitative de leur composition exacte. Ainsi, la différenciation os structurel os médullaire pourrait être améliorée par une mesure quantitative de la DMO de ces tissus.

D'un point de vue pratique, une meilleure compréhension des mécanismes en jeu doit permettre d'identifier des solutions (sélection, nutrition, pratiques d'élevage...) permettant d'améliorer conjointement les qualités d'os et de coquille d'œufs.

REMERCIEMENTS

Les partenaires de cette étude souhaitent remercier Novogen pour avoir fourni le matériel biologique et les données de qualité d'œufs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bouxsein, M. L. *et al.* (2010) 'Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography', *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(7), pp. 1468–1486. doi: 10.1002/jbmr.141.
- Nys, Y. and Guyot, N. (2011) 'Egg formation and chemistry', *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products*. Woodhead Publishing, pp. 83–132. doi: 10.1533/9780857093912.2.83.
- Otsu, N. (1979) 'A Threshold Selection Method from Gray Level Histograms', *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics.*, 9(1), pp. 62–66. doi: 10.1109/TSMC.1979.4310076.
- Vimort, J., McCormick, M. and Paniagua, B. (2017) 'Computing Bone Morphometric Feature Maps from 3-Dimensional Images', *Insight Journal*, (January-December 2017), pp. 1–14. Available at: <http://www.insight-journal.org/browse/publication/988>.
- Whitehead, C. C. (2004) 'Overview of bone biology in the egg-laying hen', *Poultry Science*, 83(2), pp. 193–199. doi: 10.1093/ps/83.2.193.
- Whitehouse, W. J. (1974) 'The quantitative morphology of anisotropic trabecular bone', *Journal of Microscopy*, 101(2), pp. 153–168. doi: 10.1111/j.1365-2818.1974.tb03878.x.

ÉCOLOGIE MICROBIENNE DE LIGNES DE FABRICATION DE FOIES GRAS DE CANARD PASTEURISÉS

**Stella Planchon*, Benoît Budziszewski, Sandra Maisonnas, Barbara Nibouche, Flora
Guglielmi, Adeline Catillon, Stéphane André et François Zuber.**

CTCPA ; 449 Avenue Clément Ader, 84911 AVIGNON cedex 9

*Corresponding author : splanchon@ctcpa.org

RÉSUMÉ

L'écologie microbienne de lignes sur trois sites industriels (E1, E2, E3) a été étudiée lors de la fabrication de foie gras bloc avec morceaux pasteurisé. Cette étude a été réalisée par quantification des flores par microbiologie. En parallèle, une semi-quantification (qualification) a été menée par métagénomique globale (Méta 16S) et métagénomique ciblée pour les Clostridies. Les échantillons ont été prélevés par le CTCPA au cours de la transformation du FG pasteurisé : depuis l'éviscération jusqu'au traitement thermique.

Les flores lactiques et les flores anaérobies (inclus les clostridies) sont présentes dès l'entrée des lignes à l'éviscération et comprise entre < 10 et 10^3 UFC/g selon l'entreprise. Les flores lactiques et/ou anaérobies se développent ensuite aisément sur lignes de fabrication, notamment au niveau de la cutter, et augmentent jusqu'à une concentration maximale comprise entre 5 et 6 log UFC/g au niveau de l'emboitage pour E2 et E3 mais < 5 log UFC/g pour E1. Le cutterage à 30°C et le temps d'attente consécutif sont des étapes potentiellement à risque sur la ligne de fabrication car les flores se développent fortement et une concentration importante pourrait conduire à une sporulation. Une flore sporulée est détectée avec une occurrence variable mais faible, tout au long de la ligne de fabrication pour E2 et seulement au niveau de la cutter pour l'entreprise E1.

La qualification des flores par métagénomique globale n'a pas permis de détecter les clostridies avant traitement thermique : flores probablement en quantité très minoritaire dans les échantillons (entre 1 à 10 UFC/g), comparées aux bactéries lactiques. Avant traitement thermique, les flores rencontrées sont en entrée de ligne principalement des entérobactéries, remplacées progressivement par des bactéries lactiques : *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*... Après traitement thermique, les clostridies sont détectées par métagénomique globale, ou ciblée, avec comme espèces principales ou apparentées : *C. algidicarnis*, *C. estherteticum*, *C. tagluense*, *C. bowmanii*, *C. frigidicarnis*, *C. sordelii*. Certaines espèces présentent des potentialités d'altération, observées par approche challenge test dans une précédente étude. Ces analyses qualitatives et quantitatives permettent d'avoir une meilleure connaissance et donc une meilleure maîtrise des flores bactériennes en amont et en aval du traitement de pasteurisation, dans le but d'obtenir finalement une meilleure conservation des produits.

ABSTRACT

Microbial ecology of pasteurized duck foie gras processing lines

The microbial ecology of lines at three industrial sites (E1, E2, E3) was studied during the manufacture of pasteurized foie gras block with pieces. This study was carried out by quantifying the flora by microbiology. In parallel, a semi-quantification (qualification) was carried out by global metagenomics (Meta 16S) and targeted metagenomics for *Clostridia*. The samples were taken by the CTCPA during the processing of the pasteurized FG: from evisceration to heat treatment.

Lactic and anaerobic flora (including clostridia) are present at the evisceration step and range from < 10 to 10^3 CFU/g depending on the company. The lactic and/or anaerobic flora then easily develop on production lines, particularly at the cutter step, and increase to a maximum concentration of between 5 and 6 log CFU/g at the nesting level for E2 and E3 but < 5 log CFU/g for E1. Cuttering at 30°C and the subsequent waiting time are therefore risky steps on the production line because the flora develop strongly, and a high concentration could lead to sporulation. A sporulated flora is detected with a variable but low occurrence, throughout the production line for E2 and only at the level of the cutter for company E1. The qualification of species by global metagenomics did not allow clostridia detection before heat treatment: flora probably in a very small quantity in the samples (between 1 and 10 CFU/g), compared to lactic acid bacteria. Before thermal treatment, flora encountered are mainly *Enterobacteriaceae* at the beginning of the line, gradually replaced by lactic acid bacteria: *Carnobacterium*, *Pseudomonas fragi*, *Brochotrix thermosphacta*, *Lactobacillus sakei*. After thermal treatment, clostridia are detected by global or targeted metagenomics, with as main or related species: *C. algidicarnis*, *C. estherteticum*, *C. tagluense*, *C. bowmanii*, *C. frigidicarnis*, *C. sordelii*. Some species have alteration potential, observed by challenge test approach in a previous study. These qualitative and quantitative analyses allow a better knowledge and therefore a better control of bacterial flora before and after the pasteurization treatment, with the aim of finally obtaining a better conservation of the products.

INTRODUCTION

Le foie gras (FG) est produit majoritairement en Europe et plus particulièrement en France, avec 19 190 tonnes en 2012 (Données ITAVI 2013). Il est largement exporté en Union Européenne mais aussi hors UE. Cela représente une part économique importante pour le marché français.

Les flores d'altération des FG pasteurisés sont aujourd'hui bien connues du CTCPA. Au cours de ces dix dernières années, des foies gras de tous types, altérés ou sains, ont été analysés et deux études ont été récemment publiées (Matamoros S., 2010 ; Prévost S., 2013). Parmi les flores d'altération, se trouvent : (i) les clostridies psychrotrophes et (ii) les bactéries lactiques.

La détection de bactéries lactiques dans des produits pasteurisés indique : une recontamination survenue lors d'un reconditionnement post-pasteurisation, ou une perte d'étanchéité de l'emballage ; et/ou un barème de pasteurisation trop faible ; et/ou une augmentation excessive de la contamination de la matière première.

La présence de flores sporulées appartenant au genre *Clostridium* est principalement due à une contamination des matières premières ainsi qu'à leur survie sous forme sporulée (normale et attendue) au traitement de pasteurisation.

L'écologie microbienne de lignes de fabrication de FG n'a pas été étudiée à ce jour. Notre étude (projet collectif ECOFOG) a pour objectifs de répondre aux questions suivantes :

- ✓ Ces flores sont-elles présentes sur le FG dès l'entrée de la ligne de fabrication ?
- ✓ Est-ce qu'elles se développent au cours du process ou est-ce qu'elles restent sous forme sporulée pour les Clostridies ?
- ✓ Quelle est la charge microbienne rencontrée au cours de la transformation du FG pasteurisé, avant le traitement thermique ?
- ✓ Y a-t-il des étapes favorables à leur développement ou à leur accumulation au cours du process ?
- ✓ Les étapes de nettoyage/désinfection des lignes sont-elles efficaces contre ces flores ? (Les résultats du projet 2019 permettront de répondre sur ce dernier point).

Ces différents points permettraient d'acquérir une meilleure connaissance et donc une meilleure maîtrise des flores bactériennes en amont et en aval du traitement de pasteurisation dans le but d'obtenir *in fine* une meilleure conservation des foies gras pasteurisés.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Prélèvements sur ligne de fabrication

Les 3 entreprises partenaires (E1, E2, E3) ont été choisies sur la base de leur volontariat. Les prélèvements ont été réalisés à raison d'une entreprise par an (en période de pleine activité, en décembre). Les entreprises seront comparées pour voir s'il y a des spécificités en terme d'écologie microbienne de ligne, ou au contraire une similarité entre les entreprises.

Les échantillons ont été prélevés par le CTCPA à différentes étapes depuis l'éviscération jusqu'au traitement thermique pour le FG pasteurisé selon le diagramme de fabrication du foie gras de type « bloc avec morceaux » pasteurisé (Figure 1). Avant traitement thermique, les différents prélèvements concernent :

- L'éviscération (E1 et E3),
- La réception des FG cru (Entreprise E2), (l'abattoir n'étant pas sur le même site que la transformation)
- L'éveinage (manuel)
- Le barattage (avec assaisonnements, sous vide et à 4°C)
- Les différents types de FG entrant dans la cutter (FG congelés, stockés, frais, recyclés)
- Le cutterage (émulsion du bloc avec de l'eau chaude et assaisonnement, à 30°C)
- Les morceaux de FG
- L'emboitage (produit fini) : mûlée de FG issu du Cutterage plus les morceaux
- Boîte mère après pasteurisation en autoclave

À chaque étape de prélèvement ci-dessus, trois échantillons (triplicats) ont été prélevés et chaque échantillon est un mélange de plusieurs foies de l'étape concernée.

1.2. Analyses microbiologiques

Une quantité de 10 g de foie gras, est prélevée aseptiquement au centre du foie gras en cours de fabrication. Les échantillons ont été dilués au dixième dans de l'eau peptonée tamponnée. Après dilution, chaque sachet a été homogénéisé 1 min au stomacher. Des dilutions sérielles de la suspension mère sont préparées et étalées sur milieux gélosés.

Des dénombrements ont été effectués dans les milieux suivants en conditions d'aérobiose ou anaérobiose suivant les flores :

- (i) Milieu Man, Rogosa et Sharpe (MRS), recommandé pour le dénombrement des bactéries lactiques (en condition aérobiose) ;
- (ii) Milieu Plate Count Agar (PCA), utilisé pour la flore aérobie mésophile totale (en condition aérobiose) ;
- (iii) Milieu Viande Foie Sulfite-Réducteur (VFSR) modifié par ajout de 2g/l d'extrait de levure (en

condition d'anaérobiose), utilisé pour les Anaérobies Sulfito Réducteurs (ASR), et pour les spores de bactéries ASR dénombrées après traitement chimique (méthode interne).

Les dénombrements ont été réalisés après incubation à 25°C et 12°C en anaérobiose pour les bactéries anaérobies et les spores de bactéries anaérobies ; et à 30°C pendant 48 h pour la flore totale et les bactéries lactiques. A l'issue de l'incubation, toutes les colonies ont été dénombrées, et la couleur des colonies (blanches, grises ou noires) a été relevée.

1.3. Analyses de métagénomique

Une quantité de 50 g de FG a été utilisé pour réaliser l'extraction d'ADN des flores microbiennes présentes à l'aide du Kit Archive Pure® (GE Healthcare) avec des modifications. La pureté des ADN a été vérifiée par mesure d'absorbance à 230 et 260 nm. Les ADN extraits ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation pour l'amplification.

L'amplification PCR de la région V1- V3 de l'ADN ribosomal 16S a été réalisée par le laboratoire partenaire de l'Université de Liège en utilisant un protocole interne. Deux types de métagénomique ont été réalisées : une métagénomique globale permettant de mettre en évidence l'ensemble des flores et une métagénomique ciblée sur la population des Clostridies. Les résultats sont des abondances relatives correspondant à un nombre de groupement de séquences (OTU = Operational Taxonomic Unit) de l'espèce, du genre ou de la famille identifiée par rapport au nombre total d'OTU dans l'échantillon.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Quantification des flores au niveau de la ligne de fabrication par microbiologie :

Les flores lactiques et les flores anaérobies (inclus les clostridies) sont présentes dès l'entrée de la ligne à **l'éviscération ou à réception** (Figure 1).

Les concentrations à l'entrée de la ligne diffèrent légèrement entre les 3 entreprises et sont comprises en moyenne (Figure 2) :

- Entre 10E+01 et 10E+02 UFC/g pour l'entreprise 1,
- De 10E+02 à 10E+03 UFC/g pour l'entreprise 2,
- Entre < 10 et 10E+01 UFC/g pour l'entreprise 3

Pour les entreprises E1 et E3, l'abattoir est sur le même site alors que pour l'entreprise E2, l'abattoir est éloigné de 50 km du site de transformation. Par conséquent, le foie a été analysé à la salle de réception pour l'entreprise E2. Une concentration légèrement plus haute pour l'entreprise 2 est notée et est probablement due à l'effet transport entre le site de l'abattoir et le site de transformation des FG. Cette étape supplémentaire

peut permettre une légère croissance des flores même en conditions de réfrigération.

Au barattage, les flores lactique et anaérobies augmentent pour les entreprises 1 et 3 tandis qu'elles stagnent pour l'entreprise E2, seule entreprise pour laquelle les foies n'ont pas pu être prélevées à l'éviscération (Figure 2).

La flore lactique et/ou anaérobie augmente tout au long de la ligne de fabrication. Leur concentration varie entre 3 à < 5 log UFC/g à **l'étape de cutterage - réalisation de l'émulsion de bloc**, pour les entreprises E3 (taux le plus faible) et E1-E2, respectivement (Figures 1 et 2).

Les flores lactiques et anaérobies se développent de façon aisée sur lignes de fabrication, notamment au niveau de la cutter. Le cutterage est une étape favorable au développement des microorganismes notamment par rapport à la température qui se situe autour de 30°C (par ajout d'eau chaude) et compte tenu du temps d'attente qui peut être de 30 min à 2h après cutterage de l'émulsion de FG « chaud », avant traitement thermique. Lors de ces étapes (cutterage et attente avant traitement), les cellules arrivent à des concentrations élevées, la sporulation peut être déclenchée.

A l'emboitage, les flores sont comprises entre 5 et 6 log UFC/g excepté pour la flore lactique de l'entreprise E1 qui est inférieure à 4 log UFC/g. Puisque les flores lactiques sont capables de se développer sur le milieu utilisé pour les ASR et en condition d'anaérobiose, pour les entreprises E2 et E3, la flore lactique est égale à la flore anaérobie. En revanche, pour l'entreprise E1, la flore lactique est bien inférieure à la flore anaérobie (3,8 contre 5,1 log UFC/g), le différentiel serait donc de la flore véritablement anaérobie.

Concernant la flore sporulée, aucune spore n'a été détectée dans l'entreprise 1 excepté au niveau de la cutter mais le taux était très faible. Pour l'entreprise 2, la flore sporulée psychrotrophe a été détectée tout au long de la ligne de fabrication avec *Bacillus cereus* comme espèce principale avant et après traitement thermique mais elle n'a pas évolué. Pour l'entreprise 3, la présence de spores anaérobies à 12°C et 25°C est détectée sur 2/3 des échantillons à l'éveinage, au barattage et sur les FG crus stockés 1 jour, entrant dans l'étape de cutterage.

Après traitement thermique, toutes les flores analysées pour chacune des 3 entreprises sont inférieures au seuil de dénombrement.

2.2 Concernant la qualification des flores par métagénomique :

La métagénomique globale n'a pas permis de détecter les clostridies avant traitement thermique pour deux

des lignes étudiées. Ceci signifie qu'elles sont en quantité très minoritaire dans les échantillons (entre 1 à 10 UFC/g).

Les dénombrements en flores anaérobies correspondraient presque exclusivement à des bactéries lactiques dans certains cas, qui masqueraient les clostridies psychrotrophes.

La flore majoritaire identifiée en entrée de ligne est constituée d'entérobactéries et de bactéries lactiques dans les 3 entreprises étudiées.

Il y a une spécificité d'espèce majoritaire à l'emboitage pour chaque ligne :

- ✓ *Lactobacillus sakei* pour la première ligne,
- ✓ *Carnobacterium divergens* pour la deuxième ligne, et
- ✓ *Lactobacillus curvatus* pour la troisième entreprise.

Les flores lactiques se retrouvent majoritairement avant emboitage mais disparaissent après traitement thermique contrairement aux Clostridies qui persistent après pasteurisation. Ce résultat est cohérent car les bactéries lactiques sont des flores non sporulées thermosensibles et donc détruites par le traitement thermique. Contrairement aux Clostridies qui sont des flores sporulées résistantes au traitement de pasteurisation (Planchon S. et al, unpublished).

La métagénomique ciblée permet de détecter plus spécifiquement les clostridies avant traitement thermique. Des groupes de séquences (OTU) ont présenté des similarités avec les espèces *Clostridium algidicarnis*, *Clostridium frigidicarnis*, *Clostridium estertheticum* et *Clostridium tagluense*, espèce phylogénétiquement proche de *Clostridium bowmanii*. Les résultats montrent une diminution de leur abondance relative lors du procédé de fabrication du foie gras pour la ligne 1 et pour la ligne 2, une présence irrégulière de ces flores empêchant toute conclusion

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Guide des Bonnes Pratiques d'Hygiène relatif à la transformation et au conditionnement du foie gras pasteurisé, appertisé et du magret séché, fumé dans le secteur industriel. (Octobre 2014).

Situation de la production et du marché du foie gras, Source La Dépêche. Données ITAVI et autres (Octobre 2013).

Matamoros S., André S., Hue I., Prévost H., Pilet M.F. (2010). Identification of lactic acid bacteria involved in the spoilage of pasteurized "foie gras" products. *Meat Science* 85: 467-471

Planchon Stella *, Barbara Nibouche, Grégoire Cordier, Stéphane André, François Zuber. *En cours de publication*. Characterization and detection of *Clostridium algidicarnis* associated with spoilage of pasteurized foie gras.

Prévost S., Cayol J.L., Zuber F., Tholozan J.L., Remize F. (2013). Characterization of clostridial species and sulfite-reducing anaerobes isolated from foie gras with respect to microbial quality and safety. *Food Control* 32: 222-227.

sur celles-ci pour le moment avec néanmoins une présence plutôt détectée sur des échantillons de matière première stockés réfrigérée (et entrant dans le produit lors du cutterage).

CONCLUSION

Les résultats du projet ECOFOG montrent que la flore anaérobie et plus précisément l'espèce *Clostridium algidicarnis* proviendrait du foie éviscéré.

C. algidicarnis est actuellement la principale cause d'altération des foies gras pasteurisés, hors bactéries lactiques. Elle est responsable de la diminution de la DLC des produits. Elle n'est pas considérée comme pathogène mais les produits altérés sont impropres à la consommation et présentent une forte odeur (Planchon S. et al, unpublished).

Cette espèce présente une thermorésistance assez élevée parmi les spores d'espèces psychrotrophes avec une valeur de D (temps nécessaire pour éliminer un log de la population) à 95°C de 21 minutes pour une souche (Planchon S. et al, unpublished). Elle ne peut donc pas être détruite par la pasteurisation. Il est important d'agir en amont du traitement thermique.

Ces résultats devront être validés pour à terme mettre en place des moyens de maîtrise efficaces, c'est-à-dire ciblés aux bonnes opérations unitaires de ligne.

De plus, des travaux complémentaires vont débiter sur la partie de ligne plus en amont (abattoir) afin de déterminer la prévalence de *C. algidicarnis* sur le FG éviscéré et dans l'environnement d'abattage pour ainsi confirmer ou infirmer l'origine de la contamination.

Ces travaux ont été réalisés avec l'aide du CIFOG

Figure 1 : Diagramme de fabrication du foie gras pasteurisé

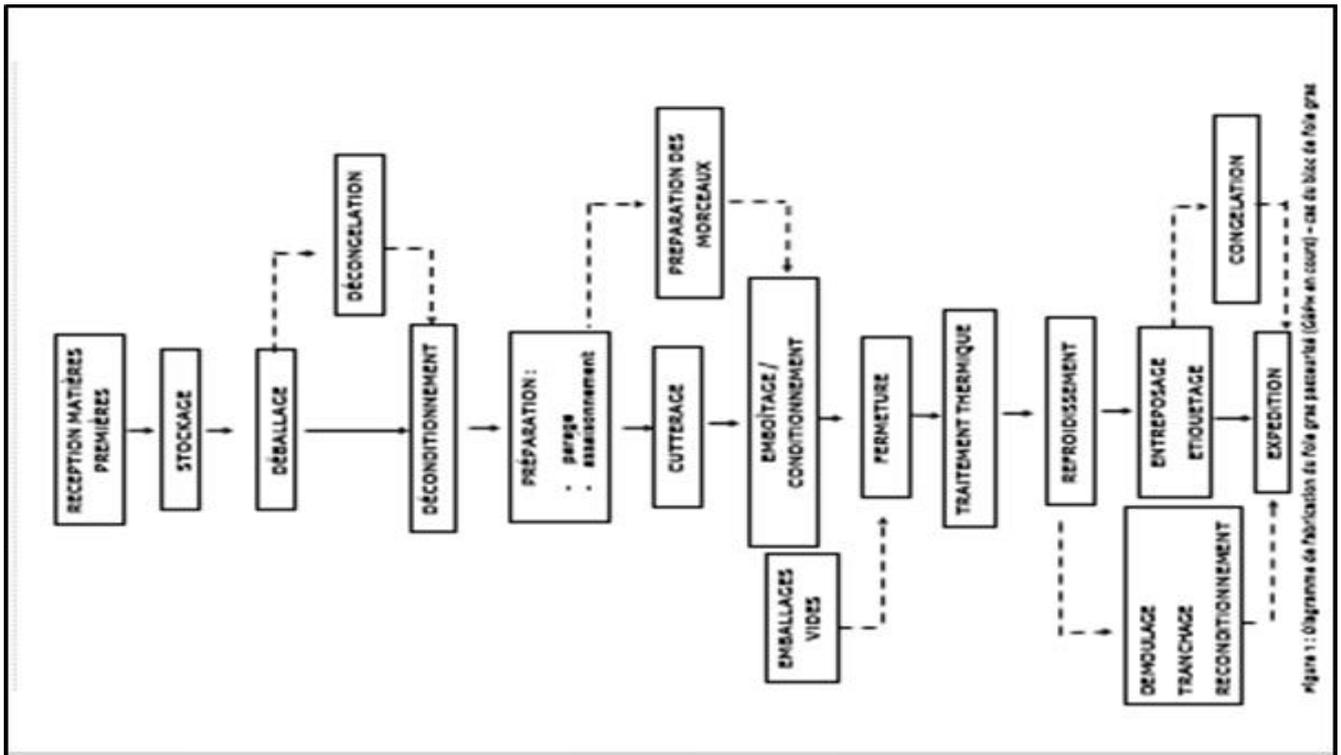
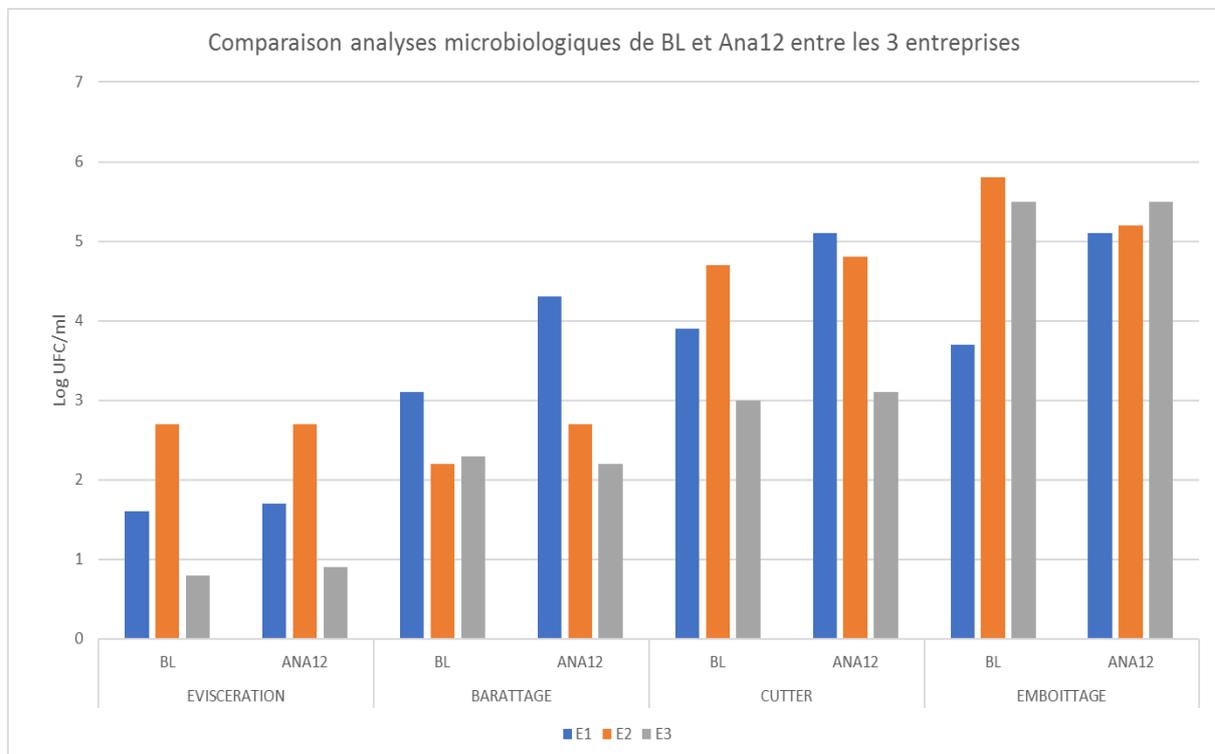


Figure 2. Comparaison des concentrations en flore lactique (BL) et Anaérobies à 12°C (Ana 12) des foies gras, dénombrées à différents points de prélèvement sur ligne, entre les 3 entreprises (E1, E2, E3)



LA CHEMERINEMIE ET L'ECHOGRAPHIE : DES INDICATEURS DE LA STEATOSE HEPATIQUE CHEZ LE CANARD ?

**Namya Mellouk¹, Christelle Ramé¹, Alix Barbe¹, Eric Venturi², Jean-Luc Touzé²,
Christophe Staub², Marie-Dominique Bernadet³, Pascal Chartrin⁴, Thierry Bordeau⁴,
Pascal Froment¹, Elisabeth Baeza⁴, Joëlle Dupont¹**

¹INRA, Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements PRC - 37380 NOUZILLY

²INRA, Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière UEPAO- 37380 NOUZILLY

³INRA, Unité Expérimentale Palmipèdes à Foie Gras UEFG- 40280 BENQUET

⁴INRA, Unité de Biologie des Oiseaux et Aviculture BOA- 37380 NOUZILLY

joelle.dupont@inra.fr

RÉSUMÉ

La chemerine est une adipocytokine exprimée et sécrétée par les adipocytes et les hépatocytes. Notre travail a consisté à déterminer la concentration plasmatique de chemerine et sa relation avec l'état d'engraissement hépatique chez le canard déterminé après imagerie et analyses biochimiques. L'échographie est devenue chez les mammifères une technique fiable et non invasive afin d'obtenir des indicateurs de l'engraissement ou de la croissance de différents organes. L'essai a été réalisé sur deux génotypes, les canards de Barbarie (n=36) et Pékin (n=36) dont les aptitudes à la stéatose hépatique diffèrent. Douze animaux par génotype ont été étudiés au début, au milieu et en fin de gavage. Le poids vif, l'aire du foie par échographie, son poids et sa teneur en lipides totaux (post-mortem), les concentrations plasmatiques en triglycérides (TG), cholestérol total (Chol), phospholipides (PL), glucose et en chemerine ont été mesurées à chaque stade. Au niveau du poids du foie, nous observons un effet significatif du génotype en faveur du Barbarie et du stade de gavage. Concernant les métabolites sanguins, le gavage augmente les taux de glucose, TG, Chol et PL (p<0,001). L'examen échographique des foies post-mortem montre que l'aire du foie estimée à la fin du gavage est corrélée avec le poids du foie après éviscération pour les canards Pékin (r=0,856 ; p<0.001) même si la relation n'est pas aussi bonne pour les canards Barbarie (r=0,415 ; p=0,140). La chemerine circulante augmente au cours du gavage seulement chez les Barbarie et non chez les Pékin. Chez les Barbarie, cette adipocytokine apparaît la plus corrélée avec les concentrations plasmatiques en TG (r=0,67 sur toute la période de gavage ou r=0,80 en fin de gavage). Une forte corrélation entre la concentration plasmatique de chemerine et la teneur en lipide (r= 0,67) ou en TG hépatique (r=0,73) est observée. En conclusion, la chemerine circulante semble être un bon marqueur de la stéatose hépatique chez les canards Barbarie. Enfin, l'échographie pourrait être un outil pour suivre l'évolution du foie au cours du gavage chez les canards Pékin.

ABSTRACT

Plasma chemerin and ultrasound scanning as indicators of hepatic steatosis in ducks?

Chemerin is an adipokine expressed and secreted by adipocytes and hepatocytes. Ultrasound scanning is a reliable and non-invasive technique to obtain indicators of fattening or growth of different organs in mammals. Our work consisted in analyzing the chemerin plasma concentration and its relation with the hepatic fattening status in the duck as determined after imaging and biochemical assays. The protocol was performed on two genotypes, Muscovy (n = 36) and Pekin (n = 36) ducks that have different hepatic steatosis abilities. Twelve animals per genotype were studied before, in the middle and at the end of force-feeding. Live body weight, liver area by ultrasound, weight and total lipid content (post-mortem), plasma triglyceride (TG), total cholesterol (Chol), phospholipid (PL), glucose, and chemerin levels were measured at each stage. In terms of liver weight, we observed a significant effect of the genotype in favor of Muscovy genotype and the stage of force-feeding. For blood metabolites, the force-feeding increased plasma glucose, TG, Chol, and PL levels (p < 0.001). Livers post-mortem ultrasound examination showed that the estimated liver area at the end of the gavage was correlated with the weight of the liver after evisceration for Pekin ducks (r = 0.856, p = 0.0002) even if the relationship was not as strong for Muscovy ducks (r = 0.415, p = 0.1395). The circulating chemerin increased during force feeding only in Muscovy and not in Pekin. In Muscovy, this adipokine was the most correlated with TG plasma concentrations (r = 0.67 over the entire period of force-feeding and r = 0.80 at the end of gavage). Strong relationships between plasma concentration of chemerin and lipid content (r = 0.67) or hepatic TG (r = 0.73) were observed. In conclusion, circulating chemerin could be a good marker of hepatic steatosis in Barbarie ducks. Finally, ultrasound could be a tool to follow the evolution of the liver during force-feeding in Pekin ducks.

INTRODUCTION

Chez les oiseaux, le foie est le site principal de la lipogenèse de novo (Léveillé et al 1975). Comme chez les mammifères, la synthèse des acides gras dépend de la disponibilité de précurseurs glucidiques alimentaires. Elle est donc fortement stimulée en période de gavage chez les palmipèdes à gaver. Chez ces derniers animaux, le foie gras résulte d'une stéatose hépatique d'origine nutritionnelle, hypertrophique et réversible (Labie et al., 1970). La stéatose hépatique est caractérisée par une accumulation de triglycérides dans les hépatocytes. Sa réversibilité chez les palmipèdes à gaver prouve l'origine non pathologique de cet état physiologique particulier (Bénard et al., 1998 ; Babilé et al., 1996). Néanmoins, la susceptibilité au gavage entraîne différents stades de développement de la stéatose et varie non seulement entre les espèces (canards contre oies par exemple) mais également entre les différentes espèces respectives (Chartrin et al., 2006). Quelques espèces ont tendance à stocker un excès de graisse, principalement dans leur tissu adipeux et leur foie (canards Pékin ou *Anas platyrhynchos* et canards de Barbarie ou *Cairina moschata*).

Récemment, Cobo et al (2015) ont montré que l'échographie serait un moyen non invasif de prédiction de l'épaisseur du tissu adipeux et des caractéristiques pondérales du foie (Cobo et al., 2015) chez le canard mulard. D'autre part il existe encore aujourd'hui pour une même espèce une grande variabilité du poids des foies après gavage et donc de la stéatose hépatique. Ainsi, identifier des biomarqueurs ainsi que des indicateurs non invasifs de la stéatose hépatique chez le canard à gaver permettrait de : i) sélectionner des animaux pour l'homogénéité des réponses au pré-gavage et au gavage, ii) d'individualiser la conduite de la bande de gavage selon le degré de stéatose et iii) d'adapter la durée moyenne du gavage en fonction de la conduite d'élevage et de la courbe de gavage.

Chez l'homme, la concentration plasmatique ainsi que l'expression hépatique d'une adipocytokine appelée chemerine sont augmentées dans le cas de stéatose hépatique non alcoolique (Krautbauer et al., 2013). La chemerine est une adipocytokine pro-inflammatoire exprimée et sécrétée majoritairement par les adipocytes et les hépatocytes chez les mammifères. Elle a été initialement impliquée dans la régulation du système immunitaire, de l'adipogenèse et du métabolisme énergétique (Reverchon et al., 2015). Chez le poulet, notre laboratoire a montré une relation négative entre les concentrations de chemerine plasmatique et l'engraissement périphérique des animaux (Mellouk et al., 2018a). Pour agir au niveau cellulaire, la chemerine est capable de se fixer sur trois récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G

: CMKLR1 (chemokine like receptor 1 aussi connu sous les noms chemR23), GPR1 (G protein-coupled receptor 1) et CCRL2 (C-C chemokine receptor-like 2) (Mattern et al., 2014 ; Fatima et al., 2014). Aucun dosage plasmatique et aucune mesure d'expression dans le foie de la chemerine et de ses récepteurs n'ont été réalisés chez le canard gavé.

Les objectifs de notre projet ont donc été de déterminer le profil plasmatique ainsi que l'expression de la chemerine et de ses récepteurs dans le foie et dans le tissu adipeux en début, au milieu et en fin de gavage de deux espèces de canards présentant une stéatose hépatique différente, le canard de barbarie et le canard pékin. Des corrélations ont ensuite été réalisées entre ces données et le poids du foie et les concentrations plasmatiques et hépatiques des triglycérides. D'autre part, nous avons également effectué des mesures individuelles post-mortem de développement du foie au cours du gavage par échographie afin de déterminer si l'imagerie pourrait être un bon outil pour suivre l'évolution de la stéatose hépatique.

1. MATERIELS ET METHODES

Le protocole mis en place a reçu un avis favorable par le comité d'éthique en expérimentation N° 73 sous le numéro APAFIS#6593-2017062015599427 v1.

1.1. Les animaux

50 canards de Barbarie mâles et 50 canards Pékins mâles choisis parmi les espèces parentales du canard mulard utilisé pour le gavage ont été élevés de façon conventionnelle avec une préparation au gavage. La phase expérimentale concerne le gavage et l'abattage des animaux où seront réalisés différents échantillonnages de tissus.

1.2. Modalités d'élevage des animaux

Durant la phase de démarrage (0 à 4 semaines), les animaux ont été nourris *ad libitum* avec un aliment de type commercial (Barbarie : Aliment PALMA 07 aliment préstarter puis aliment PAG 1301, Pékin : aliment PAG 1301). Durant la phase de croissance (4 à 8 semaines) les animaux ont été nourris *ad libitum* et c'est seulement durant la phase de finition (8 -12 semaines) qu'ils ont été soumis à un rationnement horaire à raison d'une heure par jour. De 4 à 12 semaines, l'aliment D1320 est utilisé pour les deux génotypes.

1.3. Gavage

38 canards par espèce ont été mis en gavage. Celui-ci a été pratiqué en cages collectives. Les canards ont été répartis dans la salle de façon à alterner les 2 espèces. Les canards ont été gavés selon la même courbe de gavage. La durée de gavage est de 23 repas. Les canards ont été tous gavés par la même personne. L'aliment de gavage utilisé est composé de 62 % de

MS (26 % maïs grain, 36 % de farine (Palma 146, Maïsador)) et 38 % d'eau. Toutes les quantités d'aliment distribuées ainsi que les refus ont été pesés.-

1.4. Mesures expérimentales, prélèvements et sacrifices

Les animaux ont été abattus à 3 stades : en début de gavage à J1 (avant le premier repas de gavage, n=12 par génotype), au milieu du gavage à J7 (avant le 12ème repas, n=12 par génotype) et en fin de gavage à J13 (le lendemain matin après le dernier repas, n=12 par génotype). Avant abattage, une pesée (poids vif) puis une prise de sang réalisée au niveau du sinus occipital sont effectuées. Après centrifugation (3000 Tr/ min, 4°C, 10 min), le plasma a ensuite été collecté puis conservé à -20°C. Les animaux sont ensuite étourdis par électroanesthésie bi-temporale et saignés, environ 12 h après le dernier repas. L'état de l'engraissement et le volume du foie sont estimés par échographie. L'acquisition des images échographiques a été effectuée avec un échographe Esaote-Piemedical de type MyLab30 Vet Gold muni d'une sonde linéaire 10-18 Mhz de type LA435 (Hospimed France, Valdampierre, France) (Cobo et al., 2015). Une mesure individuelle du poids du foie et du tissu adipeux abdominal (gras situé dans la cavité abdominale, autour du gésier et du pro-ventricule) est réalisée. Un échantillon de foie (grand lobe) et de tissu adipeux abdominal est prélevé puis congelé dans l'azote puis stocké à -80°C.

1.5. Dosages plasmatiques (triglycérides, cholestérol total, phospholipides, glucose et chemerine)

Les concentrations plasmatiques en triglycérides, cholestérol total, phospholipides et glucose ont été quantifiées par des méthodes enzymatiques colorimétriques à l'aide d'un analyseur Konelab 20 (Thermo Scientific, Gometz le Châtel, France) et kits fournis par Bio-Mérieux (Marcy-l'Étoile, France), Sobioda (Montbonnot, France) et Thermo Scientific (Villebon sur Yvette, France). Les concentrations plasmatiques de chemerine ont été obtenues après mis au point d'un kit ELISA spécifique canard de chez BlueGene (E12V0003 sensibilité 1ng/mL). Les mesures ont été effectuées selon le protocole du fabricant. La densité optique a été mesurée à 450 nm puis rapportée à une gamme étalon de référence.

1.6 Dosages des lipides totaux dans le foie

Les lipides totaux dans le foie ont été extraits selon la méthode classique de Folch comme décrit dans Mellouk et al., 2018.

1.7. Mesure de l'expression transcriptionnelle de la chemerine et de ses trois récepteurs dans le tissu adipeux abdominal et le foie.

L'ARN total des différents tissus (tissu adipeux abdominal, et foie) a été extrait par homogénéisation dans le réactif TRIzol® à l'aide d'un Ultraturax selon les recommandations du fabricant (Invitrogen™ par Life technologies™, Villebon sur Yvette, France). La PCR en temps réel a été réalisée à partir d'ADNc généré comme décrit par Mellouk et al (2018). Les échantillons ont été testés en double sur la même plaque selon le processus suivant : après une incubation de 2 minutes à 50 ° C et une étape de dénaturation de 10 minutes à 95 ° C, les échantillons ont été soumis à 40 cycles (30 secondes à 95 ° C, 30 secondes à 60 ° C, 30 secondes à 72 ° C). Les niveaux d'expression d'ARN messager ont été normalisés à trois gènes de référence (beta actine, GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) et EEF1 (Elongation factor 1-alpha 1)). Pour chaque gène, l'abondance relative de transcription a été déterminée par le calcul de e^{-Ct} , puis l'expression relative du gène d'intérêt est rapportée à l'expression relative des gènes de référence.

1.8. Mesure de l'expression protéique de la chemerine dans le plasma par western blot.

Cinq microlitres de plasma sont repris dans du tampon Laemmli 5X contenant du β -mercaptoéthanol, chauffés à 95°C, puis soumis à une électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide à 12% en conditions dénaturantes. Les protéines sont alors transférées sur membrane de nitrocellulose (Schleicher and Schuell) pendant 1h30 à 80V. Les membranes sont ensuite incubées dans une solution de TBS-Tween contenant 5% de lait (saturation des sites non spécifiques) puis incubées la nuit à 4°C avec du TBS-Tween contenant l'anticorps primaire anti chemerine (Agrobio, La Ferté-Saint-Aubin, France). Le lendemain, les membranes sont lavées puis incubées 2 heures à température ambiante dans une solution de TBS-Tween contenant l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Après lavages, le signal est détecté selon le principe de chemiluminescence, le substrat de la peroxydase, le réactif ECL (Enhanced Chemiluminescence, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) est déposé sur la membrane. Le signal émis est détecté grâce à une GBox de SynGene (Ozyme) en utilisant le logiciel GenSnap (Release 7.09.17). La quantification a été réalisée avec le logiciel GeneTools (Release 4.01.02).

1.9. Analyses statistiques

Les résultats sont représentés sous forme de moyenne \pm SEM et avec un niveau de significativité inférieur à 0,05. Un test ANOVA (analyse de variance) a été utilisé selon un modèle à deux effets (espèce et stade de gavage) avec interaction (espèce * stade de gavage). Puis un test de comparaison de moyenne a été effectué pour comparer les moyennes des différents paramètres analysés entre les deux espèces de canard étudiés pour chaque date d'abattage et au

cours du gavage (début, milieu et fin). Lorsque l'interaction (espèce * stade de gavage) est significative, des lettres différentes indiquent une différence significative (tableau 1 et 2). Un test de Pearson a été utilisé pour les analyses de corrélation entre les différents paramètres. Le logiciel Statview (version 8) a été utilisé pour toutes les analyses.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Consommation et poids en gavage et composition corporelle à l'abattage

Les canards abattus à mi-gavage ont tous consommé 2 655 g d'aliment. Les canards de Barbarie et Pékin abattus en fin de gavage ont consommé 6817 g et 6825 g, respectivement. Que cela soit à la mise en gavage, au milieu ou en fin de gavage, le poids corporel et le poids du foie sont plus importants chez les canards de Barbarie que chez les canards Pékin ($p=0,001$, Tableau 1). A l'opposé, le pourcentage de gras abdominal par rapport au poids vif est plus important chez les canards Pékin par rapport aux canards de Barbarie (Tableau 1).

2.3. Effet de l'espèce et du stade de gavage sur les métabolites sanguins.

Concernant la glycémie, elle augmente significativement en fin de gavage à la fois chez les canards de Barbarie et les canards Pékin ($p=0,003$) (Tableau 1). Un effet de l'espèce en faveur des canards de Barbarie a été observé surtout en début de gavage ($p=0,001$). Les taux plasmatiques de triglycérides augmentent au cours du gavage (effet du stade de gavage $p=0,001$) et ceci est d'autant plus important chez les canards Pékin en fin de gavage (effet génotype $p=0,01$, Tableau 1). Chez les deux espèces, une augmentation significative des taux plasmatiques de cholestérol total et de phospholipides au cours du gavage (effet stade de gavage $p=0,001$) est observée. Pour ces deux métabolites, un effet de l'espèce en faveur des canards Pékin est noté dès le début de gavage ($p=0,001$, Tableau 1). Cet effet perdure tout au long du gavage ($p=0,001$).

2.4. Effet de l'espèce et du stade de gavage sur les teneurs en lipides du foie

Dans le foie, la teneur en lipides totaux augmente au cours du gavage ($p=0,001$) à la fois chez les canards de Barbarie et les canards Pékin (Tableau 1). Cependant aucun effet de l'espèce n'est observé ($p>0,05$).

2.5. Effet de l'espèce et du stade de gavage sur les concentrations plasmatiques de la chemerine : corrélations avec les teneurs plasmatiques et tissulaires en lipides

Après dosage ELISA, nous montrons que la chemerine plasmatique augmente significativement au cours du gavage seulement chez les canards de Barbarie ($p<0,001$) et non chez les canards Pékin

($p=0,18$, non montré). Chez les canards de Barbarie, cette augmentation est significative entre les stades milieu et fin de gavage ($p<0,001$), là où la stéatose hépatique est la plus importante (Tableau 1). Ces résultats ont été confirmés par western-blot à l'aide d'un anticorps monoclonal de chemerine aviaire produit par notre laboratoire en collaboration avec Agrobio (Mellouk et al, 2018). Chez les canards de Barbarie, cette adipocytokine apparaît la plus corrélée avec les concentrations plasmatiques en triglycérides ($r=0,67$, $p<0,0001$) sur toute la période de gavage ou ($r=0,80$, $p<0,0001$) en fin de gavage, une forte relation entre les concentrations plasmatiques de chemerine et la teneur en lipide hépatique ($r=0,67$, $p<0,0001$) est observée.

2.6. Effet de l'espèce et du stade de gavage sur l'expression de la chemerine et de ses récepteurs dans le foie et le tissu adipeux

Au niveau de l'expression tissulaire de la chemerine (RARRES2) et de ses récepteurs (CMKLR1, GPR1 et CCRL2), des effets variables ont été observés au niveau de l'espèce et du stade de gavage (Tableau 2). Contrairement à ce qui est observé au niveau plasmatique, l'expression du transcrite de la chemerine diminue au cours du gavage dans le foie et le tissu adipeux des canards de Barbarie et des canards Pékin. A l'inverse l'expression des récepteurs a tendance à augmenter au cours du gavage. Un effet de l'espèce est observé sur l'expression la chemerine et ses récepteurs dans le foie et le tissu adipeux, à l'exception du GPR1 dans le foie. De façon intéressante, dans le foie, l'expression de la chemerine apparaît très corrélée négativement avec la teneur hépatique en lipides totaux ($r=-0,637$, $p<0,001$).

2.6. Mesures échographiques réalisées au cours du développement du tissu adipeux et du foie et dans les deux espèces

Le gras dorsal mesuré par échographie est hautement corrélé au poids du gras abdominal mesuré après éviscération ($r=0,697$ pour les canards Pékin ; $r=0,706$ pour les canards de Barbarie), ce paramètre étant lui-même corrélé au poids du foie ($r=0,804$ pour les canards Pékin; $r=0,806$ pour les canards Barbarie). Enfin, il est important de noter que l'aire du foie mesurée par échographie à la fin du gavage est corrélée avec le poids du foie après éviscération pour les canards Pékin ($r=0,867$) même si la relation n'est pas aussi bonne pour les canards Barbarie ($r=0,417$).

DISCUSSION-CONCLUSIONS

En conclusion, nos travaux montrent que la chemerine circulante pourrait être un bon marqueur de la stéatose hépatique chez le canard de Barbarie comme cela a pu être décrit chez l'homme. Enfin, même si les expériences ont été réalisées post-mortem, l'échographie pourrait être un outil pour suivre l'évolution du foie au cours du gavage surtout chez le

canard Pékin. Des mesures plasmatiques de chemerine sur le canard mulard, un hybride entre le canard Pékin et le canard de Barbarie, le canard le plus répandu dans les fermes d'élevage françaises pour produire un foie gras, sont actuellement en cours. D'autre part, des mesures d'échographies sur animal vivant sont aussi à l'étude sur cette espèce.

Les auteurs remercient le département PHASE pour le financement de ce travail (crédit incitatif Adinnovant).

REMERCIEMENTS

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Babilé R, Auvergne A, Andrade V, Héraud F, Bénard G, Bouillier-Oudot M, Manse H. Réversibilité de la stéatose hépatique chez le canard mulard. 1996. In: 2èmes Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras. Bordeaux, France. 107-110.

Baéza E, Jégou M, Gondret F, Lalonde-Martin J, Tea I, Le Bihan-Duval E, Berri C, Collin A, Métayer-Coustard S, Louveau I, Lagarrigue S, Duclos MJ. Pertinent plasma indicators of the ability of chickens to synthesize and store lipids. *J Anim Sci*. 2015 Jan;93(1):107-16.

Bénard G, Bénard P, Prehn D, Bengone T, Jouglar J.Y, Durand S. 1998. Démonstration de la réversibilité de la stéatose hépatique obtenue par gavage de canards mulards. Etude réalisée sur trois cycles de gavage-dégavage. 1998. In: 3èmes Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras. Bordeaux, France. 49-52.

Chartrin P, Bernadet MD, Guy G, Mourot J, Hocquette JF, Rideau N, Duclos MJ, Baéza E. Does overfeeding enhance genotype effects on liver ability for lipogenesis and lipid secretion in ducks? *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2006 Nov;145(3):390-6.

Cobo E, Molette C, Touze J.L, Venturi E, Bernadet M.D, Staub C. Mise en place d'une méthodologie en imagerie pour prédire des caractères de production chez les palmipèdes à foie gras. 2015. In: 11èmes Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras. Tours, France. p 1234-1238.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226(1):497-509

Krautbauer S, Wanninger J, Eisinger K, Hader Y, Beck M, Kopp A, Schmid A, Weiss TS, Dorn C, Buechler C. Chemerin is highly expressed in hepatocytes and is induced in non-alcoholic steatohepatitis liver. *Exp Mol Pathol*. 2013 Oct;95(2):199-205.

Labie C, Tournut J. Recherches sur les modifications histologiques et biochimiques chez les oies soumises au gavage. *Cah. Méd. Vét*. 1970 ; 39, 247-261.

Leveille GA, Romsos DR, Yeh Y, O'Hea EK. Lipid biosynthesis in the chick. A consideration of site of synthesis, influence of diet and possible regulatory mechanisms. *Poult Sci*. 1975 Jul;54(4):1075-93.

Mellouk N, Ramé C, Delaveau J, Rat C, Maurer E, Froment P, and Dupont J. 2018. Adipokines expression profile in liver, adipose tissue and muscle during chicken embryo development. *Gen Comp Endocrinol*. 2018a Oct 1;267:146-156.

Mellouk N, Ramé C, Delaveau J, Rat C, Marchand M, Mercierand F, Travel A, Brionne A, Chartrin P, Ma L, Froment P, Dupont J. Food restriction but not fish oil increases fertility in hens: role of RARRES2? *Reproduction*. 2018b Apr;155(4):321-331.

Reverchon M, Ramé C, Dupont J. [Chemerin: a pro-inflammatory adipokine involved in the reproduction function?]. *Med Sci (Paris)*. 2015 May;31(5):493-8. doi: 10.1051/medsci/20153105010. Epub 2015 Jun 9. Review. French.

Tableau 1. Effet du stade de gavage et de l'espèce sur le poids vif, le poids du foie, le poids du gras abdominal et les concentrations plasmatiques de glucose, triglycérides, cholestérol, phospholipides et de chemerine. Lorsque l'interaction (espèce * stade de gavage) est significative, des lettres différentes indiquent une différence significative.

	Barbarie			Pékin			Effet Espèce (E)	Effet Stade gavage (Gav)	Interaction E*Gav
	Début	Milieu	Fin	Début	Milieu	Fin			
Poids Vifs (kg)	5883 ± 269	6265 ± 219	6896 ± 405	4170 ± 314	4592 ± 271	6255± 319	<0,001	<0,001	0,92
Poids du foie (g)	156 ± 30 ^c	255 ± 25 ^b	532 ± 74 ^a	81 ± 18 ^d	150 ± 26 ^c	296 ± 74 ^b	<0,001	<0,001	<0,001
Poids du gras abdominal (g)	110 ± 24	127 ± 33	203 ± 47	110 ± 23	143 ± 17	198 ± 25	0,57	<0,001	0,40
Teneur en lipides totaux du foie (g/L)	8,73 ± 2,20	35,23 ± 6,65	52,92 ± 20,15	11,44 ± 6,17	29,71 ± 6,93	51,00± 6,93	0,56	<0,001	0,45
Glucose plasmatique (g/L)	2,57 ± 0,44	2,43 ± 0,42	2,79 ± 0,30	1,94 ± 0,24	2,18 ± 0,15	2,43± 0,56	<0,001	0,003	0,22
Triglycérides plasmatiques (g/L)	1,72 ± 0,98 ^a	3,40 ± 0,95 ^b	4,59 ± 1,32 ^c	1,60 ± 0,86 ^a	3,34 ± 1,25 ^b	6,37± 1,72 ^c	0,07	<0,001	0,01
Cholestérol plasmatique (g/L)	1,34 ± 0,14	1,69 ± 0,23	2,00 ± 0,38	2,04 ± 0,16	2,37 ± 0,36	3,20± 1,36	<0,001	<0,001	0,25
Phospholipides plasmatiques (g/L)	2,02 ± 0,32	2,59 ± 0,31	2,73 ± 0,51	2,83 ± 0,24	3,28 ± 0,49	4,12± 1,05	<0,001	<0,001	0,07
Chemerine plasmatique (µg/L)	936,70 ± 39 ^a	1108,80 ± 34 ^b	1557,10 ± 79 ^c	886,60 ± 68 ^{a,d}	967,83 ± 95 ^{a,b}	766,30 ± 39 ^d	0,0005	<0,001	<0,001

Tableau 2 : Effet du stade de gavage et de l'espèce sur l'expression du transcrit de la chemerine (RARRES2) et de ses récepteurs (CMLKR1, GPR1 et CCL2) dans le foie et le tissu adipeux. Lorsque l'interaction (espèce * stade de gavage) est significative, des lettres différentes indiquent une différence significative.

	Espèce	Barbarie			Pékin			P-value			
		Stade de gavage	Début	Milieu	Fin	Début	Milieu	Fin	E	Gav	E*Gav
Foie	<i>RARRES2</i>		0,20±0,03	0,10±0,02	0,03±0,01	0,12±0,02	0,08±0,02	0,03±0,001	0,02	<0,001	0,07
	<i>CMKLRI</i>		0,08±0,03 ^a	0,08±0,01 ^a	0,13±0,01 ^b	0,002±0,001 ^c	0,009±0,004 ^d	0,004±0,001 ^c	<0,001	0,033	0,025
	<i>CCRL2</i>		0,12±0,02 ^a	0,28±0,04 ^b	1,32±0,19 ^c	0,17±0,04 ^a	0,29±0,06 ^b	0,69±0,1 ^d	0,01	<0,001	0,0003
	<i>GPR1</i>		11,54±1,96 ^a	63,02±14,49 ^b	17,38±4,76 ^{ad}	5,25±0,75 ^c	22,27 ±4,63 ^d	54,18±7,52 ^b	0,58	<0,001	<0,001
Tissu adipeux	<i>RARRES2</i>		0,08±0,02 ^a	0,03±0,00 ^b	0,02±0,001 ^b	0,45±0,15 ^c	0,10±0,04 ^a	0,03±0,01 ^b	0,005	0,0005	0,01
	<i>CMKLRI</i>		0,001±0,0001 ^a	0,071±0,01 ^b	0,099±0,01 ^b	0,002±0,001 ^a	0,001±0,001 ^a	0,003±0,001 ^a	<0,001	<0,001	<0,001
	<i>CCRL2</i>		0,20±0,04	0,62±0,10	1,15±0,19	0,15±0,06	0,23±0,05	0,65±0,10	<0,004	<0,001	<0,08
	<i>GPR1</i>		1,64±0,44 ^a	4,06±0,78 ^b	4,02±0,86 ^b	1,26±0,35 ^a	0,78±0,16 ^a	3,74±0,75 ^b	0,018	0,002	0,02

IMPACT DES MESURES DE REDUCTION DES ANTIBIOTIQUES SUR LA PRESENCE DE RESIDUS DANS LES MUSCLES DE VOLAILLES ET LES ŒUFS

Roudaut Brigitte¹, Hurtaud Pessel Dominique¹, Gaudin Valérie¹

¹ANSES – Laboratoire de Fougères, 10 B rue Claude Bourgelat Javené CS 40608 - 35306
FOUGERES Cedex – FRANCE

brigitte.roudaut@anses.fr

RÉSUMÉ

Dans le contexte actuel de promotion d'un usage prudent et raisonné des antibiotiques pour réduire les risques d'antibiorésistance (Plan EcoAntibio 2017 piloté par le ministère de l'Agriculture), l'accent est mis en élevage sur le bon usage de ces médicaments au niveau des différentes filières animales. Dans la filière avicole, des efforts collectifs ont été réalisés puisque l'exposition des volailles en termes d'indicateur ALEA (Animal Level of Exposure to Antimicrobials) a diminué de 43 % entre 2016 et 2011. Une diminution de l'usage de l'aliment médicamenteux a également été constatée. La surveillance des résidus de médicaments vétérinaires est régie par des plans nationaux de contrôle des résidus (directive 96/23/CE). Le contrôle à l'abattage concerne principalement le contrôle ciblé des substances autorisées et de certaines substances interdites. En France, une partie du programme de contrôle des antibiotiques est actuellement assuré par une méthode innovante multi-antibiotiques utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse et validée selon les critères européens en la matière. Cette stratégie est maintenant mise en œuvre depuis 6 ans au niveau des laboratoires officiels d'analyse. Pour le dépistage des antibiotiques dans les œufs, une méthode innovante basée sur un biocapteur optique est actuellement utilisée.

Un bilan de l'évolution des résultats des plans de contrôle français pour les antibiotiques dans les muscles de volailles (poulet de chair, dinde, autres volailles) et dans les œufs (poule, caille) est présenté pour la période 2011-2016. Les résultats montrent que les volailles et les œufs commercialisés en France sont en grande majorité exempts de ces substances chimiques réglementées. Moins de 0,3 % des muscles et des œufs analysés ont montré des résultats non conformes (concentration au-dessus des LMR) pour ces contrôles ciblés. Les familles d'antibiotiques les plus fréquemment à l'origine des non conformités sont les tétracyclines et les sulfamides. Les effets positifs du 1er plan EcoAntibio sont aujourd'hui observés grâce à ces dispositifs de surveillance.

ABSTRACT

Impact of antibiotic reduction measures on the presence of residues in poultry muscles and eggs

In the current context of promoting the prudent use of antibiotics to reduce the risk of antimicrobial resistance (EcoAntibio 2017 Plan piloted by the Ministry of Agriculture), the emphasis is put on breeding the proper use of these drugs at the level of antibiotics. In the poultry sector, collective efforts have been made since the exposure of poultry in terms of ALEA (Animal Level of Exposure to Antimicrobials) decreased by 43% between 2016 and 2011. A decrease in the use of medicated feed has also been found. Surveillance of veterinary drug residues is governed by national residue control plans (Directive 96/23/EC). Slaughter control mainly concerns the targeted control of authorized substances and certain prohibited substances. In France, part of the antibiotic control program is currently provided by an innovative multi-antibiotic method using liquid chromatography coupled to mass spectrometry and validated according to European criteria in the field. This strategy has now been implemented for 6 years at the level of the official analysis laboratories. For the detection of antibiotics in eggs, an innovative method based on an optical biosensor is currently used.

An assessment of the evolution of the results of the French control plans for antibiotics in the poultry muscles (broiler chicken, turkey, other poultry) and in eggs (chicken, quail) is presented for the period 2011-2016. The results show that the majority of poultry and eggs marketed in France are free of these regulated chemicals. Less than 0.3% of analyzed muscles and eggs showed non-compliant results (concentration above MRLs) for these targeted controls. The families of antibiotics most frequently responsible for nonconformities are tetracyclines and sulphonamides. The positive effects of the 1st Ecoantibio plan are now observed thanks to these monitoring devices.

INTRODUCTION

Les antibiotiques sont des substances utilisées pour lutter contre des infections d'origine bactérienne. Dans l'Union Européenne, si l'usage des antibiotiques à titre d'additifs alimentaires a été totalement interdit depuis le 1er janvier 2006, d'autres antibiotiques sont enregistrés en tant que médicaments vétérinaires (directive 2001/82/CE). Enfin, certaines substances pour lesquelles aucune LMR ne peut être fixée sont interdites; chloramphénicol, nitrofuranes et nitroimidazoles en font partie.

Pour les médicaments vétérinaires, la maîtrise du risque est fondée sur la notion de temps d'attente, spécifique de chaque médicament vétérinaire, pour éviter la présence de résidus à des concentrations supérieures aux LMR (limites maximales de résidus) établies pour les substances actives. Le règlement 470/2009/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 mai 2009 établit les procédures communautaires pour la fixation des limites de résidus des substances pharmacologiquement actives dans les aliments d'origine animale et le règlement 37/2010/UE de la commission du 22 décembre 2009 fixe les LMR pour les substances pharmacologiquement actives.

La décision 97/747/CE de la Commission du 27 octobre 1997 fixe les niveaux et fréquences de prélèvement d'échantillons prévus par la directive 96/23/CE.

Dans le contexte actuel de promotion d'un usage prudent et raisonné des antibiotiques pour réduire les risques d'antibiorésistance (Plan Ecoantibio piloté par le ministère de l'Agriculture), des efforts collectifs ont été réalisés dans la filière avicole. Ainsi, l'exposition des volailles en termes d'indicateur ALEA (Animal Level of Exposure to Antimicrobials) a diminué de 43 % entre 2016 et 2011 (Méheust D. et al., 2017). Cet indicateur permet d'estimer le niveau d'exposition des animaux aux antibiotiques en prenant en compte la posologie, la durée d'administration et l'évolution de la population animale au cours du temps. Par ailleurs, un changement des pratiques d'utilisation des médicaments antibiotiques a également été constaté avec une diminution de l'usage de l'aliment médicamenteux depuis 2011 (- 53 %). Le présent article a pour objectif de présenter un bilan de l'évolution des résultats des plans de contrôle français pour les antibiotiques dans les muscles de volailles (poulet de chair, dinde, autres volailles) et dans les œufs (poule, caille) sur la période 2011-2016 au regard de cette diminution de l'usage des antibiotiques.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Echantillonnage et prélèvements

Les échantillons ont été collectés au niveau des abattoirs (muscles), des centres de conditionnement (œufs) ou des élevages (œufs) par les agents des directions départementales en charge des populations (DDPP) dans les différentes régions de France productrices de volailles (directive 96/23/CE).

Le nombre de prélèvements à réaliser par lieu de prélèvement (élevage ou abattoir) a été calculé pour répondre *a minima* aux dispositions de la directive 96/23/CE, au prorata :

- des tonnages abattus pour les volailles (1.668.447 t en 2014). Le nombre minimum d'échantillons à prélever pour chaque catégorie de volaille doit être d'un échantillon pour 200 t de production annuelle, et d'au minimum de 100 échantillons pour chaque groupe de substances pour une production annuelle supérieure à 5.000 t. Ainsi, en 2015, la répartition des prélèvements en fonction des espèces s'établit pour les antibiotiques de la façon suivante : 59,5 % pour les poulets, 25 % pour les dindes, 12,5 % pour les autres volailles et 3 % pour les poules de réforme;

- des volumes de production pour les œufs (772.213 t en 2014). Le nombre minimum d'échantillons à prélever doit être d'un échantillon pour 1.000 t de production annuelle, et d'au minimum de 200 échantillons. La répartition des prélèvements en fonction des espèces a été effectuée comme suit : 95 % pour les œufs de poule et 5 % pour les œufs de caille.

La répartition de ces prélèvements par groupe et famille de contaminants est ensuite fixée en fonction des minima imposés par la réglementation et d'une évaluation du risque liée, notamment, au nombre de non conformités relevées les années précédentes.

Ces échantillons ont été conditionnés séparément, identifiés par un code, congelés puis transportés congelés à l'Anses - Fougères ou dans différents laboratoires départementaux agréés, puis stockés à une température <-18°C jusqu'à l'analyse.

1.2 Analyse des échantillons

1.2.1. Analyse des antibiotiques dans le muscle

Les substances interdites (chloramphénicol, nitrofuranes) ont été recherchées dans les muscles et dans la coule d'œuf par des méthodes développées et validées à l'Anses – Fougères, selon la législation européenne concernant l'analyse des résidus (Décision 2002/657/EC) : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Si de nombreuses familles d'antibiotiques sont autorisées chez les volailles, l'usage des céphalosporines n'est pas autorisé. Les traitements s'effectuent essentiellement par voie orale : aliment (8 à 10 jours) ou eau de boisson pendant 5 jours en moyenne. Les antibiotiques ont été recherchés par des méthodes à large spectre de type microbiologique et chromatographiques. Les seuils de non-conformité sont fixés conformément au règlement 37/2010/UE.

1.2.2. Analyse des antibiotiques dans les œufs

Pour les œufs, une méthode immunologique innovante basée sur l'utilisation de biopuces (Randox Evidence) et une méthode chromatographique sont utilisées pour le dépistage des antibiotiques et des sulfamides.

Le nombre de molécules disponibles est restreint chez les poules pondeuses en raison de la production d'œufs en continu et du risque de transfert des résidus dans l'œuf (tableau 1). Parmi les antibiotiques autorisés en aviculture, une vingtaine d'entre eux (quinolones, pénicillines, sulfamides, thiamphénicol) ne sont pas autorisés dans la filière poules pondeuses produisant des œufs destinés à la consommation humaine.

Molécule	Résidu marqueur	LMR (µg/kg)	Espèces
Chlortétracycline	Chlortétracycline + épimère en 4	200	Volailles
Oxytétracycline	Oxytétracycline + épimère en 4	200	Volailles
Tétracycline	Tétracycline + épimère en 4	200	Volailles
Colistine	Colistine	300	Volailles
Lincomycine	Lincomycine	50	Volailles
Erythromycine	Erythromycine A	150	Volailles
Tylosine	Tylosine	200	Volailles
Néomycine	Néomycine B	500	Volailles
Tiamuline	Tiamuline	1000	Poules
Tylvalosine	Tylvalosine	200	Volailles

Tableau 1. Limites maximales de résidus (LMR) pour les antibiotiques dans les œufs

2. RESULTATS ET DISCUSSION

1.2.1. Muscles

Aucune non-conformité n'a été détectée chez les volailles, pour le chloramphénicol et les nitrofuranes. Les prélèvements de muscle ont été analysés selon deux stratégies analytiques combinant différentes méthodes d'analyses, deux en multi-résidus (recherche des résidus de plusieurs familles d'antibiotiques) et trois en recherche ciblée sur une famille d'antibiotiques (sulfamides, tétracyclines et quinolones mal détectées par les méthodes microbiologiques). Les pourcentages de non-conformités sont faibles, en moyenne inférieurs à 0,3 %. Les non conformités relevées concernent la présence de tétracyclines (oxytétracycline, doxycycline) et de sulfamides (sulfadiméthoxine) chez les poules de réforme, les dindes et les autres volailles. Les critères de ciblage étaient basés sur l'état des volailles ou des éléments d'information apportés par le document d'élevage ICA (information sur la chaîne alimentaire).

Des inspections en élevage ont été menées et ont montré que ces non conformités faisaient suite à des traitements par des aliments médicamenteux.

1.2.2. Œufs

De 2011 à 2016, les plans de contrôle dans les œufs ont mis en évidence des taux de non-conformités faible, dû à la présence de sulfamides (sulfadiazine) non autorisés chez la volaille. Le tableau 2 montre l'évolution des non conformités en antibiotiques et sulfamides dans les œufs.

Année	Antibiotiques	Sulfamides
2012	-	0
2013	-	0,5
2014	0	0,6
2015	0	0,6
2016	0	0

Tableau 2 : Taux de non-conformité (%) pour les œufs

Aucune non-conformité n'a été relevée pour les antibiotiques par le dépistage par biopuces, cependant des résidus d'oxytétracycline ont été détectés (43, 63 et 100 µg/kg) mais à des niveaux de concentrations inférieurs à la LMR dans les œufs (200 µg/kg), ce qui démontre une bonne observation des posologies chez les poules pondeuses. Pour les sulfamides, les concentrations trouvées sont faibles et concernent essentiellement les œufs de caille. Ces non-conformités peuvent avoir plusieurs causes : la contamination croisée entre aliments blancs et aliments supplémentés lors de la fabrication de ces aliments (Roudaut et al., 2016), de leur transport ou de leur stockage à la ferme. En effet, des concentrations correspondant à 5 % de transfert au niveau de la fabrication de l'aliment peuvent induire des concentrations résiduelles importantes dans les œufs. L'information des éleveurs et un contrôle qualité adéquate des aliments transférés à la ferme par autocontrôle et par les autorités réglementaires restent encore indispensables.

1.2.3. Lien avec les mesures de réduction des antibiotiques en aviculture

Globalement, les familles d'antibiotiques les plus fréquemment à l'origine des non conformités sont les tétracyclines et les sulfamides (Roudaut et al., 2016). Ces familles font toujours partie des antibiotiques les plus utilisés chez les volailles, après les polypeptides qui sont très peu absorbés au niveau de la barrière intestinale et n'engendre donc pas de non-conformités.

Si les ventes d'antibiotiques pour les volailles ont diminué de 48 % sur les 6 dernières années (Méheust et al., 2017), l'exposition des volailles en termes d'indicateur ALEA (Animal Level of Exposure to

Antimicrobials) a diminué de 43 % entre 2011 et 2017.

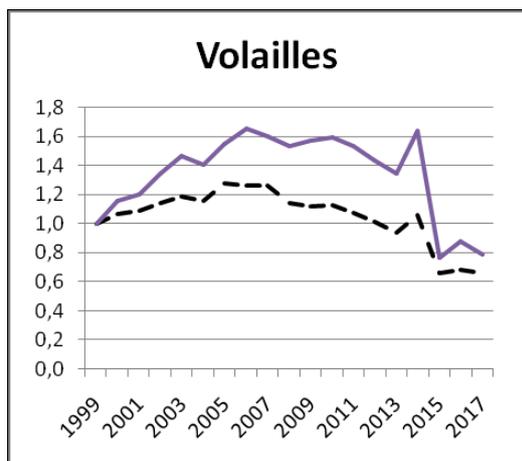


Figure 1 : Exposition des volailles aux antibiotiques (ALEA normalisée en trait continu pour les volailles, en trait hachuré pour l'ensemble des espèces animales) – D'après Méheust D. et al. (2017)

L'exposition des volailles aux antibiotiques reste cependant plus élevée par rapport à d'autres filières animales : ovins-caprins, bovins, poissons. S'il s'avère que les lapins, les porcs et les volailles sont les espèces les plus exposées aux antibiotiques, le taux de non-conformités pour les volailles est plus faible par rapport, notamment, à celui des ruminants et des porcs.

L'utilisation des antibiotiques critiques, fluoroquinolones pour les volailles, a chuté de 50 % depuis 2013. Cette famille d'antibiotiques représente, cependant, une faible part de l'exposition chez la volaille.

Les inspections en élevage ont aussi permis de mettre en évidence d'autres non-conformités liées à des mauvaises pratiques d'élevage (absence de registre d'élevage ; présence d'un registre d'élevage incomplet ; mauvaise tenue de la pharmacie de l'élevage). Des avertissements et/ou rappels à la réglementation ont été effectués auprès des éleveurs concernés.

Dans les autres pays européens, les non-conformités sont faibles pour les antibiotiques aussi bien pour le

muscle que pour les œufs. Les principales causes de non-conformités sont l'utilisation intentionnelle ou non d'un médicament non autorisé chez les poules pondeuses, le non-respect de l'âge maximal d'administration, le non-respect du temps d'attente ou de la posologie et la contamination croisée par des aliments supplémentés lors de la préparation de ces aliments à l'usine ou chez l'éleveur (Roudaut *et al.*, 2016).

CONCLUSION

Les résultats montrent que les volailles et les œufs produits en France sont, actuellement, en grande majorité exempts de substances chimiques réglementées (Jondreville *et al.*, 2010 ; Roudaut *et al.*, 2016). Cette bonne qualité sanitaire est le résultat d'une réglementation stricte sur les aliments des animaux et sur l'usage des médicaments vétérinaires et de son application par les éleveurs. Les effets positifs du 1er plan EcoAntibio sont aujourd'hui observés aussi bien par une diminution des ventes d'antibiotiques que par une décroissance notable de la résistance à la tétracycline dans les filières volailles pour *E. coli*.

Le plan EcoAntibio2 (2017-2021) vise à inscrire dans la durée la baisse de l'exposition des animaux aux antibiotiques et fixe de nouveaux objectifs en termes de réduction (50 %) de l'exposition à la colistine dans les filières avicole, bovine et porcine.

Le respect des mesures d'hygiène et de biosécurité est aussi un facteur protecteur contre les infections, logiquement associé à une moindre utilisation des antibiotiques dans les élevages (Sanders *et al.*, 2017). Par ailleurs, la mise en place d'un contrôle basé sur l'approche risque (règlement 625/2017) devrait en renforçant la surveillance permettre de diminuer encore le taux de non-conformité pour certains couples substance/matrice (ex : sulfamides/œuf) et de garantir ainsi les produits vis-à-vis de ces risques.

Remerciements

Les auteurs remercient l'ensemble des équipes des laboratoires agréés et du LNR pour leur implication dans l'obtention des données de ces plans ainsi que les DDecPP pour les prélèvements.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chauvin C, Bouvarel I., Beloeil P.A., Orand J.P., Guillemot D., Sanders P., 2005. *Vet. Res.*, (36), 1325.
- Décision 97/747/CE, 1997. *J. Off. Commun. Eur.*, L303, 12-15.
- Décision 2002/657/CE, 2002; *J. Off. Commun. Eur.*, L221, 8-36.
- Directive 96/23/CE, 1996, *J. Off. Commun. Eur.*, L125, 10-32.
- Directive 2001/82/CE. *J. Off. Commun. Eur.*, L311, 1-66.
- Jondreville C., Fournier A., Travel A., Feidt C., Roudaut B., 2010, *INRA Prod. Ani.*, 23 (1) 205-214.
- Méheust D., Chevance A., Moulin G., 2017. *Anses – ANMV, Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2017*, 1-103.
- Roudaut B., Fournet I., 2016. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation*, 77, 37-41.
- Règlement (CE) n° 470/2009, *J. Off. Commun. Eur.*, L152, 11-22.
- Règlement (UE) n°37/2010, *J. Off. Commun. Eur.*, L15, 1-76.
- Sanders P., Perrin-Guyomard A., Moulin G., 2017. *Cahier de nutrition et de diététique*, 52, 301-311.

**EFFICACITE D'UNE NOUVELLE FORMULATION DU CARVACROL CONTRE
CAMPYLOBACTER JEJUNI EN ESSAI *IN VIVO* ET IMPACT SUR LE
MICROBIOTE CAECAL.**

Allaoua Marion¹, Combes Sylvie², Noiroot Virginie¹, Etienne Pierre¹, Gabarrou Jean-François¹, Bouchez Olivier³, Treilhou Michel⁴, Bonnafé Elsa⁴

¹Phodé, 10 Avenue de la Martelle, 81150 Terssac, ²INRA GenPhySE, Université de Toulouse, INPT, ENVT, 31326 Castanet-Tolosan, ³GeT-PlaGe, Genotoul, INRA Auzeville, 31326 Castanet-Tolosan, ⁴INUC, équipe BTSB, Place de Verdun, 81000 Albi

mallaoua@phode.fr

RESUME

Campylobacter est la première cause bactérienne de maladie gastro-intestinale alimentaire. La principale source d'infection est la viande de volaille, majoritairement contaminée lors de l'éviscération à l'abattoir. L'administration orale de carvacrol peut être une méthode prometteuse pour réduire *Campylobacter* dans le tractus digestif mais ce composé est absorbé de façon proximale dans le système sanguin, et n'atteint ainsi pas les caeca où se multiplie la bactérie. Une nouvelle formulation galénique solide (Phodé, France) a été créée pour vectoriser le carvacrol. Dans cette étude, son efficacité (2,5 kg.T⁻¹ d'aliment) à diminuer la charge caecale en *C. jejuni* chez les poulets de chair artificiellement inoculés (10⁸ UFC/poulet) à 21 jours d'âge est évaluée. Le séquençage de l'ADNr 16S permet d'étudier l'impact de l'inoculation artificielle et de l'addition de la formulation sur le microbiote caecal. Cette étude est menée sur 3 groupes de poulets, un non inoculé et non traité, un inoculé non traité et un inoculé et traité. La formulation réduit la charge en *C. jejuni* de 1,4 log en comparaison avec le groupe inoculé non-traité (P<0,05). L'inoculation artificielle impacte la richesse observée du microbiote, sa diversité et l'abondance relative des genres majeurs. La formulation augmente (P<0,05) la diversité et modifie la structure du microbiote en comparaison avec le groupe contrôle inoculé mais non traité. Ainsi, cette formulation du carvacrol modifie le microbiote caecal et limite la croissance de *C. jejuni* en condition d'inoculation artificielle.

ABSTRACT

Efficacy of a new carvacrol-based product on *Campylobacter jejuni* in challenge test *in vivo* and impact on the whole caecal microbiota

Campylobacter is the leading cause of foodborne diarrheal disease. The main source of infection is the meat from poultry origin mostly contaminated during evisceration at slaughterhouse. Oral administration of carvacrol could be a promising method to reduce *Campylobacter* in the digestive tract but this compound is absorbed proximally in the blood system, so it does not get to the sites of *Campylobacter* growth which are the caeca. A new solid galenic formulation (Phodé, France) has been created to control the release of the carvacrol. In the present study, the efficacy of this formulation (2.5 kg.T⁻¹ feed) in decreasing the *C. jejuni* caecal load in broiler chickens artificially inoculated (10⁸ CFU/chicken) at 21 days is evaluated. The 16S rDNA sequencing allows us to study the impact of both artificial inoculation and addition of the formulation to the feed on the whole caecal microbiota. This study is conducted on 3 groups of chickens, one not inoculated and untreated, one inoculated and untreated and one inoculated and treated. The formulation decreases the *C. jejuni* load by 1.4 log in comparison with the inoculated and non-treated control (P<0.05). The artificial inoculation impacts the microbiota richness and the relative abundance of major genera. The formulation increases (P<0.05) the diversity and modifies the structure of the microbiota in comparison with the control samples (chickens inoculated but non-treated). The results show that this formulation of carvacrol modifies the caecal microbiota and limits the growth of *C. jejuni* under artificial inoculation conditions.

INTRODUCTION

Depuis 2005, la campylobactériose est la maladie zoonotique bactérienne d'origine alimentaire la plus fréquemment déclarée en Europe (Laroche et Magras, 2013; European Food Safety Authority, 2006). Le lait cru, l'eau ou encore la viande de bovins peuvent être incriminés dans les contaminations humaines, mais la principale source d'infection alimentaire est la viande de volaille ou les contaminations croisées avec celle-ci. *Campylobacter*, et plus particulièrement les espèces thermotolérantes *C. jejuni* et *C. coli*, sont principalement responsables de cette maladie. La volaille est souvent porteuse asymptomatique de cette bactérie et l'on estime qu'en Europe 71,2 % des poulets sont contaminés (European Food Safety Authority, 2010). Les bactéries du genre *Campylobacter* se développent principalement dans les caeca des poulets, et en plus faible proportion dans le gros intestin et le cloaque (Dhillon et al, 2006).

Les composés d'huiles essentielles et en particulier les monoterpènes phénoliques possèdent des propriétés antibactériennes intéressantes *in vitro* (Ultee et al, 2002; Di Pasqua et al, 2006). Toutefois, les propriétés hydrophobes des monoterpènes phénoliques, comme le carvacrol, mènent à une absorption proximale de ces composés dans le système sanguin. N'atteignant pas les caeca, ils perdent leur intérêt antibactérien (Kohlert et al, 2000; Rubió et al, 2012). Ainsi, l'administration orale d'une nouvelle formulation galénique du carvacrol, à libération contrôlée dans les caeca et le gros intestin, pourrait être une bonne solution pour réduire *Campylobacter* dans le tractus digestif des poulets. Cette formulation a notamment permis de retrouver 2h après administration, 52 % de l'actif au niveau caecal (Allaoua et al, 2018).

L'objectif de cette étude était d'évaluer *in vivo* l'efficacité d'une forme vectorisée et protégée du carvacrol ajoutée à l'aliment. Pour cela nous avons inoculé artificiellement les poulets, mesuré la croissance de *C. jejuni* dans les caeca et étudié la communauté bactérienne caecale par séquençage de l'ADNr 16S.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Expérimentation animale

Cet essai a été mené selon les standards éthiques et avec l'accord du comité d'éthique d'expérimentation animale du Centre Val de Loire, à la plateforme d'infection expérimentale (PFIE) de Tours-Nouzilly (02110.02).

Quatre-vingt-dix poussins mâles ROSS 308 d'un jour ont été séparés en 3 groupes (N=30), un non inoculé et non traité (nInT), un inoculé et non traité (InT), et un inoculé et traité pendant toute la durée de l'élevage (IT).

Les poulets ont été inoculés à 21 jours avec 10^8 CFU de *C. jejuni* par poulet. Le produit Phodé, dont le principe actif principal est le carvacrol, a été ajouté chez le groupe traité à 2,5 kg par tonne d'aliment tout au long du test.

Les euthanasies ont été réalisées à l'aide de CO₂ ou par dislocation cervicale en fonction de l'âge des animaux. Elles ont été réalisées sur 7 poulets de chaque groupe à 25, 31 et 35 jours (soit 4, 10 et 14 jours post-inoculation). Lors des autopsies, les deux caeca de chaque poulet ont été récupérés, congelés dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C.

1.2. Evaluation de la charge de *C. jejuni* dans les caeca

L'ADN des échantillons a été extrait à partir de 200 mg de contenu caecal, en utilisant le QiAmp Fast DNA Stool Mini Kit et en accord avec les instructions du fournisseur et le protocole de Josefsen *et al.* (Josefsen et al, 2015).

Le gène *hipO* de *C. jejuni* a été amplifié selon le protocole d'Allaoua *et al.* (Allaoua et al, 2018).

Les données ont été analysées avec le logiciel R (version 3.3.3, The R foundation for statistical computing, Vienne, Autriche). Les résultats suivant une distribution normale, un modèle linéaire à deux paramètres incluant l'âge des animaux et les traitements a été utilisé pour prédire le log d'expression. Les différences entre les traitements ont été ensuite analysées à l'aide d'un test post hoc de Tukey avec une correction de Bonferroni.

1.3. Exploration du microbiote caecal

Le gène de l'ADNr 16S microbien a été amplifié avec des amorces universelles liées à des adaptateurs et index (343F: 5'CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACG GRAGGACAG-CAG and 784R: 5'GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAC CAGGGTATCTAAT-CCT) ciblant la région V3-V4. Les amplicons des gènes d'ADNr 16S ont été générés via 30 cycles à 65°C sur un MiSeq Illumina à la plateforme GeT PLAGE (Toulouse, France). L'affiliation taxonomique des OTU (Operational taxonomic Unit) a été réalisée par BLAST en utilisant la base de données Silva 132. Pour chaque échantillon, la richesse (nombre d'OTU observé) et l' α -diversité (Shannon, InvSimpson) ont été estimées sur la base de 20675 séquences par échantillon. Pour comparer la structure de la communauté bactérienne dans l'ensemble des échantillons, une analyse de matrice de distance non-métrique (nMDS, non-Metric Distance Scaling) a été menée avec l'index de dissimilarité de Bray-Curtis.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Effet de la formulation sur la charge caecale en *Campylobacter jejuni*

Les poulets du groupe non inoculé et non traité sont exempts de *C. jejuni* tout au long du test. Les résultats des deux autres groupes sont présentés sur la figure 1. Le modèle linéaire utilisé pour les statistiques montre qu'il n'y a pas d'effet significatif de l'âge de prélèvement, mais qu'il y a un impact significatif du traitement et une interaction significative entre le jour et le traitement ($P < 0,05$). En effet, la comparaison entre le groupe traité et le contrôle inoculé mais non traité révèle une diminution significative d'1,4 log ($P < 0,05$) de la charge caecale en *C. jejuni* après 35 jours de traitement. Aucune différence n'a été observée entre les groupes à 25 jours (Figure 1).

2.2. Impact de l'inoculation artificielle et de l'ajout de la formulation à l'aliment, sur le microbiote caecal du poulet

L'âge, l'inoculation et le traitement structurent la communauté bactérienne caecale des poulets (figures 2). Dans ce jeu de données, 8 phyla, 63 familles et 186 genres ont été identifiés. Parmi les 186 genres, 58 % ont été affiliés avec un BLAST de plus de 97 %.

Sur la figure 2A, le nombre d'espèces observées (OTU) et les indices de diversité de Shannon et InvSimpson sont présentés. Comparativement au groupe contrôle non inoculé et non traité, l'inoculation artificielle avec *C. jejuni* (avec ou sans traitement) augmente significativement la richesse de la population à 31 et 35 jours, et sa diversité à 35 jours selon les deux indices. L'ajout de la formulation dans l'aliment des animaux inoculés augmente la richesse de la population à 31 et 35 jours par rapport au groupe contrôle non inoculé (nInT) mais pas par rapport au groupe contrôle inoculé et non traité (InT). La formulation augmente la diversité à 25 et 31 jours en comparaison avec les deux autres groupes, et à 35 jours en comparaison avec le groupe contrôle non inoculé. Chez les animaux inoculés, l'ajout de la formulation dans l'aliment semble stabiliser la diversité à des niveaux élevés.

La structure des communautés diffère fortement entre les trois lots comme en témoigne la séparation nette des trois groupes de points sur la figure 2B. Cette séparation est effective dès 25 jours d'âge. L'ajout de la formulation chez les animaux inoculés exerce la plus grande modification de la structure de la communauté comparativement aux lots contrôle.

Une évolution de la structure de la communauté avec le temps est observée dans les trois lots. Toutefois, l'inoculation et l'inoculation couplée à l'ajout de la formulation conduisent à une plus grande ressemblance des individus entre eux (moindre dispersion des points au sein d'un même lot) témoignant d'une action de contrainte sur la communauté comparativement au lot contrôle (figure 2B).

La figure 3 présente l'abondance des phyla dans le contenu caecal des poulets dans les trois groupes expérimentaux. Le phylum des *Firmicutes* est le plus abondant dans le contenu caecal des poulets, quel que soit l'âge ou le traitement ($\approx 70-95\%$). Chez le groupe nInT, on observe une augmentation significative de cette abondance entre 25 et 31 jours, puis une stabilisation entre J31 et J35. Dans les deux autres groupes on observe des abondances stables au cours du temps.

À 25 jours, l'abondance de *Firmicutes* est significativement plus élevée chez le groupe inoculé traité que chez le groupe contrôle non inoculé. De même, à 35 jours, cette abondance est significativement plus élevée dans ce groupe que dans les deux groupes contrôle n'ayant pas reçu le traitement.

Le phylum des *Proteobacteria* est le deuxième phyla le plus abondant ($\approx 5-29\%$) dans le contenu caecal des poulets. Chez le groupe InT, la proportion de *Proteobacteria* n'évolue pas en fonction de l'âge. Chez le groupe contrôle nInT, il n'y a pas d'évolution significative entre 25 et 31 jours, mais une diminution significative est visible entre 31 et 35 jours. Concernant le groupe inoculé et traité, aucune évolution n'est notée entre 25 et 31 jours ou entre 31 et 35 jours, mais une diminution significative est observée entre 25 et 35 jours.

La famille des *Enterobacteriaceae* est la plus représentée dans le phylum des *Proteobacteria*. En comparaison avec le groupe nInT, l'abondance de cette famille est diminuée significativement à 25 jours par l'inoculation artificielle avec *Campylobacter* (InT); et à 35 jours sous l'effet de la formulation chez les animaux inoculés (figure 4). À 35 jours l'abondance de *Campylobacteraceae* est significativement inférieure chez le groupe inoculé et traité en comparaison avec le groupe contrôle inoculé non traité.

Parmi les *Firmicutes*, les familles *Ruminococcaceae* et *Lachnospiraceae* sont retrouvées majoritairement chez les groupes inoculés. L'inoculation artificielle et le traitement avec la formulation n'ont pas d'effet sur l'abondance de la famille *Ruminococcaceae*. À 35 jours, l'abondance en *Lachnospiraceae* a été augmentée par l'inoculation artificielle; et à 25 jours elle est augmentée par le traitement avec la formulation chez les animaux inoculés comparativement aux deux autres groupes. Au sein du groupe contrôle inoculé et non traité, l'abondance en *Lachnospiraceae* augmente entre 25 et 35 jours.

3. CONCLUSION

En conclusion, le traitement avec le produit à base de carvacrol a diminué de 1,4 log de la charge caecale en *Campylobacter* après 35 jours de traitement.

Par ailleurs, cette étude confirme que l'inoculation avec *Campylobacter jejuni* a une influence sur la structure et la composition du microbiote. En effet,

suite à l'inoculation, il a été observé une augmentation de la diversité du microbiote, ainsi qu'une modification de l'abondance des phyla et des familles. Des études ont déjà montré une modification du microbiote en présence de *Campylobacter* (Sakaridis et al, 2018; Sofka et al, 2015). Ces modifications n'étant pas les mêmes en fonction de la lignée de poulets, de l'alimentation, du sexe ou encore de la charge en *Campylobacter*.

Dans notre étude, la réduction de la charge en *Campylobacter* par l'utilisation d'une forme galénique vectorisée du carvacrol dans l'aliment s'est accompagnée d'une modification des caractéristiques du microbiote : diversité, composition taxonomique et structure. Si ces modifications semblent bénéfiques au regard de la colonisation de *Campylobacter* et par conséquent pour la santé publique, il conviendrait de poursuivre les investigations sur leur impact sur les performances zootechniques des poulets sur de plus grands effectifs.

Figure 1 : Cinétique de portage de *C. jejuni* chez les poulets ROSS 308 après le traitement avec le produit à base de carvacrol *via* l'alimentation

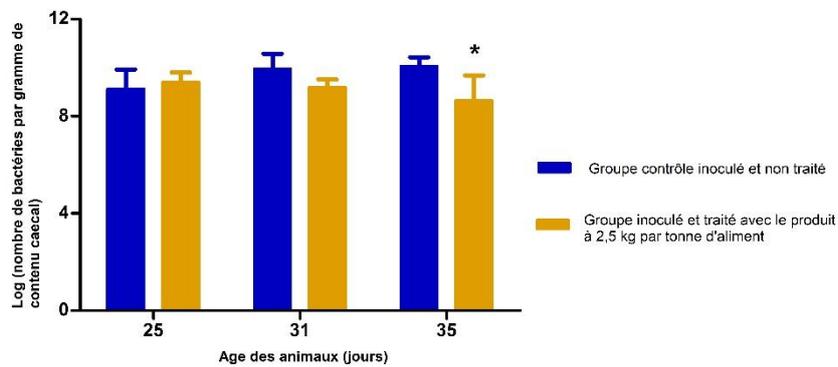


Figure 2 : Richesse et alpha-diversité (A) et bêta-diversité (B) du microbiote caecal du groupe inoculé et traité en comparaison des deux groupes contrôle. Sur la figure B, plus les points sont éloignés et plus les microbiotes sont différents

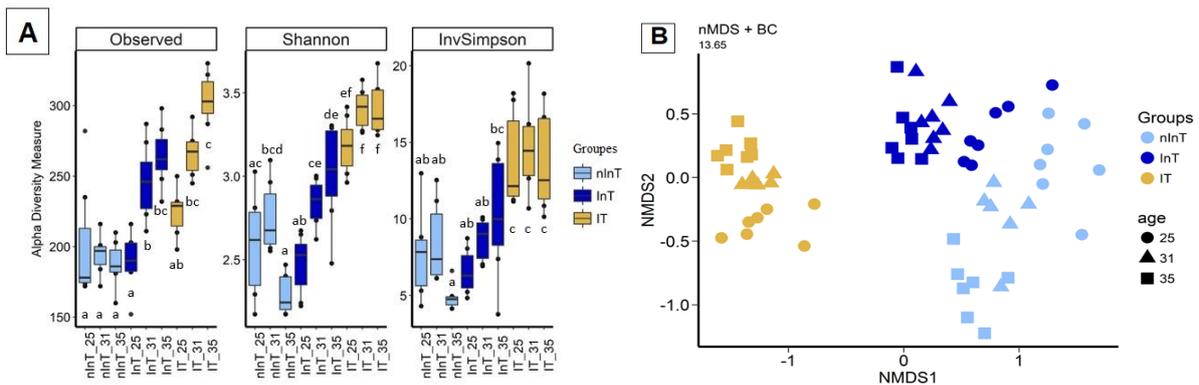
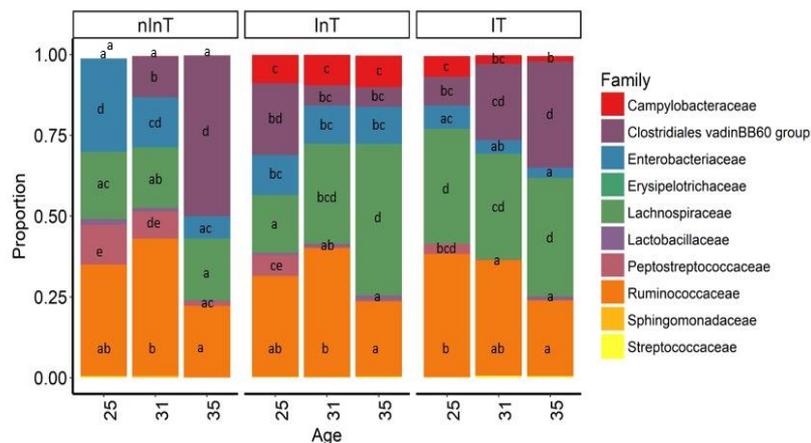


Figure 3 : Abondance relative des phyla dans le contenu caecal des poulets, pour chaque condition**Figure 4 :** Abondance relative des familles dans le contenu caecal des poulets, pour chaque condition

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allaoua M., Etienne P., Noiroit V., Carayon J.-L., Téné N., Bonnafé E., Treilhou M., 2018. *J. Appl. Microbiol.*, (125), 1162-1174.
- Dhillon A.S., Shivaprasad H.L., Schaberg D., Wier F., Weber S., Bandli D., 2006. *Avian Dis.*, (50), 55-58.
- Di Pasqua R., Hoskins N., Betts G., Mauriello G., 2006. *J. Agric. Food Chem.*, (54), 2745-2749.
- European Food Safety Authority, 2010. *Eur. Food Saf. Auth.*, (8).
- European Food Safety Authority, 2006. *EFSA J.*, (4).
- Josefsen M.H., Andersen S.C., Christensen J., Hoorfar J., 2015. *J. Microbiol. Methods*, (114), 30-34.
- Kohlert C., van Rensen I., März R., Schindler G., Graefe E.U., Veit M., 2000. *Planta Med.*, (66), 495-505.
- Laroche M., Magras C., 2013. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.*, (32), 685-699.
- Rubió L., Serra A., Macià A., Borràs X., Romero M.-P., Motilva M.-J., 2012. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, (905), 75-84.
- Sakaridis I., Ellis R.J., Cawthraw S.A., van Vliet A.H.M., Stekel D.J., Penell J., Chambers M., La Ragione R.M., Cook A.J., 2018. *Front. Microbiol.*, (9).
- Sofka D., Pfeifer A., Gleiss B., Paulsen P., Hilbert F., 2015. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, (128), 104-110.
- Ultee A., Bennik M.H.J., Moezelaar R., 2002. *Appl. Environ. Microbiol.*, (68), 1561-1568.

SESSION
HYGIENE ET QUALITE
DES PRODUITS

Synthèse

QUELLES STRATEGIES POUR LIMITER LES PROBLEMES DE QUALITE DE VIANDE ?

Baéza Elisabeth ^{1*}, Le Bihan-Duval Elisabeth ¹, Pampouille Eva ¹, Bourin Marie ²,
Berri Cécile ¹

¹ BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

² ITAVI, Centre INRA Val de Loire, 37380 Nouzilly, France

*elisabeth.baeza-campone@inra.fr

RÉSUMÉ

Les défauts de qualité de la viande de poulet s'observent essentiellement sur les filets, au stade de la découpe. Ils sont fréquemment associés aux souches lourdes à fort rendement musculaire qui sont très utilisées pour la découpe et la transformation. Ces défauts présentent des similitudes avec des altérations observées dans certaines myopathies. Les phénomènes suivants sont décrits : le «white striping» qui se présente sous la forme de stries blanches sur les filets ; le «wooden breast» qui touche des zones plus ou moins larges des filets, devenant dures, pâles et parfois recouvertes d'un liquide clair et visqueux ; le filet «spaghetti» dont les fibres musculaires sont déstructurées et se dissocient les unes des autres ; l'«Oregon disease» qui apparaît au niveau des aiguillettes et qui prennent une couleur verte. Cette revue a pour objectif de faire le point sur les connaissances actuelles concernant l'origine de ces défauts et les stratégies pour les limiter.

ABSTRACT

Which strategies to limit the defects of chicken meat quality?

Chicken meat quality defects are mainly detected on breast muscles. They are frequently associated with heavy chicken strains selected for high growth rate and breast meat yield and often used for cutting and further processing. These defects show similarities with changes observed in some myopathy forms. The following conditions are described: the white striping that corresponds to the inclusion of lipid deposition and connective tissue between the muscle fibres; the wooden breast that affects more or less wide zones of fillets becoming very hard, pale and sometimes covered with a clear and viscous liquid; the “spaghetti fillets” whose muscle fibres are completely deconstructed and break up; the “Oregon disease” that occurs on *Pectoralis minor* muscle and results in a greenish colour. The aim of this review was to present the current knowledge on the origin of these defects and the strategies to limit them.

INTRODUCTION

Les critères de sélection du poulet ont été adaptés au cours des dernières décennies pour suivre l'évolution du marché et de la demande des consommateurs. La part du poulet vendu en carcasse entière a rapidement diminué au profit de la commercialisation en produits découpés et transformés. En France, 24% de la production de poulets était vendue en carcasses entières en 2016, contre 52% en 1998 (ITAVI, communication personnelle). Les trois-quarts de la production sont donc consacrés à la production de coupes vendues en l'état ou destinées à la transformation en produits élaborés. Ce type de produits est en grande partie issu de la production de volailles dites standard, caractérisées par une vitesse de croissance rapide et des rendements en filets élevés, ce muscle étant particulièrement plébiscité par les consommateurs et les industriels des pays occidentaux. La sélection a donc porté ses efforts sur la vitesse de croissance mais aussi sur l'accroissement du rendement en filets avec des progrès spectaculaires obtenus très rapidement (Tableau 1) et qui continuent actuellement (Petracci *et al.*, 2017). Ces dernières années, de nouvelles pratiques sont apparues favorisant un abattage plus tardif (56 à 63 jours vs. 35 jours environ) en vue d'alourdir les poulets à croissance rapide utilisés pour la production standard. En lien avec ces évolutions, plusieurs défauts de qualité impactant l'intégrité et la composition des muscles, surtout au niveau du filet de poulet sont apparus depuis une dizaine d'années. Ces défauts modifient fortement l'aspect visuel, la texture et les capacités fonctionnelles des muscles pectoraux profonds et/ou superficiels, et plusieurs études mettent en évidence une augmentation très rapide de leur fréquence en abattoirs (Petracci *et al.*, 2015). La littérature est unanime pour décrire que les lésions associées à ces défauts s'apparentent à des myopathies sans que l'on connaisse encore leur origine génétique ou biologique. Les quatre principaux défauts identifiés chez les volailles (poulet en particulier) sont le « white striping », le « wooden breast », les filets « spaghetti » et l'« Oregon disease » (Figure 1). Dans cette revue, nous ferons un état des lieux des connaissances concernant leur description, leur prévalence et leurs conséquences en termes de qualité sensorielle, nutritionnelle et technologique de la viande. Nous détaillerons ensuite différentes stratégies qui ont été mises en œuvre ou qui sont envisagées, pour limiter la fréquence et la sévérité de ces défauts telles que des modifications des conditions d'incubation et d'élevage des poulets (températures, programme lumineux) ou d'alimentation (concentration en énergie ou acides aminés des aliments, supplémentation en antioxydants, rationnement), et le choix de souches génétiques plus ou moins atteintes.

1. DESCRIPTION DES DEFAUTS DE QUALITE DE VIANDE

L'accroissement du rendement en filet des poulets à croissance rapide a eu pour conséquence une modification de la morphologie des filets. Ces filets sont devenus très épais notamment au niveau crânial, du fait de la limitation de la croissance en longueur liée à la présence de l'os du bréchet et à une croissance radiale des fibres musculaires très importante. Ces évolutions ont entraîné des modifications structurales qui affectent les interactions entre les fibres musculaires et les composants de la matrice extracellulaire dont les vaisseaux ou les capillaires sanguins (Sihvo *et al.*, 2018). De récentes études (Abasht *et al.*, 2016 ; Beauclercq *et al.*, 2016, 2017 ; Mutryn *et al.*, 2015) font l'hypothèse qu'un déficit énergétique au niveau musculaire en lien avec des besoins accrus pourraient être à l'origine des défauts émergents chez les poulets. Ainsi, dès l'éclosion, la croissance des poulets est très rapide. Le développement des muscles pectoraux mobilise fortement les réserves énergétiques intramusculaires, ce qui nécessite un apport en nutriments et en oxygène, fourni par la circulation sanguine. Un manque d'approvisionnement en glucose et oxygène des fibres musculaires, en particulier sur la partie externe du filet, aura pour conséquence un changement du métabolisme énergétique qui fonctionnera en conditions anaérobies et mobilisera alors les sources énergétiques *in situ*, à savoir le glycogène mais aussi la phosphocréatine ou les acides aminés néo-gluciformateurs, après catabolisme des protéines musculaires. Enfin, si ces mécanismes deviennent limitants, les fibres musculaires se nécrosent induisant l'apparition de phénomènes inflammatoires et de stress oxydatif suivis d'une régénération musculaire, de la formation d'adipocytes intramusculaires (lipidose) et de tissu interstitiel comportant essentiellement du collagène (fibrose). Ce sont ces processus qui entraînent l'apparition des défauts « white striping » et « wooden breast ». L'analyse des métabolites dans des filets atteints de « wooden breast » comparativement à des filets normaux a confirmé ces hypothèses (Abasht *et al.*, 2016). La teneur en glycogène des filets « wooden breast » est réduite de 1,7 fois par comparaison avec les filets normaux. Des analyses protéomiques récentes ont conforté ces résultats montrant en particulier que les enzymes glycolytiques impliquées dans la régénération de l'adénosine triphosphate (ATP) étaient moins abondantes dans les filets atteints de « wooden breast » (Kuttapan *et al.*, 2017a ; Schilling *et al.*, 2017 ; Cai *et al.*, 2018). Pour Boerboom *et al.* (2018) et Livingston *et al.* (2018a), l'hypoxie serait un élément majeur favorisant l'apparition de ces défauts. Dans un modèle de poulets sélectionnés pour une efficacité alimentaire accrue, Bottje *et al.* (2017) ont mis en évidence un rôle central du système créatine-phosphocréatine dans l'apport en énergie au sein des

muscles. Les teneurs en anserine, carnosine et créatine sont également plus faibles dans les filets atteints de « wooden breast » suggérant des perturbations des systèmes antioxydants et du métabolisme énergétique (Sundekilde *et al.*, 2017). Enfin, dans les situations extrêmes de perturbation métabolique et structurale, la cohésion entre les fibres musculaires est détruite conduisant à la dénomination de filets « spaghetti » (Sirri *et al.*, 2016 ; Baldi *et al.*, 2018). Dans ces filets, la protéolyse *post-mortem* est très importante. Le tissu conjonctif situé autour des fibres musculaires (endomysium) et autour des faisceaux de fibres musculaires (périmysium) a pratiquement disparu.

Le « **white striping** » correspond à la présence de stries blanches parallèles aux fibres musculaires et de façon plus prononcée sur la partie crâniale du filet (Kuttappan *et al.*, 2009 ; Figure 1). Le sillon central situé sur la face externe du filet est aussi envahi par un large dépôt de graisse. Le « white striping » touche principalement le muscle *Pectoralis major* mais peut également atteindre le muscle *Pectoralis minor* ainsi que les muscles de la cuisse. Il est possible de détecter ce défaut sur les carcasses par spectrophotométrie en utilisant les propriétés diélectriques des muscles (Traffano-Schiffo *et al.*, 2017). Les observations histologiques mettent en évidence des fibres en dégénérescence et atrophiées associées à une variabilité accrue de la taille des fibres, l'apparition de vacuoles et de fibres lysées, une légère minéralisation, des points de régénérescence, une infiltration de cellules mononuclées, de la lipidose, de l'inflammation interstitielle et de la fibrose (Kuttappan *et al.*, 2013a ; Meloche *et al.*, 2018a). De plus, Daughtry *et al.* (2017) ont observé une diminution du nombre et de la capacité de prolifération et de différenciation des cellules satellites dans le muscle pectoral de poulets présentant une vitesse de croissance rapide et de forts rendements en filets ce qui limite la capacité de régénérescence du muscle. Chez le poulet, ce défaut apparaît dès l'âge de 25 jours (Dalle Zotte *et al.*, 2015). Chez l'homme, des cas de lipidoses musculaires ont été rapportés pour des myopathies métaboliques lors de déficit d'origine génétique en carnitine (dipeptide impliqué dans le transport intracellulaire des acides gras), carnitine palmitoyl transférase de type II ou en acyl CoA déshydrogénase (enzymes impliquées dans l'oxydation des acides gras). Chez les poulets atteints de « white striping », Boerboom *et al.* (2017) ont effectivement mis en évidence une forte diminution de la stearyl-carnitine dans le muscle pectoral. Les stries blanches évoquent aussi une dystrophie musculaire consécutive à une carence en vitamine E. Cependant, l'apport alimentaire de différents niveaux de vitamine E n'a aucun effet sur l'incidence du « white striping » chez le poulet (Kuttappan *et al.*, 2012a).

Les filets les plus sévèrement atteints par le « white striping » sont plus larges et plus épais que les filets normaux (Kuttappan *et al.*, 2009). La fréquence du « white striping » est plus élevée chez les poulets de

souche lourde, présentant de forts rendements en filets (Kuttappan *et al.*, 2009 ; Petracci *et al.*, 2013 ; 2014), ayant une vitesse de croissance rapide (Kuttappan *et al.*, 2012b, 2013c), nourris avec des aliments riches en énergie (Kuttappan *et al.*, 2012b) et présentant à l'abattage des poids vifs ou des âges élevés (Kuttappan *et al.*, 2013c ; 2017b ; Bauermeister *et al.*, 2009). De plus, les mâles sont plus touchés que les femelles (Kuttappan *et al.*, 2013c ; Meloche *et al.*, 2014).

Le « **wooden breast** » se distingue d'un filet normal par la présence de zones plus ou moins étendues présentant une texture plus dure, un aspect plus bombé et plus pâle (Sihvo *et al.*, 2013 ; Figure 1). Très souvent ces zones sont recouvertes d'un liquide clair et visqueux et présentent des pétéchies. Le tissu conjonctif externe fait des ondulations. Il est possible de détecter ce défaut sur l'animal vivant par palpation des muscles pectoraux. A l'abattoir, le degré d'atteinte du défaut peut être directement évalué sur les filets en utilisant la spectroscopie dans le proche infrarouge (Wold *et al.*, 2017). Dalgaard *et al.* (2018) ont proposé une classification des filets atteints basée sur l'évaluation de leur dureté par palpation. Les observations histologiques montrent une myodégénérescence multiphase et de la régénérescence accompagnée d'une accumulation de tissu conjonctif interstitiel (fibrose, Sihvo *et al.*, 2013). Velleman et Clark (2015) ont d'ailleurs mis en évidence une surexpression de différents gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires dans des filets atteints de « wooden breast » par comparaison à des filets normaux et en particulier pour des souches à croissance rapide comparativement à une souche à croissance lente (Tableau 2). Ces observations sont similaires à celles rapportées dans le cas de myopathies du muscle *Anterior latissimus dorsi* de poulet (Zimmermann *et al.*, 2012). Le « wooden breast » est souvent associé au « white striping » (corrélation génétique de 0,21 à 0,35 entre les 2 défauts, Bailey *et al.*, 2015). Par ailleurs, Fare *et al.* (2017) ont démontré que le foie des poulets atteints de « wooden breast » présentait des modifications métaboliques (notamment du cholestérol), des signes de processus inflammatoire (surtout autour des veines) et de régénérescence cellulaire. L'impact sur le foie n'est pas surprenant dans la mesure où cet organe est central pour les métabolismes protéique et énergétique. En particulier, il synthétise la majeure partie des lipides qui vont être exportés vers les tissus périphériques dont les muscles. Comme pour le « white striping », les souches de poulets à vitesse de croissance rapide et à fort développement musculaire sont plus sensibles à ce défaut. Des carences en vitamine E et sélénium ou des infections virales comme la bronchite infectieuse pourraient également être impliquées (Sihvo *et al.*, 2013). Récemment, Papah *et al.* (2017) ont réalisé une étude histologique du muscle *P. major* de 7 jours à 49 jours d'âge avec des prélèvements hebdomadaires mettant ainsi en

évidence une atteinte du muscle dès la première semaine post-éclosion avec la présence de phlébites localisées et de lipogranulomes. Une étude cinétique de 10 à 42 jours post-éclosion réalisée par Sihvo *et al.* (2017) a également mis en évidence une association entre la dégénérescence musculaire et des vasculites lymphocytaires au niveau des veines diminuant le flux sanguin et donc l'apport d'oxygène et de nutriments aux cellulaires musculaires.

Le défaut des **aiguillettes vertes** (« Oregon disease », Figure 1) a été décrit pour la première fois en 1968 comme une myopathie dégénérative chez la dinde. Chez les volailles à vitesse de croissance rapide, il est apparu il y a environ 30 ans (Siller, 1985). Ce défaut est plus fréquent chez les poulets à forte vitesse de croissance et chez les mâles (Lien *et al.*, 2011). Comme mentionné précédemment, la sélection pour un développement accru des muscles pectoraux est susceptible d'avoir modifié le système de vascularisation et le flux sanguin au niveau musculaire. Chez des poulets de souche lourde, le muscle *Pectoralis minor* (aiguillette) est ainsi comprimé par le muscle *Pectoralis major* (filet) contre l'os du bréchet. De plus, ces animaux élevés en claustration, ont une activité locomotrice et musculaire de base réduite qui se détériore avec le poids et l'âge (Baéza *et al.*, 2012). Lorsque les muscles pectoraux sont soumis à un exercice, la pression exercée sur l'aiguillette s'accroît, les artères thoraciques sont comprimées, le flux sanguin et l'apport d'oxygène diminuent, entraînant l'apparition de lésions nécrotiques (Siller, 1985). La transformation de la coloration rouge en coloration verte est due au catabolisme de l'hémoglobine en biliverdine (Kijowski *et al.*, 2014). Ce défaut pourrait apparaître dès l'âge de 26 jours chez les poulets mâles et 36 jours chez les femelles (Lien *et al.*, 2012). Toute perturbation des conditions d'élevage provoquant une activité musculaire intense (réaction de peur, comportement de fuite ou d'agressivité, battements d'ailes) va favoriser l'apparition du défaut ainsi que l'augmentation au niveau sanguin de l'activité enzymatique de la créatine kinase (Kijowski *et al.*, 2014). Traffano-Schiffò *et al.* (2018) ont développé un système de détection non invasif des aiguillettes vertes directement sur la carcasse avec peau en utilisant la spectroscopie diélectrique.

En France, afin d'établir la prévalence de ces défauts une enquête a été effectuée en 2017 auprès de plusieurs abattoirs industriels. Au préalable, un référentiel sur ces défauts a été réalisé aboutissant à la mise à disposition de quatre plaquettes auprès des professionnels (<http://www.itavi.asso.fr/content/les-defauts-de-carcasse-du-poulet-de-chair>).

2. FREQUENCE DES DEFAUTS DE QUALITE DE VIANDE

La fréquence du « white striping » dans les abattoirs industriels a été évaluée dans différents pays. Les

premières données ont été acquises aux États-Unis. Chez des poulets de souches commerciales élevés en conditions expérimentales, cette fréquence peut atteindre 50% (Kuttappan *et al.*, 2012a, 2012b). En Italie, sur 28 000 filets analysés et issus de 56 lots de poulets de poids vif moyen de 2,75 kg abattus en conditions industrielles, Petracci *et al.* (2013) ont observé une fréquence de 12%. En Italie du nord, sur 19 lots de poulets femelles (poids moyen de 2,6 kg) et 38 lots de poulets mâles (poids moyen de 3,6 kg) abattus en conditions industrielles, Russo *et al.* (2015) ont examiné 400 filets/lot et observé une fréquence de 70,2 et 82,5%, respectivement. Lors d'une étude récente en Italie, sur 800 poulets de souche Cobb et Ross et abattus à l'âge de 44 jours, la prévalence des défauts « white striping » et du « wooden breast » était de 76,9 et 6,26%, respectivement (Trocino *et al.*, 2017). Au Brésil, sur 2 512 carcasses analysées dont le poids moyen était de 3,2 kg, Ferreira *et al.* (2014) ont mis en évidence une fréquence de 7,4% de filets modérément atteints et 2,5% de filets atteints de façon sévère par du « white striping ». Toujours au Brésil, sur 4 032 carcasses, Lima *et al.* (2016) ont observé une incidence de 20,1% dont 1,1% de cas sévères. En France, une enquête a été réalisée en 2017 dans plusieurs abattoirs industriels sur 123 lots de poulets certifiés, standards et lourds. L'enquête a révélé que dans les lots suivis, 66% des filets présentaient le défaut de « white striping » (dont 15% à un degré sévère), 53% présentaient le défaut de « wooden breast » (dont 22% à un degré sévère) et 11% des filets étaient atteints du défaut « spaghetti ». La sévérité des défauts était notée grâce aux plaquettes mentionnées précédemment. En 2006, la fréquence du défaut « aiguillettes vertes » dans les abattoirs industriels italiens avait été estimée à 0,84% chez les poulets pesant plus de 3 kg (Bianchi *et al.*, 2006). Au cours d'études expérimentales réalisées aux USA avec différentes souches, Lien *et al.* (2011) ont observé une fréquence de 3 à 17%. En Pologne, cette fréquence peut varier de 0,02 à 1,90% dans les abattoirs industriels (Kijowski *et al.*, 2014). En Turquie, elle varie de 0,04 à 2,60% (Yalcin *et al.*, 2015). En France, l'enquête réalisée en 2017 dans plusieurs abattoirs industriels a montré une incidence de 0,33%. Enfin, si les défauts de « white striping » et « wooden breast » sont le plus souvent décrits chez les poulets à croissance rapide, ils ont également été observés chez des poulets à croissance plus lente et chez d'autres espèces de volailles comme la caille et la dinde. Ainsi, Tasionero *et al.* (2016) ont observé les défauts « wooden breast » et/ou « white striping » sur des filets de cailles abattues à l'âge de 28 jours (16%) et sur des filets de poulets à croissance lente (souches Padovana et Polverara) abattus à l'âge de 180 jours (23%). Soglia *et al.* (2018) ont décrit des atteintes de « white striping » sur des dindons standards BUT Big 6 abattus à l'âge de 137 jours et un poids vif de 20 kg. Toutefois, les répercussions sur la qualité nutritionnelle et technologique des filets sont moins

importantes que celles décrites chez les poulets standards.

3. CONSEQUENCES DES DEFAUTS DE QUALITE DE VIANDE

Les analyses hématologiques et sérologiques des poulets atteints de « white striping » n'ont pas mis en évidence de lien avec une inflammation ou une infection généralisée. Toutefois, dans le sérum de ces poulets, des activités plus élevées pour les enzymes créatine kinase, alanine et aspartate aminotransférases et lactate déshydrogénase, qui sont des marqueurs de nécrose tissulaire, ont pu être associées à cette myopathie (Kuttappan *et al.*, 2013b).

Les filets atteints de « white striping » et « wooden breast » ont des teneurs en eau, lipides et collagène supérieures et des teneurs en protéines myofibrillaires et sarcoplasmiques inférieures à celles des filets normaux (Kuttappan *et al.*, 2012b ; Petracci *et al.*, 2014, Mudalal *et al.*, 2014 ; Cai *et al.*, 2018). L'indice de jaune (critère b* de la mesure de la couleur dans le système CIE) de ces filets est également plus élevé (Kuttappan *et al.*, 2013c). Après cuisson, la surface externe des filets atteints de « wooden breast » est plus foncée, plus rouge et plus jaune que celle des filets normaux (Zhuang et Bowker, 2018). Les filets atteints de « white striping » et « wooden breast » ont des teneurs en calcium et sodium supérieures à celles des filets normaux pouvant expliquer en partie les nécroses cellulaires (Soglia *et al.*, 2016a). Livingston *et al.* (2018) ont également mis en évidence une association entre la sévérité des défauts et une concentration accrue de calcium dans le muscle. La teneur en pigments héminiques des muscles présentant des défauts est réduite alors que la sensibilité à l'oxydation des lipides et des protéines est accrue (Soglia *et al.*, 2016b). Concernant les lipides, la composition en acides gras est modifiée, les teneurs en acides gras saturés et mono-insaturés sont accrues alors que celle en acides gras polyinsaturés est diminuée. Kuttappan *et al.* (2013c) n'ont pas mis en évidence de relation entre la sévérité du défaut « white striping » et la qualité technologique des filets alors que dans l'étude de Petracci *et al.* (2013), les filets présentant un défaut « white striping » sévère avaient un pH ultime et des pertes à la cuisson plus élevés et après cuisson, une résistance à une force de compression-cisaillement inférieure aux valeurs mesurées dans les filets normaux. Il est bien connu que des valeurs de pHu supérieures à 6,0, ce qui est souvent le cas pour les muscles atteints de défauts, peuvent favoriser des développements microbiens et donc dégrader la qualité sensorielle (flore d'altération) et/ou sanitaire (lors de contamination par une flore pathogène) de la viande (Young *et al.*, 2016). Mudalal *et al.* (2015) Mazzoni *et al.* (2015), Tijare *et al.* (2016), Bowker *et al.* (2018), Brambila *et al.* (2018), Malila *et al.* (2018), Aguirre *et al.* (2018) et Maxwell *et al.* (2018) ont également observé des effets négatifs

des défauts « white striping » et/ou « wooden breast » sur la qualité sensorielle et technologique des filets de poulets (Tableau 3). L'altération du pouvoir de rétention d'eau pourrait être expliquée par la diminution des protéines musculaires et l'accroissement de la quantité d'eau dans les espaces extracellulaires (Tasionero *et al.*, 2017). Bowker et Zhuang (2016) ont montré que la solubilité des protéines sarcoplasmiques et la capacité d'émulsion des protéines myofibrillaires étaient diminuées, ce qui peut avoir aussi un impact négatif sur l'aptitude à la transformation de ces filets. Les filets atteints de « white striping » sévère sont jugés, par un jury d'analyse sensorielle, moins tendres après cuisson que les filets normaux ou atteints de « white striping » modéré (Brambila *et al.*, 2016). Les filets atteints de « wooden breast » sont plus durs que les filets normaux à l'état crû (Zhuang *et al.*, 2016 ; Sun *et al.*, 2018). Après cuisson, la dureté des filets atteints de « wooden breast » n'est pas forcément plus élevée que celle des filets normaux (Mudalal *et al.*, 2015 ; Mazzoni *et al.*, 2015 ; Zhuang *et al.*, 2016 ; Sun *et al.*, 2018). Ceci doit dépendre des conditions de cuisson, notamment de la durée et de la température. Néanmoins, la dureté des filets atteints de « wooden breast » diminue au cours de la conservation à +4°C (Xiao et Owens, 2016a). La congélation-décongélation induit également une diminution de la dureté de ces filets (Xiao et Owens, 2016b).

4. STRATEGIES POUR LIMITER LA FREQUENCE ET/OU LA SEVERITE DES DEFAUTS DE QUALITE DE VIANDE

4.1. Conditions d'incubation et d'élevage

Oviedo-Rondon *et al.* (2016) ont testé 2 programmes de températures d'incubation (37,8°C pendant toute la durée d'incubation vs. 36,9°C pendant les 3 premiers jours puis 37,8°C et enfin 38,9°C pendant les 3 derniers jours d'incubation). La variation de température en début et fin d'incubation a réduit la fréquence des myopathies mesurée à l'âge de 57 jours post-éclosion. Clark *et al.* (2017) ont testé une augmentation de la température d'incubation de 37,8°C à 39,5°C pendant 0, 3 ou 12 h par jour sur la période 14 à 18 jours. Les poulets issus du lot exposé à 12 h d'augmentation de la température ont un poids vif inférieur à ceux des autres lots à l'âge de 63 jours (5320 g vs. 5478 et 5490 g pour les lots 0 et 3 h, respectivement) et une moindre sévérité des défauts (19,4% de score 2 vs. 28,8 et 22,9% pour les lots 0 et 3 h, respectivement). Ces mêmes auteurs ont classé, à l'éclosion, les poussins en 3 lots : précoces, moyens et tardifs. A l'âge de 63 jours, les poulets ayant éclos précocement ont un poids vif supérieur à celui des autres lots (5519 g vs. 5397 et 5372 g pour les lots moyen et tardif, respectivement) et une sévérité accrue des myopathies (30% de score 2 vs. 23,1 et 18,0% pour les lots moyen et tardif, respectivement) confirmant le lien extrêmement fort entre la

croissance des animaux et la fréquence d'apparition des défauts. Dans la mesure où l'hypoxie pourrait être un facteur aggravant favorisant l'apparition des lésions myopathiques, il pourrait être intéressant de tester une variation de la concentration en oxygène au sein des incubateurs.

Zahoor *et al.* (2016) ont testé l'effet de la température d'élevage (température stable de 21°C entre 24 et 39 jours vs. température décroissante de 19 à 14°C sur cette même période) sur la fréquence et la sévérité des défauts « wooden breast » et « white striping » au niveau du muscle *P. major*. L'hypothèse était qu'une température élevée et un contact prolongé avec la litière pourrait empêcher la dissipation de l'extrachaleur produite par les animaux et provoquer un stress thermique favorisant l'apparition de défauts notamment au niveau des muscles pectoraux. Cette étude n'a toutefois pas mis en évidence un effet bénéfique de la diminution de la température d'élevage sur l'apparition de défauts musculaires.

Trocino *et al.* (2017) ont testé deux programmes lumineux (14 h vs. 18 h lumière par jour) en élevage. La diminution de la durée d'éclairage a permis de réduire la fréquence des défauts « wooden breast » (64,6 vs. 89,5%), sans doute en lien avec la diminution de la consommation et de la croissance des poulets.

4.2. Conditions d'alimentation

Livingston *et al.* (2016 ; 2018b) ont étudié l'impact d'une réduction de l'accès à l'aliment à partir de l'âge de 7 jours durant 14 h de 7 à 14 jours, 13 h de 15 à 21 jours et 6 h de 22 à 47 jours. Ceci a eu pour conséquence une diminution de la croissance des poulets (poids vif de 2,98 vs. 3,26 kg pour le témoin nourri à volonté à 48 jours), du rendement en filets (26,48 vs. 28,34% du poids vif pour le témoin nourri à volonté) et donc de la note des défauts sur les filets : 1,65 vs. 2,79 pour le « white striping » et 2,14 vs. 2,89 pour le « wooden breast ».

Un rationnement à 80% de l'alimentation à volonté entre 13 et 21 jours a été testé sans effet bénéfique sur la fréquence et la gravité du défaut « white striping » mesuré à l'abattage (Radaelli *et al.*, 2017). Meloche *et al.* (2016 ; 2018c) ont testé une réduction de la concentration en énergie et lysine digestible (90 et 95% de l'apport recommandé) sur une partie ou la totalité de la période d'élevage. Cela n'a pas permis de réduire la fréquence des défauts de qualité. Au contraire, la réduction de la densité énergétique et protéique de 8 à 14 jours a exacerbé l'apparition des défauts à l'âge d'abattage. En fait, pendant la période de rationnement la fréquence et la gravité des défauts est réduite mais dès que le rationnement cesse les poulets réalisent une croissance compensatrice et à l'âge d'abattage il n'y a plus de différence avec les poulets alimentés à volonté (Radaelli *et al.*, 2017 ; Gratta *et al.*, 2017). Un rationnement à 85, 90 ou 95% par rapport à l'alimentation à volonté sur toute la durée d'élevage permet de réduire la fréquence et la

sévérité des défauts mais le poids vif à 50 jours est également diminué de 3,748 à 3,347 kg pour les lots extrêmes (Meloche *et al.*, 2018b).

L'augmentation de la teneur en lysine digestible dans les régimes croissance (distribués entre 12 et 28 jours) ou finition (28 à 42 jours) favorise l'apparition des défauts (Cruz *et al.*, 2017). Leur fréquence est de 93,75% avec 1,01% de lysine digestible dans le régime croissance vs. 65,62% pour le régime basal avec 0,77% de lysine digestible. Cette fréquence est de 100% avec le régime finition contenant 0,92% de lysine digestible vs. 51,61% pour le régime basal avec 0,68% de lysine digestible. Meloche *et al.* (2018) ont également observé une diminution de la sévérité du défaut « wooden breast » à l'âge de 41 jours (note de 1,38 vs. 0,73 ; Figure 2) lorsque la teneur en lysine digestible de l'aliment passe de 100% à 75% sur la période 15-25 jours mais le poids vif est également impacté (2,848 vs. 3,028 kg).

Récemment et avec succès, Cordova-Noboa *et al.* (2018a ; 2018b) ont testé un apport alimentaire en acide guanidinoacétique (GAA). Ce dernier est métabolisé en créatine au niveau du foie et il est ensuite transporté vers les muscles. La créatine et la phosphocréatine jouent un rôle majeur dans le métabolisme énergétique musculaire (Wyss et Kaddurah-Daouk, 2000). L'apport de GAA (600 g/T) a été réalisé pendant toute la période d'élevage de poulets mâles Ross 708. A l'âge de 51 jours, cette supplémentation a permis de diminuer le pHu du filet (6,01 vs. 6,08) suggérant une moindre utilisation des réserves du muscle en glycogène à des fins énergétiques et de réduire la sévérité du défaut « wooden breast » par comparaison avec les lots non supplémentés (note moyenne de 2,33 vs. 2,76). Il serait intéressant de tester l'apport de créatine ou de glucose au cours du développement embryonnaire.

Dalle Zotte *et al.* (2015) ont comparé un lot de poulets supplémentés avec un anticoccidien (Maxiban G160) avec un lot de poulets vaccinés contre la coccidiose (Paracox 5) et un lot de poulets non traités. Le lot traité avec l'anticoccidien a obtenu le score le plus élevé pour la notation du « white striping » après abattage à 51 jours. Ce lot avait également le poids vif à l'abattage le plus élevé.

Sirri *et al.* (2016) ont testé deux niveaux de supplémentation alimentaire en oligoéléments (zinc, manganèse et cuivre) et deux sources (organique ou minérale) qui n'ont eu aucun effet sur la fréquence et la sévérité des défauts « wooden breast » et « white striping ». Une supplémentation ou une restriction alimentaire en sélénium (sélénite de sodium) ne permet pas de réduire la fréquence et la sévérité des myopathies mesurées à l'âge de 42 jours (Ferreira *et al.*, 2016 ; Sihvo *et al.*, 2017). En testant différents niveaux de supplémentation alimentaire en sélénium organique (Zn-L-SeMet), de 0 à 1 ppm, Cemin *et al.* (2018) ont observé une amélioration des performances de croissance mais une augmentation de la sévérité des défauts. Wedekind *et al.* (2016) n'ont pas observé

d'effet sur la sévérité du « wooden breast » mesurée à l'âge de 33 jours avec une supplémentation alimentaire en cuivre à 30 ou 75 ppm des poulets. Une supplémentation alimentaire en Coenzyme Q10 (antioxydant utilisé à 20 mg/kg) de 35 à 42 jours permettrait de réduire la sévérité du défaut des aiguillettes vertes dont l'apparition a été provoquée en stimulant les battements d'ailes (Jojkic et al., 2018).

4.3. Effet de la génétique

Pour des gammes de poids équivalentes, la fréquence et la gravité du défaut « white striping » peut être très variable selon la souche de poulets (Kuttapan et al., 2013c). Oviedo-Rondon et al. (2016) ont observé que la fréquence et la sévérité des myopathies étaient plus élevées pour les croisements Ross 708 × Ross comparés aux poulets Cobb 500 × Cobb MX et Cobb × Hubbard M99. Dans une étude plus récente, Trocino et al. (2017) n'ont pas mis en évidence un effet du génotype (Ross vs. Cobb) sur la fréquence des défauts « white striping » et « wooden breast » alors que Gratta et al. (2017) ont observé un score de dégénérescence des fibres musculaires plus élevés chez des poulets Ross 308 comparés à des poulets Cobb 500 abattus à l'âge de 48 jours. En conditions de sélection, l'héritabilité du défaut « white striping » a été estimée à 0,185 et 0,338 pour 2 lignées de poulets présentant un rendement en filets de 29,4 et 21,7%, respectivement (Bailey et al., 2015). Les estimations d'héritabilité du défaut « wooden breast » sont plus faibles, comprises entre 0,024 à 0,097 selon les souches testées (Bailey et al., 2015). En conditions expérimentales, l'héritabilité du « white striping » a en revanche été estimée à 0,65 dans une population composée de 2 lignées à croissance rapide sélectionnées de façon divergente sur la valeur du pHu (Alnahhas et al., 2016) et dont le rendement en filet était en moyenne de 20,2%. Cette étude a également révélé des niveaux de corrélations génétiques positives extrêmement élevées entre ce défaut et le rendement en filet ($r_g = 0,68$) mais aussi la teneur en lipides intramusculaires estimée par spectrométrie dans le proche infrarouge ($r_g = 0,64$). Le lien entre « white striping » et poids vif des animaux est plus faible mais néanmoins significatif ($r_g = 0,33$). L'analyse GWAS (genome-wide association study) réalisée sur ces mêmes lignées divergentes a permis d'identifier les premiers QTL (quantitative trait loci) de « white striping » chez le poulet, avec 42 SNP (single nucleotide polymorphism) associés au défaut et différents critères de qualité. Ils définissent 18 régions QTL localisées sur 13 chromosomes suggérant un contrôle polygénique de ces caractéristiques (Pampouille et al., 2018). La fréquence d'aiguillettes vertes dépend de la souche de poulet standard. Par exemple, Kijowski et al. (2009) ont mis en évidence une fréquence de 0,28% pour des poulets Cobb 500 et 0,15% pour des poulets Ross 308 alors que Bianchi et al. (2006) ont observé une atteinte plus grave et plus importante pour des

poulets Ross 508 comparés à des poulets Cobb 500. L'héritabilité du défaut « aiguillette verte » est faible ($h^2 = 0,021$ à $0,059$; Bailey et al., 2015).

CONCLUSION

La production de volailles de chair conventionnelle (poulet en particulier) est actuellement confrontée à des problèmes de qualité qui pénalisent d'ores et déjà fortement sa compétitivité et peuvent à terme ternir son image. En effet, les progrès continus réalisés depuis de nombreuses années en termes de vitesse de croissance et d'augmentation des rendements en filet a conduit à la production de muscles dont les caractéristiques ont progressivement évolué (baisse des réserves énergétiques, hypertrophie des fibres musculaires) jusqu'à entraîner des dérégulations métaboliques et cellulaires à l'origine des défauts actuels. Les lésions qui sont apparues sont apparentées à des myopathies qui pourraient impacter le bien-être et la santé des volailles (Alnahhas et al., 2017; Kawasaki et al., 2018). En outre, elles induisent des pertes économiques importantes à l'abattoir, avec des retraits ou des déclassements de plus en plus nombreux et il existe à terme un risque de rejet du consommateur pour la viande de poulet. Aux USA, la perte annuelle due aux défauts de qualité a été estimée à 200 millions \$ du fait de la diminution du rendement technologique (Kuttapan et al., 2016). Au Brésil, sur un total de 207 000 poulets abattus, Zanetti et al. (2018) ont estimé que 0,8% des filets de poulets étaient saisis à cause des défauts. En Pologne, avec une fréquence d'aiguillettes vertes de 0,2%, Kijowski et al. (2014) ont calculé une perte annuelle de 411 718 euros pour l'ensemble de la production de poulets. Kuttapan et al. (2012c) ont montré que plus de 50% des consommateurs consultés n'achèteraient pas des filets atteints de « white striping » (Figure 3). La problématique est complexe et les recherches menées ont permis d'améliorer nos connaissances sur les différents processus biologiques impliqués dans l'apparition de ces défauts. Afin de les limiter, plusieurs solutions se sont montrées efficaces mais elles entraînent toutes des baisses de performances en élevage et donc une augmentation du prix de production. Ceci passe par exemple par la limitation de la vitesse de croissance, la réduction du poids et de l'âge à l'abattage, la réduction de la concentration en énergie des aliments ou encore l'utilisation de souches moins performantes et/ou moins conformées. Certains spécialistes suggèrent également d'éviter les sources de stress pour les animaux, de revoir les apports en vitamines et oligo-éléments dans les aliments, d'assurer une bonne prophylaxie vaccinale. Cependant, hormis l'apport d'acide guanidino-acétique, aucune étude publiée n'a apporté d'éléments probants concernant un effet bénéfique de l'alimentation sur l'apparition des défauts musculaires chez le poulet. Des premiers résultats semblent montrer un impact possible des conditions d'incubation sur la

fréquence d'apparition des défauts mais ces études doivent être poursuivies en prenant en compte d'autres paramètres que la température, comme par exemple l'équilibre O₂/CO₂ dans l'incubateur ou encore les nutriments disponibles dans l'œuf. De même, l'impact de l'alimentation des reproductrices doit être évalué en lien avec les besoins et le statut énergétique des descendants au cours du développement embryonnaire, mais aussi au moment de l'éclosion et durant les premières phases de la croissance post-éclosion. L'origine génétique des défauts étant largement suspectée, une sélection pour une moindre sensibilité au développement de ces myopathies pourrait aussi être mise en place. En effet, la sélection des lignées destinées à la production de viande a été réalisée en prenant en compte des caractères quantitatifs liés au poids et aux rendements en filet sans intégrer les conséquences sur l'intégrité du muscle et plus généralement la physiologie de l'animal. Ceci a conduit à sélectionner des animaux ayant des muscles régénératifs et pseudo-hypertrophiés, qui croissent en développant plus de tissus adipeux et fibreux interstitiels et moins de fibres musculaires. A ce jour, il existe quelques méthodes spectrales permettant de détecter les défauts de « white striping » et « wooden breast » en abattoir mais les sélectionneurs ne disposent toujours pas

d'outils pour évaluer leur présence et leur sévérité de façon fiable sur l'animal vivant. Ceci éviterait la sélection sur collatéraux moins efficace et plus coûteuse que la sélection directe des reproducteurs. Il est donc urgent de développer de nouvelles méthodes de phénotypage, biologiques ou physiques, applicables à haut-débit et de manière peu ou pas invasive pour écarter des schémas de sélection les reproducteurs à même de transmettre les défauts musculaires dans les souches de poulet à croissance rapide. Enfin, il est important que la filière réfléchisse à des systèmes de production innovants, basés sur l'utilisation de souches sans doute moins performantes mais plus robustes qui permettraient des gains de compétitivité et plus généralement de durabilité en limitant les problèmes de santé et de bien-être en élevage et les pertes de produits à l'abattoir et au cours de la transformation. Ainsi, aux Pays-Bas, face à la pression sociale qui accepte de moins en moins les conditions d'élevage intensives, la filière s'est orientée depuis 3 ans sur l'utilisation de poulets à croissance plus lente pour l'approvisionnement des consommateurs néerlandais en produits frais (Thornton, 2016).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abasht B., Mutryn M.F., Michalek R.D., Lee W.R., 2016. Plos One, 11 (4), e0153750, 16 p.
- Alnahhas N., Berri C., Chabault M., Chartrin P., Boulay M., Bourin M.C., Le Bihan-Duval E., 2016. BMC Genet., 17, 61, 9 p.
- Alnahhas N., Berri C., Chabault-Dhuit M., Bourin M., Arnould C., Le Bihan-Duval E., 2017. Anim., 11, 335-344.
- Aguirre M.E., Owens C.M., Miller R.K., Alvarado C.Z., 2018. Poult. Sci., 97, 1456-1461.
- Baéza E., Arnould C., Jali M., Chartrin P., Gigaud V., Mercierand F., Durand C., Meteau K., Le Bihan-Duval E., Berri C., 2012. J. Anim. Sci., 90, 2003-2013.
- Bailey R.A., Watson K.A., Bilgili S.F., Avendano S., 2015. Poult. Sci., 94, 2870-2879.
- Baldi G., Soglia F., Mazzoni M., Sirri F., Canonico L., Babini E., Laghi L., Cavani C., Petracci M., 2018. Anim., 12, 164-173.
- Bauermeister L.J., Morey A.U., Moran E.T., Singh M. Owens C.M., Mac Kee S.R., 2009. Poult. Sci., 88 (E-Suppl.1), 33.
- Beaulercq S., Nadal-Desbarats L., Hennequet-Antier C., Collin A., Tesseraud S., Bourin M., Le Bihan-Duval E., Berri C., 2016. J. Proteome Res., 15, 1168-1178.
- Beaulercq S., Hennequet-Antier C., Praud C., Godet E., Collin A., Tesseraud S., Métayer-Coustard S., Bourin M., Moroldo M., Martins F., Lagarrigue S., Le Bihan-Duval E., Berri C., 2017. Scientific Reports, 7, 6447, 13 p.
- Bianchi M. Petracci M., Franchini A., Cavani C., 2006. Poult. Sci., 85, 1843-1846.
- Boerboom G.M., Van Kempen T.A.T.G., Navarro-Villa A., Perez Bonilla A., 2018. Poult. Sci., 97, 3977-3986.
- Bottje W.G., Lassiter K., Dridi S., Hudson N., Kong B.W., 2017. Poult. Sci., 96, 2454-2458.
- Bowker B., Zhuang H., 2016. Poult. Sci., 95, 1957-1965.
- Bowker B.C., Maxwell A.D., Zhuang H., Adhikari K., 2018. Poult. Sci., 97, 2966-2970.
- Brambila G.S., Bowker B.C., Zhuang H., 2016. Poult. Sci., 95, 2472-2476.
- Brambila G.S., Bowker B.C., Chatterjee D., Zhuang H., 2018. Poult. Sci., 97, 1762-1767.
- Cai K., Shao W., Chen X., Campbell Y.L., Nair M.N., Suman S.P., Beach C.M., Guyton M.C., Schilling M.W., 2018. Poult. Sci., 97, 337-346.
- Cemin H.S., Vieira S.L., Stefanello C., Kindlein L., Ferreira T.Z., Fireman A.K., 2018. Poult. Sci., 97, 1832-1840.
- Clark D.L., Walter K.G., Velleman S.G., 2017. Poult. Sci., 96, 4085-4095.
- Cruz R.F.A., Vieira S.L., Kinlein L., Kipper M., Cemin H.S., Rauber S.M., 2017. Poult. Sci., 96, 501-510.

- Cordova-Noboa H.A., Oviedo-Rondon E.O., Sarsour A.H., Barnes J., Ferzola P., Rademacher-Heilshorn M., Braun U., 2018a. *Poult. Sci.*, 97, 2479-2493.
- Cordova-Noboa H.A., Oviedo-Rondon E.O., Sarsour A.H., Barnes J., Saptoca D., Lopez D., Gross L., Rademacher-Heilshorn M., Braun U., 2018b. *Poult. Sci.*, 97, 2494-2505.
- Dalgaard L.B., Rasmussen M.K., Bertram H.C., Jensen J.A., Moller H.S., Aaslyng M.D., Hejbol E.K., Pedersen J.R., Elsser-Gravesen D., Young J.F., 2018. *Internat. J. Food Sci. Technol.*, 53, 1744-1752.
- Dalle Zotte A., Tasionero G., Russo E., Longoni C., Cecchinato M., 2015. *Poult. Sci.*, 94, 2114-2123.
- Daughtry M.R., Berio E., Shen Z., Suess J.R., Shah N., Geiger A.E., Berguson E.R., Dalloul R.A., Persia M.E., Shi H., Gerrard D.E., 2017. *Poult. Sci.*, 96, 3457-3464.
- Fare E.L., Babak M.P., Abasht B., 2017. *J. Anim. Sci.*, 95, suppl. 4, 24.
- Ferreira T.Z., Casagrande R.A., Vieira S.L., Driemeier D., Kindlein L., 2014. *J. Applied Poult. Res.*, 23, 1-6.
- Ferreira T.Z., Cemin H., Cruz R., Vieira S.L., Nascimento V., Kindlein L., 2016. *Proc. International Poult. Scientific Forum, Atlanta, Georgia (USA)*, 25-26/01/16, M58.
- Gratta F., Birolo M., Ballarin C., Bertotto D., Radaelli G., Piccirillo A., Xiccato G., Trocino A., 2017. *Proceed. XXIIIth European Symposium on the Quality of Poultry Meat, Edimburgh (UK)*, 3-5/09/17, Meat V, CS 1.
- Jojkic Z., Stojanovic S., Zikic D., Bjedov S., Milosevic V., Miler M., Uscebrka G., 2018. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 24 (6), 859-865.
- Kawasaki T., Iwasaki T., Yamada M., Yoshida T., Watanabe T., 2018. *PLoS One*, 13 (2), e0193307, 14 p.
- Kijowski J., Kupinska E., Kaczmarek A., Stangierski J., Popiol A., 2009. *Medycyna Weterynaryjna*, 65 (7), 466-471.
- Kijowski J., Kupinska E., Stangierski J., Tomaszewska-Gras J., Szalewski T., 2014. *World's Poult. Sci. J.*, 70, 125-138.
- Kuttappan V.A., Brewer V.B., Clark F.D., Mac Kee S.R., Meullenet J.F., Emmert J.L., Owens C.M., 2009. *Poult. Sci.*, 88 (E-Suppl.1), 136-137.
- Kuttappan V.A., Goodgame S.D., Bradley C.D., Mauromoustakos A., Hargis B.M., Waldroup P.W., Owens C.M., 2012a. *Poult. Sci.*, 91, 3230-3235.
- Kuttappan V.A., Brewer V.B., Apple J.K., Waldroup P.W., Owens C.M., 2012b. *Poult. Sci.*, 91, 2677-2685.
- Kuttappan V.A., Lee Y.S., Erf G.F., Meullenet J.F.C., Mac Kee S.R., Owens C.M., 2012c. *Poult. Sci.*, 91, 1240-1247.
- Kuttappan V.A., Shiva Prasad H.L., Shaw D.P., Valentine B.A., Hargis B.M., Hargis F.D., Mac Kee S.R., Owens C.M., 2013a. *Poult. Sci.*, 92, 331-338.
- Kuttappan V.A., Huff G.R., Huff W.E., Hargis B.M., Apple J.K., Coon C., Owens C.M., 2013b. *Poult. Sci.*, 92, 339-345.
- Kuttappan V.A., Brewer V.B., Mauromoustakos A., Mac Kee S.R., Emmert J.L., Meullenet J.F., Owens C.M., 2013c. *Poult. Sci.*, 92, 811-819.
- Kuttappan V.A., Hargis B.M., Owens C.M., 2016. *Poult. Sci.*, 95, 2724-2733.
- Kuttapan V.A., Bottje W., Rammathan R., Hartson S.D., Coon C.N., Kong B.W., Owens C.M., Vazquez-Anon M., Hargis B.M., 2017a. *Poult. Sci.*, 96, 2992-2999.
- Kuttapan V.A., Owens C.M., Coon C.N., Hargis B.M., Vazquez-Anon M., 2017b. *Poult. Sci.*, 96, 3005-3009.
- Lien R.J., Bilgili S.F., Hess J.B., Joiner K.S., 2011. *Watt Poult. USA*, 5, 15-18.
- Lien R.J., Bilgili S.F., Hess J.B., Joiner K.S., 2012. *J. Applied Poult. Res.*, 21 (3), 556-562.
- Lima N., Montagna F., Garcia R., Nääs I., Caldara F., 2016. *Proc. International Poult. Scientific Forum, Atlanta, Georgia (USA)*, 25-26/01/16, P255.
- Livingston M.L., Landon C., Barnes H., Brake J., 2016. *Proc. International Poult. Scientific Forum, Atlanta, Georgia (USA)*, 25-26/01/16, M88.
- Livingston M.L., Ferket P.R., Brake J., Livingston K.A., 2018a. *Poult. Sci. (sous presse)*, 11 p.
- Livingston M.L., Landon C., Barnes H., Brake J., 2018b. *Poult. Sci. (sous presse)*, 10 p.
- Malila Y., U-Chupaj J., Srimarut Y., Chaiwiwattrakul P., Uengwetwanit T., Arayamethakorn S., Punyapornwithaya V., Sansamur C., Kirschke C., Huang L., Tepasamorndech S., Petracci M., Rungrassamee W., Visessanguan W., 2018. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.*, 31 (11), 1807-1817.
- Maxwell A.D., Bowker B.C., Zhuang H., Chatterjee D., Adhikari K., 2018. *Poult. Sci.*, 97, 2971-2978.
- Mazzoni M., Petracci M., Meluzzi A., Cavani C., Clavanzani P., Sirri F., 2015. *Poult. Sci.*, 94 (1), 123-130.
- Meloche K.J., Dozier W.A., Bilgili S.F., 2014. *Proc. XIVth WPSA European Poult. Conf., Stavanger (Norway)*, 23-27/06/14, S126, 4 p.
- Meloche K., Fancher B., Bilgili S., Emmerson D., Dozier W., 2016. *Proc. XXVth World's Poult. Congress, Beijing (China)*, 5-9/16, S10-0026, 556.
- Meloche K., Dozier W.A., Brandebourg T.D., Starkey J.D., 2018a. *Poult. Sci. (in press)*, 14 p.
- Meloche K.J., Fancher B.I., Emmerson D.A., Bilgili S.F., Dozier W.A., 2018b. *Poult. Sci.*, 97, 1786-1793.
- Meloche K.J., Fancher B.I., Emmerson D.A., Bilgili S.F., Dozier W.A., 2018c. *Poult. Sci.*, 97, 1794-1807.
- Mudalal S., Babini E., Cavani C., Petracci M., 2014. *Poult. Sci.*, 93, 2108-2116.

- Mudalal S., Lorenzi M., Soglia F., Cavani C., Petracci M., 2015. *Poult. Sci.*, 93, 2108-2116.
- Mutryn M.F., Brannick E.M., Fu W., Lee W.R., Abasht B., 2015. *BMC Genomics*, 16, 399, 19 p.
- Oviedo-Rondon E., Cordova H., Sarsour A., Saldana B., Bernal-Arango L., Mesquita M., Fasanaro R., Wineland M., Borst L., Barnes J., 2016. *Proc. XXVth World's Poult. Congress, Beijing (China)*, 5-9/16, S10-0047, 565.
- Pampouille E., Berri C., Boitard S., Hennequet-Antier C., Beauclercq S., Godet E., Praud C., Jegou Y., Le Bihan-Duval E., 2018. *BMC Genomics*, 19:202, 14 p.
- Papah M.B., Brannick E.M., Schmidt C.J., Abasht B., 2017. *Avian Pathol.*, 46 (6), 623-643.
- Petracci M., Mudalal S., Bonfiglio A., Cavani C., 2013. *Poult. Sci.*, 92, 1670-1675.
- Petracci M., Mudalal S., Babini E., Cavani C., 2014. *Italian J. Anim. Sci.*, 13 (1), 179-183.
- Petracci M., Mudalal S., Soglia F., Cavani C., 2015. *World's Poult. Sci. J.*, 71, 363-373.
- Petracci M., Soglia F., Berri C., 2017. In *Poultry Quality Evaluation: Quality attributes and consumer values*, Petracci M. et Berri C. Eds, Woodhead Publishing, Duxford, UK, 51-75.
- Radaelli G., Piccirillo A., Birolo M., Bertotto D., Gratta F., Ballarin C., Vascellari M., Xiccato G., Trocino A., 2017. *Poult. Sci.*, 96, 309-319.
- Russo E., Drigo M., Longoni C., Pezzotti R., Fasoli P., Recordati C., 2015. *Poult. Sci.*, 94, 1843-1848.
- Schilling M.W., Suman S.P., Zhang X., Nair M.N., Desai M.A., Cai K., Ciaramella M.A., 2017. *Meat Sci.*, 132, 131-138.
- Sihvo H.K., Immonen K., Puolanne E., 2013. *Vet. Pathol.*, 51, 619-623.
- Sihvo H.K., Linden J., Airas N., Immonen K., Valaja J., Puolanne E., 2017. *Vet. Pathol.*, 54 (1), 119-128.
- Sihvo H.K., Airas N., Linden J., Puolanne E., 2018. *J. Comp. Pathol.*, 161, 1-10.
- Siller W.G., 1985. *Poult. Sci.*, 64, 1591-1595.
- Sirri F., Maiorano G., Tavaniello S., Chen J., Petracci M., Meluzzi A., 2016. *Poult. Sci.*, 95, 1813-1824.
- Soglia F., Mudalal S., Babini E., Di Nunzio M., Mazzoni M., Sirri F., Cavani C., Petracci M., 2016a. *Poult. Sci.*, 95, 651-659.
- Soglia F., Canonico L., Laghi L., Cavani C., 2016b. *Proc. XXVth World's Poult. Congress, Beijing (China)*, 5-9/09/2016, S10-0037, 560.
- Soglia F., Baldi G., Laghi L., Mudalal S., Cavani C., Petracci M., 2018. *Anim.* 12 (10), 2198-2204.
- Sun X., Koltjes D.A., Coon C.N., Chen K., Owens C.M., 2018. *Poult. Sci.*, 97, 2600-2606.
- Sundekilde U.K., Rasmussen M.K., Young J.F., Bertram H.C., 2017. *Food Chem.*, 217, 151-154.
- Tasionero G., Cullere M., Dalle Zotte A., 2016. *Proc. XXVth World's Poult. Congress, Beijing (China)*, 5-9/16, S10-0036, 560.
- Tasionero G., Bertram H.C., Young J.F., Dalle Zotte A., Puolanne E., 2017. *LWT Food Sci. Technol.*, 86, 20-24.
- Thornton G., 2016. The expanding market for slow-growing broilers. *Watt Poult.*, October 2016, 22-26.
- Tijare V.V., Yang F.L., Kuttappan V.A., Alvarado C.Z., Coon C.N., Owens C.M., 2016. *Poult. Sci.*, 95, 2167-2173.
- Traffano-Schiffo M.V., Giraldez M.C., Colom R.J., Fito P.J., 2017. *Sensors*, 17, 1024, 14 p.
- Traffano-Schiffo M.V., Giraldez M.C., Herrero V., Colom R.J., Fito P.J., 2018. *J. Food Engineer.*, 237, 137-145.
- Trocino A., Gratta F., Birolo M., Piccirillo A., Tiengo L., Xiccato G., 2017. *Proc. XXIIIth European Symposium on the Quality of Poultry Meat, Edinburgh (UK)*, 3-5/09/17, Meat III, CS 2.
- Velleman S.G., Clark D.L., 2015. *Avian Diseases*, 59, 410-418.
- Wedekind K., Wineman T., Atwell C., Vazquez-Anon M., Escobar J., Chen J., 2016. *Proc. International Poult. Scientific Forum, Atlanta, Georgia (USA)*, 25-26/01/16, M10.
- Wyss M., Kaddurah-Daouk R., 2000. *Physiol. Rev.*, 80, 1107-1213.
- Wold J., Veiseth-Kent E., Host V., Lovland A., 2017. *PLoS One*, 12 (3), e0173384, 16 p.
- Xiao S., Owens C., 2016a. *Proc. International Poult. Scientific Forum, Atlanta, Georgia (USA)*, 25-26/01/16, P211.
- Xiao S., Owens C., 2016b. *Proc. International Poultry Scientific Forum, Atlanta, Georgia (USA)*, 25-26/01/16, P214.
- Yalcin S., Ozkan S., Polat M., 2015. *Proc. XXIIth European Symposium on the Quality of Poultry Meat, Nantes (France)*, 10-13/05/15, 52.
- Young J.F., Rasmussen M.K., Bertram H.C., Blaabjerg L.O., Punzi E., Pedersen J.R., Elsser-Gravesen D., 2016. *Proc. XXVth World's Poult. Congress, Beijing (China)*, 5-9/16, S10-0065, 573.
- Zahoor I., Mitchell M.A., Hall S., Beard P.M., Gous R.M., De Koning D.J., Hocking P.M., 2016. *Brit. Poult. Sci.*, 57 (1), 134-141.
- Zanetti M.A., Tedesco D.C., Schneider T., Teixeira S.T.F., Daroit L., Pilotto F., Dickel E.L., Santos S.P., Dos Santos L.R., 2018. *Ciencias Agrarias, Londrina*, 39 (2), 887-892.
- Zhuang H., Chatterjee D., Bowker B., Rincon A.M., Sanchez-Brambila G., 2016. *Proc. 62nd International Congress of Meat Science and Technology, Bangkok (Thailand)*, 14-19/08/16, 4 p.
- Zhuang H., Bowker B., 2018. *Poult. Sci.* (sous presse), 4 p.

Zimmermann F.C., Fallavena L.C.B., Salle C.T.P., Moraes H.L.S., Soncini R.A., Barreta M.H., Nascimento V.P., 2012. Avian Diseases, 56 (2), 418-421.

Tableau 1. Progrès réalisés sur le poids, l'âge à l'abattage et le rendement en filets des poulets entre 1957 et 2012 (Petracci *et al.*, 2015)

Année	Souche	Poids vif, g	Age, j	Poids filet, g	Rendement filet, %
1957	Athens	2078	57	280	13,5
2001	Ross 308	2207	43	349	15,8
2007	Ross 308	2200	36	410	18,6
2012	Ross 308	2200	35	464	21,1

Figure 1. Défauts de qualité de viande de poulets

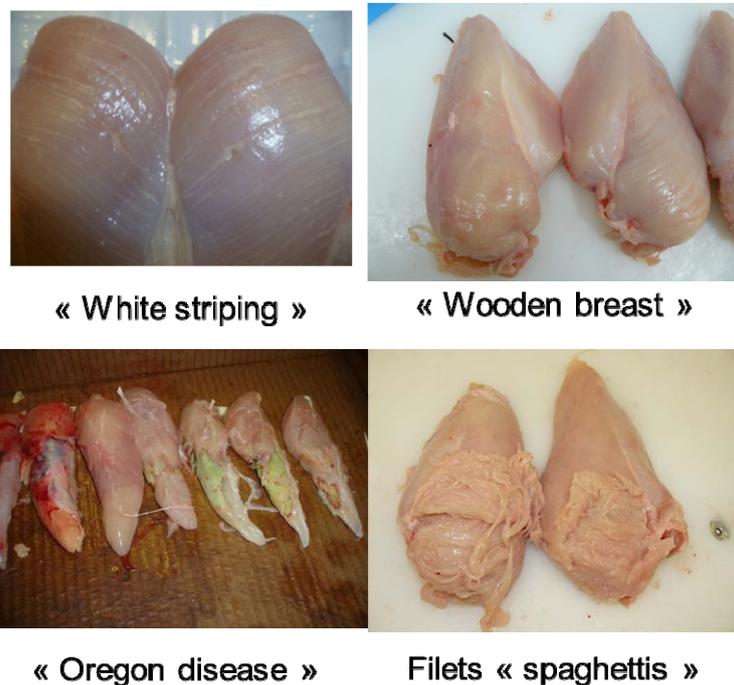


Tableau 2. Expression de gènes dans le filet de 3 lignées de poulets : A et B = souches à croissance rapide atteintes ou non du défaut « wooden breast » (WB), C = souche à croissance lente (Velleman et Clark, 2015)

	Lignée A		Lignée B		Lignée C
	WB	Normal	WB	Normal	Normal
MYOD1	16,3	7,3	12,1	10,9	6,0
Myogénine	19,4	2,7	19,7	3,6	1,4
Décorine	43,1	6,6	25,8	3,9	1,6
Myostatine	22,7	12,0	16,2	16,1	7,3
TGF-β	5,4	2,3	4,2	1,6	1,2

MYOD1 = marqueur de prolifération ; Myogénine = marqueur de différenciation ; Décorine = protéoglycane localisé dans la matrice extracellulaire du muscle et régulateur de la fibrillogénèse du collagène ; TGF-β et Myostatine = inhibiteurs de la prolifération et de la différenciation des cellules satellites.

Tableau 3. Effet des défauts « white striping » (WS) et « wooden breast » (WB) sur la qualité sensorielle et technologique des filets de poulets (Mudalal *et al.*, 2015 ; Mazzoni *et al.*, 2015)

	Normaux	Filets WS	Filets WB	Filets WS + WB
Filets crus				
pHu	5,80	5,90	5,87	6,04
Exsudat au froid, %	0,93	0,72	1,19	1,03
Résistance à la compression, kg	2,02	2,28	4,02	3,33
Filets cuits				
Pertes en jus à la cuisson, %	21,6	24,7	28,0	29,5
Résistance à la compression, kg	2,37	2,35	2,19	2,21
Filets marinés				
Prise de marinade, %	13,15	9,33	6,94	6,24
Pertes à la cuisson, %	15,3	15,0	17,4	18,7
Rendement technologique, %	94,5	92,0	87,3	85,6

Figure 2. Effet de la teneur en lysine digestible du régime croissance (15-25 jours) sur la proportion de filets jugés normaux (note 0) et modérément (note 1) ou sévèrement atteints (note 2) par le défaut « wooden breast » (observations réalisées sur des poulets abattus à 41 jours)

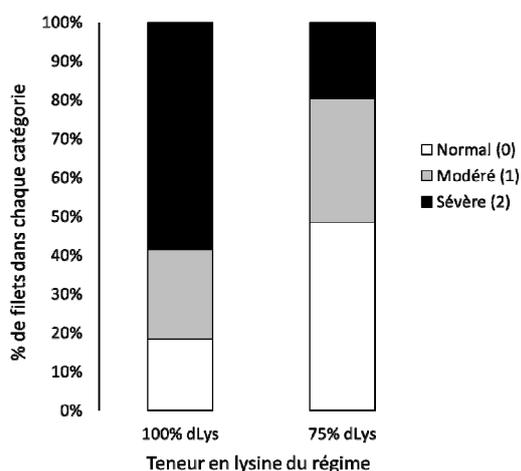
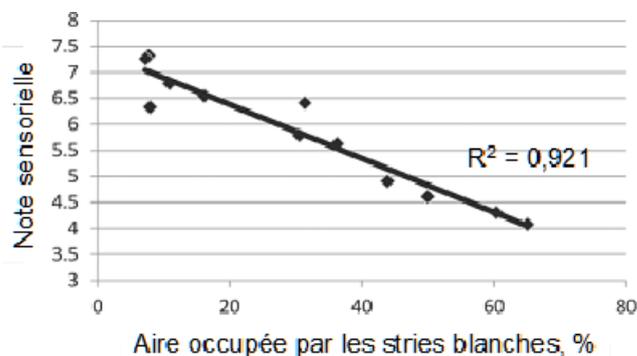


Figure 3. Corrélation entre la note d'analyse sensorielle du filet de poulet et la surface occupée par les stries blanches (Kuttappan *et al.*, 2012c)



SESSION
HYGIENE ET QUALITE
DES PRODUITS

Communication orale

**CIRCULATION D'ISOLATS PERSISTANTS ET COMMUNS DE
SALMONELLA ENTERITIDIS A TRAVERS LES FILIERES
AVICOLES ET BOVINES**

**Louise Baugé¹, Valérie Rose¹, Françoise Le Gall¹,
Marianne Chemaly¹ et Laetitia Bonifait¹**

¹*Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Hygiène Qualité des Produits
Avicoles et Porcins, BP53, 22440 Ploufragan, France
laetitia.bonifait@anses.fr*

RÉSUMÉ

Les salmonelles représentent la deuxième cause d'infection humaine en Europe, avec 85% des cas de salmonelloses reliées à l'alimentation. Le Laboratoire National de Référence (LNR) pour *Salmonella* est chargé de collecter les isolats de *Salmonella* spp. en France, provenant des échantillons issus des contrôles officiels (arrêtés relatifs à la lutte contre les salmonelles dans les troupeaux de volailles), prélevés dans les exploitations avicoles (poules pondeuses, poulets de chair et dindes). La soucheothèque réglementaire du LNR permet ainsi de suivre l'évolution des infections à *Salmonella* spp. dans la filière avicole et de caractériser spécifiquement des souches de *Salmonella* spp. afin de rechercher l'origine de la contamination et d'établir des relations entre les isolats. Dans un premier temps, 32 isolats de *Salmonella* Enteritidis ont été caractérisés par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) en utilisant l'enzyme de restriction *Xba*I. Les dendrogrammes de *S. Enteritidis* ont révélé des pulsotypes distincts avec un indice de diversité de 0,59 et des isolats persistants et communs (100% d'identité). Dans un second temps, une sous-sélection de 17 isolats de *Salmonella* Enteritidis issus d'élevages de volailles (plusieurs bâtiments), d'élevages bovins et de sources de transport ont été caractérisés par PFGE en utilisant deux enzymes de restriction *Xba*I et *Bln*I. Parmi ces 17 isolats, 2 clusters regroupant 5 et 9 isolats, proches à 90,5%, mettent en évidence des souches de *S. Enteritidis* circulant à travers la filière avicole (différents bâtiments) mais également entre les différentes filières (bovine et avicole). Subséquemment, le cluster de 9 isolats a été caractérisé par méthode Multiple Loci VNTR Analysis (MLVA). Les résultats démontrent un lien épidémiologique entre les différents foyers et le moyen de transport utilisé entre les élevages. Ces résultats permettent ainsi d'orienter cette investigation vers une origine de contamination commune. En conclusion, ces données soulignent l'importance des barrières sanitaires tout au long de la chaîne alimentaire et renforce l'importance de maintenir la surveillance des salmonelles en France.

ABSTRACT

Persistent isolates of *Salmonella* Enteritidis circulating through avian and cattle production.

Salmonella is the second leading cause of human infection in Europe, accounting for 85% of food-related salmonellosis cases. The National Reference Laboratory (NRL) for *Salmonella* is responsible for collecting isolates of *Salmonella* spp. in France from the official control samples taken from poultry farms (laying hens, broilers and turkeys). The NRL database allows tracking the evolution of *Salmonella* spp. in the poultry sector and to specifically characterize strains of *Salmonella* spp., to investigate the source of the contamination and to establish relationships between the isolates. First, 32 isolates of *Salmonella* Enteritidis were characterized by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using *Xba*I restriction enzyme. The *S. Enteritidis* dendrograms revealed distinct pulsotypes with a diversity index of 0.59 and persistent and common isolates (100% identity). Afterward, a selection of 17 isolates of *Salmonella* Enteritidis from poultry production (several buildings), cattle production and two vehicles were characterized by PFGE using two enzymes (*Xba*I and *Bln*I). Among these isolates, 2 clusters gathering 5 and 9 isolates, close to 90.5%, highlight strains of *S. Enteritidis* circulating through the poultry production but also between different sectors (cattle and poultry). Subsequently, the cluster of 9 isolates was characterized by Multiple Loci VNTR Analysis (MLVA) method. These results showed an epidemiological link between the different outbreaks and the vehicle used between the farms, thus making it possible to direct the investigation towards a source of common contamination. In conclusion, these data highlight the importance of health barriers along the food chain and reinforce the importance of maintaining surveillance for *Salmonella* in France.

INTRODUCTION

Salmonella est une bactérie à Gram négatif responsable de la majorité des infections alimentaires en Europe. En 2016, *Salmonella* a été responsable de 94 530 cas d'infections (EFSA (European Food Safety Authority), 2017). Le nombre moyen de cas rapportés annuellement, en France, serait d'environ 9 800 mais celui-ci est sous-estimé et serait en réalité de plus de 190 000 cas (Van Cauteren et al., 2015). La filière avicole a été identifiée comme une source importante de salmonellose humaine (EFSA, 2017). Celle-ci s'effectuerait principalement par ingestion de produits contaminés crus ou insuffisamment cuits. Les salmonelles (notamment *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium*) sont capables de coloniser durablement le tractus gastro-intestinal des volailles, de manière asymptomatique, rendant difficile l'identification des élevages contaminés. Ces animaux dits "porteurs sains" peuvent excréter des bactéries dans le milieu environnant et ainsi être la conséquence de la dissémination des bactéries chez les animaux sains, dans l'environnement d'élevage mais également dans les industries agroalimentaires (Velge et al, 2005).

Salmonella enterica subsp enterica sérotype Enteritidis (*S. Enteritidis*) est l'une des causes les plus courantes de salmonellose humaine dans l'Union Européenne et en Amérique du Nord (Peters, 2015 ; Ziebell, 2017). Un sous-typage fiable des isolats est nécessaire pour la détection des épidémies ainsi que la détermination, si possible, de la source de contamination. A ce jour, l'analyse par gel d'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), reste la méthode de sous-typage standard pour *Salmonella* spp. Néanmoins, l'analyse de répétition en tandem à nombres répétés et à locus multiples (MLVA) est considérée comme une méthode complémentaire de typage rapide et reproductible, et comme un outil important pour l'investigation et la détection d'épidémies d'agents pathogènes alimentaires (Peters, 2015).

Cette étude a pour objectif d'utiliser la souchothèque réglementaire du Laboratoire National de Référence (LNR) afin de suivre l'évolution d'une contamination à *Salmonella* spp. dans la filière avicole et d'en déterminer une possible origine de contamination.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Souches bactériennes

Trente-deux isolats de *S. Enteritidis* provenant du même département français ont été choisis dans cette étude. Les isolats analysés ont été isolés entre août 2013 et novembre 2017. Parmi ces 32 échantillons, 28 souches proviennent de bâtiments avicoles, 2 souches sont issues d'élevages bovins et 2 souches proviennent de véhicules routiers motorisés (Tableau 1).

1.2. Génotypage par PFGE

Une analyse par gel d'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) des 32 isolats de *S. Enteritidis* a été réalisée à l'aide d'une enzyme de restriction *XbaI* selon le protocole décrit par Kerouanton et coll. (Kerouanton, 2007). Par la suite, sur une sous-sélection, une analyse PFGE avec deux enzymes de restriction (*XbaI* et *BlnI*) a été réalisée sur 17 de ces isolats.

Les gels ont été analysés à l'aide du logiciel Bionumerics 7.6. Les dendrogrammes de similarité réalisés pour comparer les souches de *S. Enteritidis* sont générés selon la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method Arithmetic Mean) avec une tolérance et une optimisation de 1,5%. La diversité entre les souches a été déterminée grâce à l'indice de Simpson (Hunter, 1988).

1.3. Identification de profils moléculaires par MLVA

L'identification de profils moléculaires repose sur l'identification de répétition en tandem polymorphe (VNTRs : Variable Number of Tandem Repeats). Cette analyse de plusieurs locus VNTR (MLVA : Multiple Loci VNTR Analysis) a été réalisée selon le protocole décrit précédemment par Hopkins et coll. avec pour *S. Enteritidis* l'analyse des 5 VNTRs : SENTER7-SENTER5-SENTER6-SENTER4-SE-3 (Hopkins, 2011). Le nombre d'unités répétées en tandem (TR) de chaque locus est déduit et recueilli dans un code qui devient le profil MLVA de l'organisme analysé. La caractérisation de 9 isolats de *S. Enteritidis* a été réalisée à l'aide du logiciel Bionumerics 7.6. Le dendrogramme a été obtenu par une analyse de cluster selon la méthode UPGMA.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Parmi les 32 isolats de *S. Enteritidis* isolés dans un même département français, la macro restriction enzymatique par l'enzyme *XbaI* a révélé 3 profils génotypiques distincts exposés en Figure 1. La diversité génétique observée entre tous les isolats est de 0,59. Le profil 1 est composé de 16 isolats de *S. Enteritidis*, possédant un pourcentage d'identité de 100%. Tous les isolats de ce profil sont issus de la même année et proviennent de 2 bâtiments d'élevage de volailles différents et d'un élevage de bovins. Le profil 2 est constitué de 13 isolats possédant un pourcentage d'identité de 100%. Au sein de ce profil, différentes années d'isolement (2011, 2012, 2016 et 2017) et différents élevages sont représentés. Ensemble ces deux profils génotypiques partagent un pourcentage d'identité de 95,2% et peuvent être associés dans un même cluster. Le profil 3 est composé de 3 isolats présentant un pourcentage d'identité de 100%. Ces 3 isolats présentent une année d'isolement ainsi qu'une origine différente. Conjointement, les 3 profils présentent un

pourcentage d'identité de 92,9%. Ce dendrogramme permet d'orienter l'enquête épidémiologique vers une relation entre les isolats de ce département à travers les années et les différentes filières. Dans le but de poursuivre l'investigation et de permettre une meilleure discrimination des souches, une deuxième enzyme de restriction (*BlnI*) a été réalisée sur une sélection de 17 isolats. Après digestion enzymatique (Figure 2), les isolats sont regroupés dans 4 profils génotypiques. L'ajout de la deuxième enzyme de restriction a permis de diminuer à 90,5% le pourcentage de similarité entre le profil 1 (5 isolats) et le profil 2 (9 isolats) mais surtout de permettre la séparation du profil 3 en deux profils (profil 3b et 3c) contenant respectivement 2 et 1 isolat. Conjointement, les 4 profils présentent un pourcentage d'identité de 88,4%. L'utilisation des deux enzymes de restriction conforte la relation entre ces isolats dans ce département au cours des années, entre les élevages et à travers les différentes filières bovine et avicole. De plus la présence d'isolats provenant de véhicules motorisés oriente ces résultats vers une origine de contamination commune.

Bien que la PFGE soit considérée comme la méthode de sous-typage standard actuelle pour *Salmonella* spp., celle-ci est compromise par la grande homogénéité génétique de *S. Enteritidis* (Kiebell, 2017). Par conséquent, la méthode MLVA a été réalisée pour compléter les analyses PFGE sur les 9 isolats du profil 2b présentant un pourcentage d'identité de 100% avec une digestion enzymatique par *XbaI* et *BlnI*. Cette analyse a permis de séparer ces isolats selon 2 profils (Figure 3) proche à 98,2 %. Le profil 2b' regroupe différents isolats provenant de 2 années d'isolements (2017 et 2018) et de bâtiments d'élevages de volailles différents (élevages 3, 5 et 7). Le profil 2b'', reste un profil très intéressant qui regroupe des isolats de 3 années (2016, 2017 et 2018) issus d'élevages avicoles (élevages 5, 6 et 7) et bovin (élevage 2) ainsi qu'un moyen de transport (véhicule

2). La combinaison des deux méthodes de génotypage, permet de mettre en évidence la persistance de *S. Enteritidis* dans un département et d'orienter l'investigation vers une origine de contamination commune qui serait le véhicule de transport entre les bâtiments d'élevages.

CONCLUSION

Ces résultats mettent en évidence des souches de *S. Enteritidis* circulant dans un département français à travers plusieurs élevages de la filière avicole (différents bâtiments) et bovine. Les méthodes de PFGE et MLVA appliquées conjointement ont permis d'obtenir une meilleure discrimination entre les isolats. Cette enquête a montré un lien épidémiologique entre différents foyers et le moyen de transport utilisé entre les élevages permettant ainsi d'orienter l'investigation vers une origine de contamination commune. Toutefois, des méthodes plus discriminantes, comme l'analyse de la séquence du génome entier sont nécessaires pour un sous-typage plus puissant permettant de confirmer l'origine de contamination.

En conclusion, ces données soulignent l'importance des barrières sanitaires tout au long de la chaîne alimentaire et renforce l'importance de maintenir la surveillance des salmonelles en France.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée par l'Agence Nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail (Anses), site de Ploufragan – Plouzané- Niort en collaboration avec la Direction Générale de l'Alimentation (Ministère de l'agriculture et de l'alimentation).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- EFSA (European Food Safety Authority), 2017. EFSA J. (15)
- Hopkins KL, 2011. Euro Surveill, (32), 19942–19952
- Hunter PR, 1988. J Clin Microbiol., (26), 2465–2466
- Kerouanton A, 2007. Pathog Dis, (4), 293–303
- Kiebell K1, 2017. J Microbiol Methods.(139), 29-36
- Peters T, 2015. Euro Surveill., (9)
- Van Cauweteren D., 2015. Foodborne Pathog. Dis, (12), 664–669
- Velge P, 2005. Vet Res. (3), 267-88

Tableau 1. Liste des souches de *Salmonella* Enteritidis utilisées dans cette étude. Toutes les souches sont issues du même département français.

Numéro de la souche	Souche	Année	Lieu d'isolement	Numéro de la souche	Souche	Année	Lieu d'isolement
S11LNR0253	<i>S. Enteritidis</i>	2011	Elevage volaille 3	S18TYP011	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 1
S12LNR0667	<i>S. Enteritidis</i>	2012	Elevage volaille 4	S18TYP012	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 1
S13LNR1517	<i>S. Enteritidis</i>	2013	Elevage volaille 1	S18TYP013	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 1
S14LNR2052	<i>S. Enteritidis</i>	2014	Elevage volaille 6	S18TYP014	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 2
S16LNR1595	<i>S. Enteritidis</i>	2016	Elevage volaille 5	S18TYP015	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 2
S17LNR0045	<i>S. Enteritidis</i>	2017	Elevage volaille 3	S18TYP016	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 2
S17LNR0059	<i>S. Enteritidis</i>	2017	Elevage volaille 6	S18TYP017	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 2
S18TYP001	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 7	S18TYP018	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 2
S18TYP002	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 7	S18TYP019	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 2
S18TYP003	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 5	S18TYP020	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 2
S18TYP004	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 5	S18TYP021	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 2
S18TYP005	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 5	S18TYP022	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage Bovin 1
S18TYP006	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 5	S18TYP023	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Véhicule 1
S18TYP007	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 1	S18TYP024	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage Bovin 2
S18TYP008	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 1	S18TYP025	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Véhicule 2
S18TYP009	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 1				
S18TYP010	<i>S. Enteritidis</i>	2018	Elevage volaille 1				

Figure 1. Dendrogramme représentatif des souches de *S. Enteritidis* après digestion enzymatique par *Xba*I

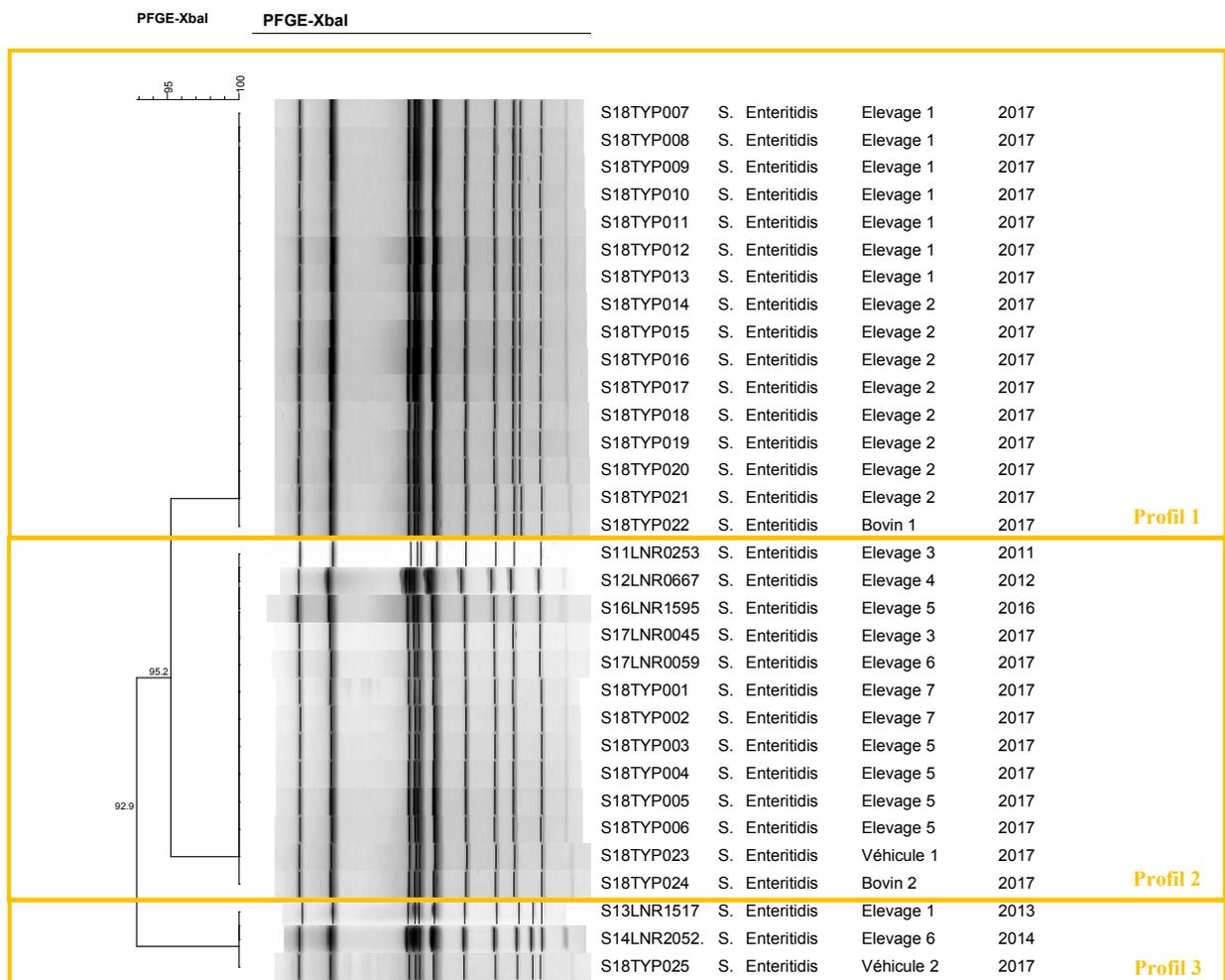


Figure 2. Dendrogramme représentatif des souches de *S. Enteritidis* après digestion enzymatique par deux enzymes de restriction (*XbaI* et *BlnI*)

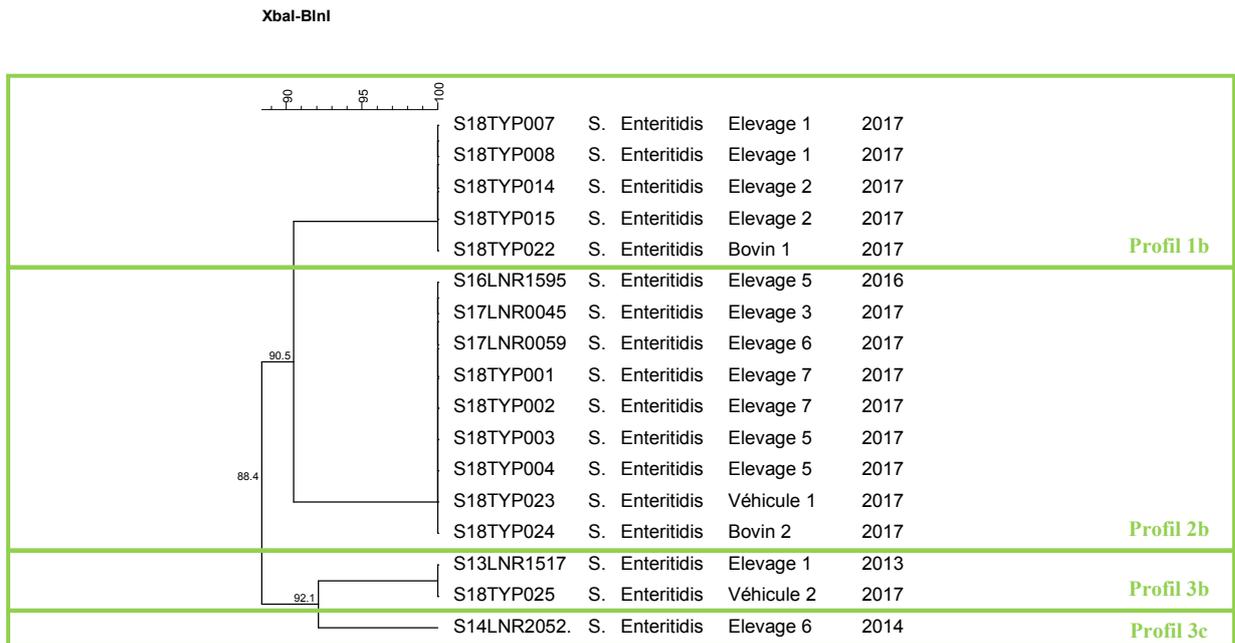
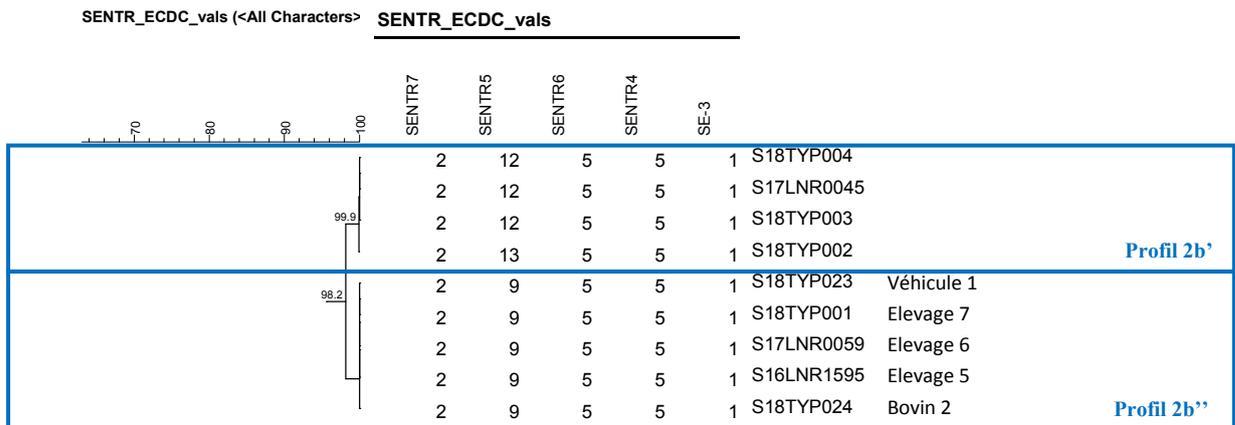


Figure 3. Dendrogramme présentant les profils des souches de *S. Enteritidis* après MLVA



SESSION
HYGIENE ET QUALITE
DES PRODUITS

SESSION
HYGIENE ET QUALITE
DES PRODUITS

Posters

CARACTERISATION DES PROTEINES DE LA MEMBRANE VITELLINE, UNE STRUCTURE IMPORTANTE POUR LA QUALITE DES ŒUFS DE POULE

Brégeon Mégane¹, Labas Valérie², Combes-Soia Lucie², Chesse Magali¹, Rehault-Godbert Sophie¹, Guyot Nicolas¹

¹*Biologie des Oiseaux et Aviculture - BOA, INRA, Université de Tours -37380 Nouzilly*

²*PAIB, PRC, INRA, Université de Tours - 37380 Nouzilly, France*

megane.bregeon@inra.fr

RÉSUMÉ

La membrane vitelline (MV) de l'œuf, située à l'interface entre le blanc et le jaune de l'œuf, est formée de deux couches protéiques : les membranes vitellines interne (MVI) et externe (MVE). Elle possède un rôle majeur dans la fécondation, l'embryogenèse et la protection de l'embryon. Près de 140 protéines différentes composent la MV, cependant leur répartition dans les 2 couches et leur(s) rôle(s) physiologique(s) restent pour la plupart inconnus. L'objectif de cette étude est donc de déterminer la composition protéique de chacune des couches de la MV et d'en déduire des fonctions qui leur sont spécifiques. La MVE et la MVI ont été séparées à partir de MVs d'œufs frais et les protéines de ces deux couches ont été indépendamment solubilisées et analysées par SDS-PAGE. Les protéines ont ensuite été identifiées par spectrométrie de masse à haute résolution et leurs fonctions ont été attribuées à partir des annotations de l'ontologie des gènes. Au total, 23 protéines ont été identifiées à l'issue de ce travail préliminaire : 9 sont communes aux deux couches de la membrane, 8 sont attribuées à la MVE et 6 à la MVI. D'après ces données, la couche interne semble intervenir dans la fertilisation tandis que la couche externe semble avoir un rôle de protection.

ABSTRACT

Characterization of the proteins of the vitelline membrane, an important structure for the chicken egg quality. The vitelline membrane (VM), located between the albumen and the egg yolk, is composed of two protein layers: the inner (IVM) and the outer (OVM) vitelline membrane layers. VM has a major role in fertilization, embryogenesis and protection of the embryo. Nearly 140 different proteins make up this membrane, but their distribution in both layers and their physiological role remain mostly unknown. The aim of this study is to determine the protein composition of each layer and thus to propose assumptions regarding their specific functions. IVM and OVM were separated from the VM of fresh eggs, and the proteins from both layers were independently solubilized and analyzed by SDS-PAGE. The proteins were then analyzed by high resolution mass spectrometry and the functions of each of the identified proteins were awarded using annotations of the gene ontology. A total of 23 proteins were identified in this preliminary study: 9 are common to both layers of the VM, 8 are specific to the OVM and 6 are specific to the IVM. According to these data, the inner layer seems to be involved in the fertilization, while the outer layer seems to have a protective role.

INTRODUCTION

La membrane vitelline (MV) est une fine membrane acellulaire translucide située entre le blanc et le jaune, ayant une épaisseur de 10 μm environ (Bellairs, 1963). Elle est composée de deux couches protéiques : la membrane vitelline interne (MVI) en contact avec le jaune, synthétisée au niveau de l'ovaire, et la membrane vitelline externe (MVE) en contact avec le blanc, sécrétée au niveau de l'infundibulum (Bain, 1969). Cette membrane est composée de nombreuses protéines. Une analyse protéomique de la MV a déjà en effet permis de mettre en évidence 137 protéines différentes, avec des niveaux d'abondance variables (Mann, 2008), mais la répartition de ces protéines entre les deux couches n'est pas connue. Les mécanismes d'élaboration des deux couches la constituant restent également à caractériser.

La MV joue un rôle crucial dans le maintien de la qualité sanitaire et dans les caractéristiques technologiques de l'œuf de consommation. Pour l'œuf à couver, elle est essentielle à la fécondation, au bon développement embryonnaire tout en assurant une protection de l'embryon. La MV limite les échanges entre le blanc et le jaune et constitue l'ultime barrière contre la pénétration bactérienne dans le jaune, milieu hautement favorable à la croissance des microorganismes. C'est une barrière de protection à la fois physique et chimique car elle contient de nombreuses protéines antimicrobiennes, telles que le lysozyme, l'ovotransferrine ou la bêta-défensine 11 aviaire (Mann, 2008). La MV fait donc partie des différents systèmes de défense de l'œuf qui contribuent à la qualité sanitaire des œufs de consommation et à couver. La MV a également une fonction importante dans l'industrie des ovoproduits. En effet, la qualité de séparation du blanc et du jaune dépend principalement de l'intégrité structurale de la MV. Sa solidité permet de limiter le taux de contamination du blanc par le jaune lorsque les casseries d'œufs cherchent à fabriquer du blanc pâtissier. Compte-tenu de l'effet négatif du jaune, même à l'état de trace, sur les propriétés moussantes du blanc d'œuf (Wang et Wang, 2009) et sur ses capacités à résister à l'invasion microbienne, la résistance de la MV est donc un paramètre critique pour la maîtrise de la qualité du blanc d'œuf. Enfin, la MV assure plusieurs fonctions physiologiques dans la reproduction aviaire. Tout d'abord, elle permet l'interaction entre l'ovocyte et les spermatozoïdes (Okumura *et al.*, 2004). Pendant les premiers jours d'incubation, elle est impliquée dans la protection de l'embryon (contre le pH alcalin du blanc et les éventuelles contaminations microbiennes) et dans le développement embryonnaire précoce (New, 1959). Enfin, elle sert de matrice pour la croissance du sac vitellin, une annexe extra-embryonnaire vascularisée qui entoure progressivement le jaune tout en dégradant la MV (Haas *et al.*, 1976).

La MV est une partie de l'œuf qui reste relativement peu étudiée. Le maintien de sa structure et de ses

propriétés physiques et fonctionnelles répond cependant à des enjeux d'ordre sanitaire et économique, aussi bien pour la filière de l'œuf de consommation (œuf coquille, ovoproduits) que celle de l'œuf à couver. L'objectif de ce travail consiste à étudier et comparer les protéomes des deux couches de la MV (MVE et MVI), afin de mieux comprendre sa structure en lien avec ses propriétés physiques et fonctionnelles.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1 Prélèvement des membranes vitellines

Des jaunes d'œufs, prélevés à partir d'œufs frais de poules pondeuses ISA Brown âgées de 60 semaines (Hendrix ISA, Ephrata USA) ont été plongés dans un tampon Tris-HCl 10 mM (pH 8) réfrigéré à 4°C. La MV a été prélevée sur les jaunes en immersion à l'aide de pinces. Elle a été lavée dans 3 bains de tampon Tris-HCl 10 mM (pH 8), puis étalée dans une boîte de pétri contenant un tampon Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM (pH 8), où les deux couches ont été séparées au moyen de pinces fines, sous une loupe binoculaire. Des pools de 10 MVI indépendantes et des pools de 10 MVE ont été réalisés pour l'analyse des profils protéiques par SDS-PAGE et pour l'analyse protéomique préliminaire.

1.2 Solubilisation et analyse SDS-PAGE des protéines

Les échantillons ont été lyophilisés, réduits en poudre et solubilisés à l'aide du surfactant ProteaseMax (Promega) 0,2%, urée 8 M, sous agitation constante pendant 50 min à 4°C, selon les recommandations du fournisseur (1 mg de protéines dans 400 μL de surfactant). La concentration en protéines des échantillons a été mesurée à l'aide du kit de dosage « DC Protein Assay » (Biorad) en utilisant une gamme d'albumine sérique bovine. Les protéines de la MVE et de la MVI ont été analysées par SDS-PAGE sur gel à 15% d'acrylamide en conditions dénaturantes. Dix microgrammes de protéines ont été déposées par puits. La migration a été réalisée pendant 20 min à 80 V dans le gel de concentration puis pendant 1,5 h à 120 V dans le gel de séparation. La détection des protéines a été réalisée au bleu de Coomassie.

1.3 Analyse protéomique des membranes

Les protéines ont été analysées par GeLC-MS/MS. Brièvement, 10 μg de protéines ont été inclus dans un gel d'acrylamide 10% sans fractionnement. Cette approche permet l'obtention d'une bande unique, permettant l'analyse d'une seule bande contenant toutes les protéines soit de la MVE, soit de la MVI. Cette bande a été découpée puis les protéines ont été digérées « in-gel » par la trypsine bovine à 12.5ng/ μl (Sequencing grade, Roche diagnostics, Paris, France) durant toute une nuit. Les digestats ont été dessalés et

concentrés en ligne par une précolonne Acclaim PepMap100 C18 trap puis séparés sur une colonne analytique phase inverse Acclaim PepMap C18 (ThermoFisher) avec un débit de 300 nL/min (équilibration de la colonne avec 96% de solvant A (0.1% acide formique/2% acétonitrile) et 4% de solvant B (80% acétonitrile/15,9% H₂O/0,1% acide formique), gradient de 4 à 60% B en 180 min et palier à 99% de B pendant 10 min). Les peptides ont été analysés par un spectromètre de masse LTQ Velos Orbitrap (Thermo Electron, US) (acquisition des données faite de façon automatique entre les modes MS à haute résolution (R 60000) et MS/MS (fragmentation à basse résolution)). Les données MS et MS/MS, ont été confrontées à la taxonomie chordata de la banque NCBI grâce au serveur Mascot v2.6 (Matrix Science) via le logiciel Proteome Discoverer v2.1 (ThermoFisher) (5 ppm de précision de masse sur MS et 0.8Da sur MS/MS, modifications post-traductionnelles prises en compte : carbamidométhylation, N-terminal acétylation et oxydation des méthionines). Les données obtenues ont été intégrées au logiciel Scaffold (v 4.8.4, Proteome Software) et l'abondance relative (%) des protéines au sein de chaque échantillon a été établie sur la base du score Exponentially modified protein abundance index (EmpAI). A partir de ces données, une liste de protéines candidates a été établie, avec au moins deux peptides uniques et 95% de probabilité d'identification pour les protéines et les peptides dans le logiciel Scaffold.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Afin de caractériser aussi précisément que possible le contenu en protéines de chacune des deux couches de la MV, la séparation des deux membranes (MVE et MVI) et l'extraction des protéines à partir de ces membranes ont d'abord été mises au point en jouant sur le pH, la concentration saline et le type de tampon. Cette mise au point était nécessaire pour trouver les conditions permettant d'obtenir le maximum d'information dans chacune des couches de la MV. Les protéines solubilisées à partir de la MVE et de la MVI ont ensuite été analysées par SDS-PAGE, montrant des profils protéiques différents entre les deux couches de la MV (Figure 1). La MVE présente deux protéines majeures, avec des masses apparentes de 14 kDa et 16 kDa, et plusieurs protéines de plus hauts poids moléculaires (>40kDa) en plus faible abondance apparente. Deux protéines majeures sont identifiées à 15 kDa et 14 kDa dans la MVI, ainsi qu'une multitude de protéines moins abondantes avec des masses >30 kDa.

Les protéines extraites à partir de la MVE et de la MVI ont été concentrées en une seule bande dans un gel SDS-PAGE, digérées par la trypsine et les peptides ont été analysés par nanoLC-MS/MS. Cette approche a permis d'identifier 23 protéines majeures

différentes au sein de la MV. Certaines protéines ont été détectées uniquement dans la MVE ou dans la MVI, tandis que d'autres ont été identifiées dans les deux couches (Tableau 1). Chacune des deux couches de la MV semble posséder des protéines ayant des fonctions spécifiques. En effet, la MVI contient des protéines « Zona pellucida » (ZP1, ZP3) qui ne sont pas retrouvées au sein de la MVE. Ces protéines sont impliquées dans l'interaction entre l'ovocyte et le spermatozoïde. Par exemple, ZP3 serait impliquée dans la réaction acrosomique (événement clé lors de la fécondation, Okumura *et al.*, 2004). ZP1 joue un rôle dans l'activation des spermatozoïdes lors de l'interaction spermatozoïde-ovocyte (Okumura *et al.*, 2004). Nos données confirment donc le rôle de la MVI dans la fécondation (Howarth, 1990), et révèlent la présence d'autres protéines dont la fonction reste à caractériser. En effet, 4 protéines identifiées uniquement au sein de cette couche ont des fonctions liées au métabolisme (ATP1A1, APOB, GPX3 et ACTG1), ce qui pourrait être lié au fait que la MVI est le support de croissance du sac vitellin (Yoshizaki *et al.*, 2000). La MVI contient également 5 protéines antimicrobiennes (LYZ, TF, AvBD11, BPIFB2, VMO1), également retrouvées dans la MVE. La présence de ces protéines laisse ainsi penser que la MVI pourrait également jouer un rôle antimicrobien, ou qu'il s'agit d'une contamination de la MVI par de la MVE lors de la séparation des deux couches. En ce qui concerne la composition en protéines de la MVE, sur 17 protéines identifiées, 8 sont décrites comme jouant un rôle antimicrobien (LYZ, TF, OVALX, AvBD11, BPIFB2, VMO1, BMSP, PTN). Trois d'entre elles (OVALX, PTN, BMSP) sont identifiées uniquement dans cette couche. Cette richesse en protéines antimicrobiennes laisse penser que la MV joue un rôle dans la défense contre les contaminations microbiennes (Tableau 1). La MVE est également composée d'inhibiteurs de protéases (TIMP3, SPIK5), alors qu'aucun d'eux n'est retrouvé au sein de la MVI. La couche externe pourrait également jouer un rôle dans le développement embryonnaire et la croissance cellulaire car elle contient des protéines intervenant dans ces fonctions (PTN, OLFML3, BPIFB2).

Cette étude a également permis de montrer que sur les 23 protéines identifiées, 9 sont retrouvées à la fois dans la MVE et dans la MVI (Tableau 1). Il est à noter que la MVI et la MVE sont étroitement associées et qu'au cours de la séparation des membranes, des résidus de MVE ont pu rester accrochés à la MVI et inversement. De même, malgré les nombreux lavages, des protéines du blanc demeurent possiblement associées à la MVE et des protéines du jaune à la MVI. Afin de s'en affranchir, il serait intéressant de prélever et d'analyser le contenu en protéines de la MVI au niveau des follicules, où elle ne s'est pas encore trouvée en

contact avec la MVE. En effet, la MVI est synthétisée au niveau de l'ovaire tandis que la MVE est sécrétée et déposée sur la MVI dans l'oviducte au niveau de l'infundibulum, après l'ovulation.

Certaines protéines identifiées dans cette étude n'ont pas été identifiées dans le protéome de la MV réalisé par Mann en 2008. Il s'agit de : GPX3, PTN et BMSP (Tableau 1). La détection de ces trois protéines est probablement liée à l'évolution du contenu des bases de données de protéines entre ces deux études espacées de 10 ans. GPX3 est spécifique à la MVI et pourrait protéger les cellules et les enzymes des dommages oxydatifs en catalysant la réduction du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes lipidiques par le glutathion. PTN et BMSP ont été identifiées uniquement dans la MVE. Elles possèdent un rôle antimicrobien (Guyot et al., 2016) et PTN, qui est également un facteur de croissance, pourrait être impliquée dans le développement embryonnaire et notamment le développement du sac vitellin.

L'expression de différents gènes codant des protéines identifiées dans cette étude par l'approche protéomique sera examinée dans différents tissus de la poule pondeuse (oviducte, ovaire, foie) par RT-qPCR, afin de préciser la spécificité et le lieu de synthèse des protéines de la MV. Pour les constituants de la MVI, il sera notamment intéressant d'étudier les cellules de la granulosa car elles sont en contact direct avec la MVI, mais aussi les cellules de la thèque et du foie, responsables de la synthèse des protéines du jaune et

de certains constituants de la MV) (Nishio, 2014 ; Bausek et al, 2000).

La MVE étant sécrétée au niveau de l'infundibulum, ce tissu a également été prélevé ainsi que du magnum (segment de l'oviducte responsable de la synthèse des protéines du blanc).

CONCLUSION

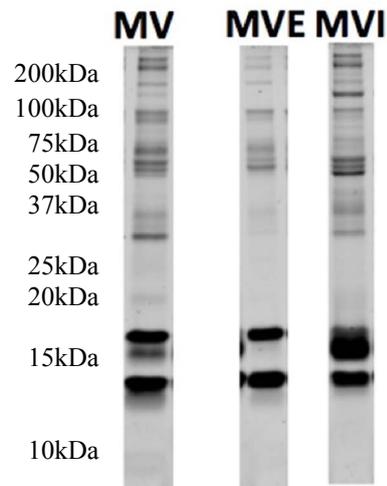
Cette étude préliminaire a permis de caractériser pour la première fois la composition en protéines majeures de la MVE et de la MVI. Certaines protéines ont été identifiées pour la première fois au sein de la MV. Les données générées suggèrent à la fois des fonctions communes et d'autres distinctes entre les deux couches de la MV. Cette première approche sera complétée par une analyse protéomique plus exhaustive qui permettra d'identifier un nombre plus important de protéines (analyse en plusieurs bandes), et par une étude expressionnelle par RT-qPCR afin de préciser les sites de synthèse des constituants. De nombreuses connaissances originales et fondamentales seront générées sur la formation de l'œuf et la reproduction aviaire. Ce projet contribuera également à terme, à fournir des éléments nouveaux qui pourront servir de base à l'élaboration d'une stratégie visant à renforcer ou à préserver la qualité de la MV (ex : identification de marqueurs de solidité de la MV utilisables en sélection) dont l'enjeu pour la filière « œufs » est particulièrement important, tant pour la qualité sanitaire que pour la mise en œuvre industrielle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Back J F, Bain J M, Vadehra D V and Burley R W, 1982. *Biochim Biophys Acta* 705(1), 12-19.
- Bain J and Hall M, 1969. *Aust J Biol Sci*, 22(3), 653-665
- Bausek N, Waclawek M, Schneider WJ, Wohlrab F, 2000. *J Biol Chem*, 275(37):28866-72
- Bellairs R, Harkness M and Harkness R D. 1963. *J Ultrastructure Research*, 8(3-4), 339-359.
- Da Silva, M., S. Beauclercq, G. Harichaux, V. Labas, N. Guyot, J. Gautron, Y. Nys, and S. Rehault-Godbert. 2015. *Biol. Reprod.* 93:71-77.
- Guyot N, Labas V, Harichaux G, Chessé M, Poirier JC, Nys Y, Réhault-Godbert S. *Sci Rep.* 2016 Jun 13;6:27974.
- Haas HJ, Spratt NT Jr., 1976. *Anat Rec.* 184(2):227-31.
- Howarth B Jr. 1990. *Poult Sci* ,69 1012—1015
- Hughey VL and Johnson E A, 1987. *Appl Environ Microbiol.* 53(9): 2165-2170.
- Kido, S, Doi, Y, Kim, F, Morishita E, Narita H, Kanaya S ,Ooi T, 1995. *J Biochem.* 117(6), 1183-1191
- Maehashi, K., Ueda, M., Matano, M., Takeuchi, J., Uchino, M., Kashiwagi, Y., and Watanabe, T. 2014. *J. Agric. Food Chem.* 62, 5156-5162
- Mann K. 2008. *Proteomics*, 8(11): 2322-32.
- New D A T, *Development*, 1959 7: 146-164
- Nishio S, Kohno Y, Iwata Y, Arai, M, Okumura H, Oshima K, et al (2014). *Biol Reprod*, 91(5).
- Okumura H, Kohno Y, Iwata Y, Mori H, Aoki N, Sato C, Kitajima K, Nadano D, 2004. *Biochem J.* 384(Pt1):191-9.
- Rehault-Godbert, S., Labas, V., Helloin, E., Herve-Grepinet, V., Slugocki, C., Berges, M., Bourin, M.-C., Brionne, A., Poirier, J.-C., Gautron, J., Coste, F., and Nys, Y. 2013. *J. Biol. Chem.* 288, 17285-17295
- Saxena, I., and S. Tayyab. 1997. *Cell. Mol. Life Sci.* 53:13-23.
- Valenti P, Antonini G, Von Hunolstein C, Visca P, Orsi N, Antonini E. 1983. *Int J Tissue React.* 5(1):97-105.
- Wang G, Wang T. 2009. *J Food Sci.* 74(2):C147-56
- Yoshizaki N, Yamaguchi W, Ito S, Katagiri C. 2000. *Zoological Science* 17(6):751-758.

Figure 1. Caractérisation des protéines de la membrane vitelline de l'œuf de poule

Analyse SDS-PAGE (15% acrylamide en conditions dénaturantes, 10 µg de protéines par puits) des protéines de la MV (MVE+MVI), de la MVI et de la MVE d'œufs frais.

**Tableau 1.** Identification des protéines de la membrane vitelline

Fonction supposée à partir de publications ou de Uniprot.org et localisation (MVE vs MVI) des 23 protéines identifiées

Protéines identifiées	Nom des protéines	Fonction résumée	Site d'identification
OLFML3	Olfactomedin 3	Développement embryonnaire	MVE
PIGR	Polymeric immunoglobulin receptor	Récepteur des immunoglobulines	
TIMP3	Metalloproteinase inhibitor 3	Inhibiteur de métalloprotéases	
BMSP	Bêta-microsésminoprotéine-like	Protéine antimicrobienne (Guyot <i>et al.</i> , 2016)	
PTN	Pléiotrophine	Protéine antimicrobienne (Guyot <i>et al.</i> , 2016) et facteur de croissance	
OVALX	Ovalbumin-related protein X	Protéine antimicrobienne (Réhault-Godbert <i>et al.</i> , 2013)	
SPIK5	Ovoinhibiteur	Inhibiteur de protéases à sérine (Saxena et Tayyab, 1997)	
RARRES2	Retinoic acid receptor responder protein 2	Régulation du processus catabolique des lipides	
LYZ	Lysozyme	Protéine antimicrobienne (Huguey <i>et al.</i> , 1987)	MVE/MVI
VMOI	Vitelline Membrane Outer layer protein 1	Protéine antimicrobienne (Guyot <i>et al.</i> , 2016)	
OVAL	Ovalbumin	Source d'acides aminés pour l'embryon (Da Silva <i>et al.</i> , 2015)	
AvBD11	Bêta-défense aviaire 11	Protéine antimicrobienne (Guyot <i>et al.</i> , 2016)	
HEP21	Hen egg protein 21	Régulation négative du complexe d'attaque membranaire	
LOC771972			
WFDC2	WAP four-disulfide core domain protein 3	Inhibiteur d'endopeptidases	
BPIFB2	Protéine Tenp	Développement embryonnaire, famille de protéines BPI/LBP (Maehashi <i>et al.</i> , 2014)	
TF	Ovotransferrine	Protéine antimicrobienne (Valenti <i>et al.</i> , 1983)	MVI
ZP3	Zona pellucida sperm-binding protein 3	Rôle dans la fertilisation (Okumura <i>et al.</i> , 2004)	
ZP1	Zona pellucida sperm-binding protein 1	Rôle dans la fertilisation (Okumura <i>et al.</i> , 2004)	
ACTG1	Actin, gamma 1	Motilité cellulaire	
GPX3	Glutathione peroxidase 3	Réponse au stress oxydatif	
APOB	Apolipoprotein B	Intervient dans le métabolisme lipidique	
ATP1A1	ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit alpha 1	Transport d'ATP	

INFLUENCE DE LA GRAINE DE LIN ET D'UNE ASSOCIATION D'ANTIOXYDANTS SUR LA QUALITE DES ŒUFS

Catherine Hamelin¹, Nicolas Hubert¹, Mélanie Mireaux¹ et Marina Panheleux-Lebastard¹

¹*Groupe CCPA - Z.A. Nord Est du Bois de Teillay - 35150 JANZE*

chamelin@groupe-ccpa.com

RÉSUMÉ

La graine de lin est une bonne source d'acide linoléique, acide gras indispensable de type oméga 3. Ajoutée dans l'alimentation des poules, elle augmente la teneur en acides gras oméga 3 dans les œufs. Cependant, l'enrichissement en oméga 3 contribue à augmenter la sensibilité à l'oxydation de la matière grasse des jaunes. Il est donc intéressant d'étudier l'effet d'un ajout d'une association d'antioxydants (AOX) à base d'extraits de plantes et de vitamine E sur la qualité des œufs riches en oméga 3 et leur sensibilité à l'oxydation. Des poules pondeuses ISA Brown de 20 à 28 semaines d'âge ont été réparties en 4 groupes constitués chacun de 8 cages de 2 poules. Les groupes étaient les suivants : G1 = témoin, G2 = G1+4.5% de Graine de lin, G3= G1+ AOX, G4= G2+AOX. Les aliments des 4 groupes expérimentaux étaient formulés sur les mêmes bases nutritionnelles (Energie, protéine, minéraux, acides aminés). Les œufs ont été collectés et classés (% œufs sales) durant les 56 jours de distribution des aliments expérimentaux. Des pools de jaunes ont été réalisés et analysés en fin d'essai. Aucune différence significative n'a été observée sur le taux de ponte (97,8±6,0 %), ni sur le poids moyen des œufs (56,2±4,1 g). Le taux d'acide linoléique (C18 :3) dans les jaunes était supérieur pour les groupes recevant un aliment avec la graine de lin (G1=54 ; G2=623 ; G3=65 ; G4=628 mg C18:3/100g de jaunes d'œufs, 1 mesure par pool). La sensibilité à l'oxydation des jaunes d'œufs (analyse du Tbars) était significativement plus élevée pour les groupes recevant un aliment avec la graine de lin (302±63 nmol MDA/g pour G1 contre 520±142 pour G2) et significativement diminuée avec l'apport d'AOX (148±44 et 171±43 pour G3 et G4). Le taux d'œufs sales a été significativement diminué en présence d'AOX (3,74±6,5%, 5,22±8,9%, 2,28±4,9% et 1,89±3,6% pour G1, G2, G3 et G4). L'ajout d'AOX est donc intéressant dans le cadre d'une alimentation enrichie en graine de lin.

ABSTRACT

Influence of flaxseed and antioxidants association on egg quality

Flaxseed is a good source of linolenic acid, essential fatty acid of the omega 3 family. Supplemented in the diet of hens it increases the content of omega-3 fatty acids in eggs. However, enrichment in omega 3 fatty acids increases susceptibility to oxidation of the yolk fat. So, it is interesting to study the effect of a combination of antioxidants (AOX) from plants extracts and vitamin E on the omega3 enriched egg quality and the susceptibility to oxidation. ISA Brown laying hens were divided in 4 groups each of 8 cages of 2 hens. The groups were: G1 = control, G2 = G1+4.5% flaxseed, G3= G1+ AOX, G4= G2+AOX. Feed were formulated on the same nutritional basis (energy, protein, minerals, aminoacids). The eggs were collected and classified by week (dirty eggs) for 56 days. Yolks pools of the eggs collected at the end of the trial were analysed. No significant difference was observed on the laying rate (AVG = 97.8±6.0%), nor on the average weight of eggs (56.2±4.1g). The rate of linolenic acid (C18:3) in yolks was increased with flaxseed (G1=54 ; G2=623 ; G3=65 ; G4=628 mg C18 :3/100g egg yolk, one measure/pool). The sensitivity to oxidation of egg yolks (Tbars) was significantly higher for groups with flaxseed (302±63 nmol MDA/g in G1 vs 520±142 in G2) and significantly decreased with the addition of AOX (148±44 and 171±43 in G3 & G4). The rate of dirty eggs was significantly decreased in the presence of AOX (3.74±6.5%, 5.22±8.9%, 2.28±4.9% and 1.89±3.6% in G1, G2, G3 & G4). Then, the addition of AOX is interesting as part of a enriched diet with flaxseed.

INTRODUCTION

La graine de lin est une bonne source d'acide linoléique, acide gras indispensable de type oméga 3. Ajoutée dans l'alimentation des poules, elle augmente la teneur en acides gras oméga 3 dans les œufs. Cependant, l'enrichissement des œufs en oméga 3 contribue à augmenter la sensibilité à l'oxydation de la matière grasse des jaunes du fait du niveau d'insaturation de ces acides gras. Hayat et al, 2010 ont observé une augmentation de la sensibilité à l'oxydation des œufs de poules recevant un aliment avec 10% de graines de lin. L'addition de vitamine E dans l'aliment a permis, dans cette étude, de baisser le risque d'oxydation des matières grasses des œufs. Cette baisse était significative à partir de 100 ppm de vitamine E ajoutée. Ces données sont en accord avec les anciennes études de Cherian et al. (1996) et Galobart et al. (2001) qui ont montré un effet antioxydant de la vitamine E, avec respectivement des ajouts de 330 ppm et 200 ppm dans l'aliment, dans le cas d'œufs enrichis en AGPI oméga 3. En revanche, Franchini et al. (2002) n'ont pas observé d'effet de la vitamine E quand les œufs n'étaient pas enrichis en AGPI. De précédentes études réalisées sur poulet et dinde ont permis de démontrer les effets synergiques de la diversification des sources d'antioxydants (vitamine E et polyphénols) sur la diminution de la sensibilité à l'oxydation des viandes (Bébin et al. (2017), Bébin et al. (2018)). Il est donc intéressant d'étudier l'effet d'une association d'antioxydants à base de polyphénols et de vitamine E dans l'alimentation enrichie en graine de lin sur la qualité des œufs et leur sensibilité à l'oxydation. L'apport de matière grasse, via les graines de lin, peut également impacter la qualité des fientes. C'est une observation que nous faisons sur le terrain (expérience CCPA, pas de référence dans la littérature). Nous souhaitons ainsi vérifier cet aspect au travers de cette étude.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et aliments

L'essai a été évalué favorablement par le comité d'éthique des Pays de Loire. 64 poules pondeuses de 20 semaines, de souche Isa Brown, ont été réparties en 4 groupes. Chaque groupe était constitué de 8 cages de 2 poules. Les groupes expérimentaux ont reçu durant 8 semaines les aliments suivants :

- un aliment témoin avec 10 ppm (=10 UI-AOX) de vitamine E (=G1),
- un aliment formulé avec 4,5% de graines de lin et 10 ppm (=10 UI-AOX) de vitamine E (=G2),

- l'aliment témoin avec ajout d'antioxydant à base d'extraits de plantes et de vitamine E (75 UI-AOX) (=G3)

- l'aliment du groupe G2 + AOX (=G4) soit 75 UI-AOX comme G3

La composition de l'aliment témoin et de l'aliment avec graine de lin est présentée dans le tableau 1.

La vitamine E était apportée sous forme d'acétate d'alpha tocophérol. Les extraits de plantes consistaient en un mélange de polyphénols (8.7 mg/kg équivalent acide gallique méthode Folin-Ciocalteu, MEGA[®] Protect, CCPA). Les aliments des 4 groupes expérimentaux étaient formulés sur les mêmes bases nutritionnelles (Energie, protéine, minéraux, acides aminés). La composition en matières premières des formules diffèrent légèrement avec l'introduction de graines de lin (tableau 1).

1.2. Performances zootechniques

La consommation alimentaire, le nombre d'œufs pondus, leur classification (propre ou sale) et leur poids ont été enregistrés chaque semaine pour chaque case.

1.3. Mesure de la sensibilité à l'oxydation

Pour chaque groupe, un pool a été réalisé avec les jaunes d'œufs de chaque case pondus 53 jours après le début de l'essai. La sensibilité à l'oxydation du mélange de jaunes crus était mesurée en soumettant les échantillons à l'oxydation par ajout de 0,2ml d'acide ascorbique 2mM et de 0,3ml de sulfate de fer 5mM, 30 minutes à 90°C, puis mesure de la teneur en malondialdéhyde par spectrophotométrie à 535 nm (Lynch et Frei, 1993). Les résultats étaient exprimés en TBARS (nmol/g).

1.4. Analyse de la composition en acides gras

Dans chaque groupe, tous les jaunes d'œufs pondus 56 jours après le début de l'essai ont été rassemblés dans un pool. Le profil en acide gras (teneur absolue) a été caractérisé après extraction de la matière grasse à froid par un mélange dichlorométhane-éthanol. Filtration puis élimination du solvant. Reprise du résidu par l'oxyde diéthylique. Filtration, évaporation et pesée de la matière grasse extraite. Profil par CPG/FID après méthylation des acides gras.

1.5. Analyses statistiques

Les analyses ont été effectuées sur le logiciel SPSS version 19. Les données de TBARS, taux de ponte et poids moyen des œufs ont été analysées par ANOVA. Les pourcentages moyens d'œufs sales ont été comparés entre les groupes par un test non paramétrique de Kruskal Wallis.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les taux de ponte n'étaient pas différents entre les groupes (98,8±3,4 – 99,0±3,2 – 97,3±5,7 et 96,4±9,6% pour les groupes 1 à 4 respectivement p=NS), ainsi que le poids moyen des œufs (56,0±4,4 –

56,8±4,3 – 55,8±4,4 et 56,4±4,0 g respectivement ; p=NS). Ces résultats sont en accord avec Chartrin et al. (2015) qui ont observé que les performances zootechniques n'étaient pas modifiées entre des poules nourries avec 4% de graines de lin et des poules témoins. Dans cette étude, la qualité sensorielle des œufs n'était pas différente avec la graine de lin.

La teneur en oméga 3 des jaunes d'œufs était très supérieure dans les groupes 2 et 4 par rapport aux groupes 1 et 3 (en moyenne 1064±27 mg/100g de jaune contre 213±13 mg, figure 1). Plus spécifiquement, la teneur en acide linoléique (C18 :3 n-3) était en moyenne de 60±8 mg pour 100g de jaune dans les groupes sans graine de lin et de 626±4 mg/100g de jaune dans les groupes avec graine de lin (figure 2). Cet enrichissement est plus élevé que celui d'études précédentes (Chartrin et al., 2015) où la teneur en acide linoléique des œufs a été multipliée de 3,0 à 3,4 par rapport au témoin. De même, dans l'étude de Mattioli et al. (2017), avec un aliment contenant 10% de graines de lin, le contenu des œufs en C18:3n-3 n'était que doublé.

La sensibilité à l'oxydation a été augmentée en présence de graines de lin : TBARS=550±132 nmol/g dans le groupe 2 contre 298±67 nmol/g dans le groupe témoin (figure 3). Cette sensibilité à l'oxydation du jaune d'œuf, plus élevée pour le régime avec graines de lin, s'explique par la plus grande concentration des jaunes en acides gras polyinsaturés (AGPI) (Mattioli et al., 2017).

Cependant, l'ajout d'antioxydants a permis de réduire significativement cette sensibilité, jusqu'à un niveau inférieur à celui du groupe témoin sans antioxydant (TBARS= 298±67 nmol/g dans le groupe témoin AOX- et 190±18 nmol/g dans le groupe graines de lin AOX+).

Notre étude confirme ainsi les résultats de travaux précédents sur l'augmentation de la sensibilité à l'oxydation et l'intérêt de l'ajout d'antioxydant quand les œufs sont enrichis en oméga 3. La combinaison de polyphénols et de vitamine E à une dose inférieure aux travaux publiés avec vitamine E seule, permet d'apporter une solution alternative, plus économique dans le contexte de marché actuel.

Le pourcentage d'œufs sales est significativement inférieur (p=0,02) dans les groupes avec antioxydant que dans les groupes sans antioxydant (2,1±2,2% contre 4,5±6,1% ou 3,74±6,5%, 5,22±8,9%, 2,28±4,9% et 1,89±3,6% pour G1, G2, G3 et G4, figure 4). C'est un aspect original de notre étude car la classification des œufs n'a pas été étudiée dans les études de la littérature précédemment mentionnées.

CONCLUSION

L'association de molécules aux propriétés antioxydantes (vitamine E et polyphénols) permet de réduire la sensibilité à l'oxydation des matières grasses du jaune de l'œuf enrichi en acides gras oméga 3. Elle permet également de diminuer le taux d'œufs sales. Cette association présente de ce fait un intérêt économique non négligeable.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bébin K. et al, 2017. 12^{ème} JRA-JRPFPG, Tours, pp1091-1095
 Bébin K. et al, 2018. The XV European Poultry Conference, Dubrovnik, p495
 Chartrin et al., 2015. 11^{ème} JRA-JRPFPG, Tours, pp1128-1132
 Cherian, G. et al., 1996. Poultry Sci. (75) 423–431.
 Galobat J. et al., 2001. Poultry Sci. (80) 460–467
 Hayat Z. et al, 2010. Poultry Sci. (89), 1285–1292
 Lynch et Frei, 1993. Journal of lipid research, 34, 1745-1753
 Mattioli S. et al, 2017. Animal (11) 4, 705–712
 Franchini A. et al., 2002. Poultry Sci. (81), 1744 -1750

Tableau 1. Composition et valeur nutritionnelle des régimes

Composition (%)	Aliment	
	Aliment Témoin	avec graine de lin
Maïs	22.5	19.3
Blé	39.93	38.9
Son	3.4	2
T. soja	18.4	13.4
T. colza	2	4
T. tournesol	2	5.8
Huile de soja	0.4	0.7
Bicarbonate Na	0.19	0.21
Phos Bica	0.46	0.45
Carbonate	7.18	7.14
Sel	0.22	0.2
Meth/blé	0.93	0.86
L-Lys/Blé	0.09	0.24
Graines de lin	-	4.5
AMV	2.3	2.3
Valeurs nutritionnelles (%)		
EMA (kcal/kg)	2710	2710
MG	2.19	3.33
C 18:2	1.08	1.30
C 18:3	0.09	0.67
PB	16.51	16.51
LYS DIG	0.70	0.70
Ca	3.49	3.49
P ass	0.33	0.33
Na	0.15	0.15
Cl	0.21	0.21

Figure 1. Teneur en acides gras oméga 3 des jaunes d'œufs (56 jours après le début d'essai)

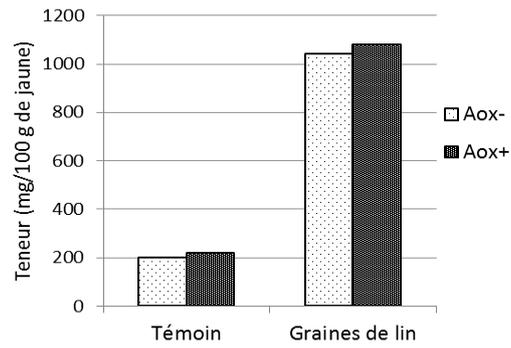


Figure 2. Teneur en C18-3 n-3 des jaunes d’œufs (56 jours après le début d’essai)

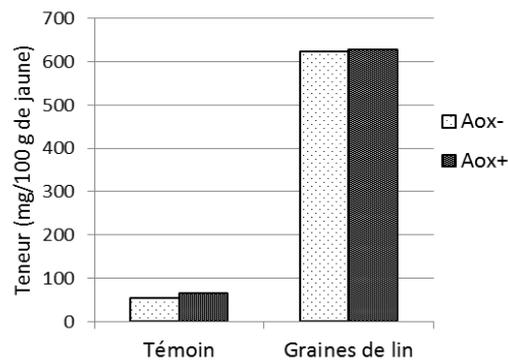


Figure 3. TBARS sur mélanges liquides de jaunes d’œufs crus (53 jours après le début d’essai)

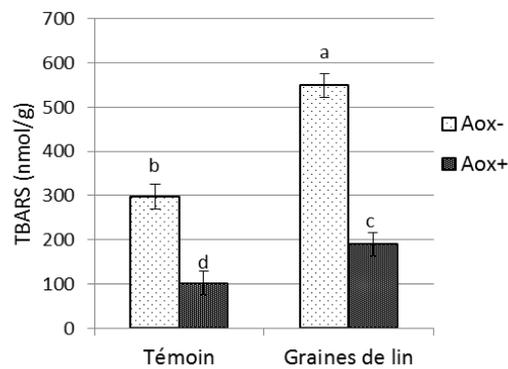
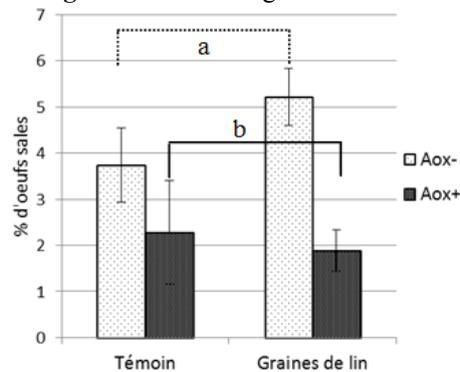


Figure 4. Pourcentage d’œufs sales



MAITRISE DES CONDITIONS D'AMBIANCE PENDANT UNE ATTENTE PROLONGEE DU POUSSIN D'UN JOUR AU COUVOIR AVANT LA MISE EN ELEVAGE : QUELS IMPACTS SUR LA ROBUSTESSE DES ANIMAUX ?

Puterflam Julie¹, Galliot Pascal¹, Thomas Rodolphe², Keita Alassane², Michel Virginie², Guinebretière Maryse²

¹ITAVI 22440 – 41 rue Beaucemaine - 22400 PLOUFRAGAN

²ANSES 22440 – 41 rue beaucemaine – 22400 PLOUFRAGAN
puterflam@itavi.asso.fr

RÉSUMÉ

La robustesse des poussins d'un jour est un paramètre crucial à optimiser afin d'assurer leur bien-être, de limiter leur mortalité, et de réduire l'usage des antibiotiques au démarrage et tout au long de la période d'élevage. L'âge des reproducteurs ainsi que la durée d'attente des poussins au couvoir peuvent avoir un impact négatif sur leur robustesse. Cette étude a eu pour objectif de tester des conditions d'ambiance optimisées pendant une attente prolongée (24 heures) avant la mise en élevage de deux lots de poussins issus de reproducteurs en début de ponte (DP) et en fin de ponte (FP). Pour chaque lot (DP, FP), 2 conditions d'attentes au couvoir étaient comparées : (**T**) poussins placés en caisses empilées en condition d'ambiance non contrôlée et (**A**) poussins placés en caisses avec plus d'espace disponible par animal, en ambiance contrôlée, et avec un espace vide entre chaque caisse pour améliorer la circulation d'air. On observe pour les DP et les FP qu'en comparaison avec le groupe T, le groupe A présente une perte de poids moindre entre l'éclosion et l'arrivée à l'élevage, des poids supérieurs jusqu'à J12, une température cloacale supérieure à J1, et un rendement filet supérieur à l'abattage. Par contre, il n'a pas été montré de diminution significative de la mortalité au démarrage ou en cours de lot.

ABSTRACT

Control of environmental conditions during a long wait for the day-old chick at the hatchery before breeding: what are the impacts on the quality and welfare of the animals?

The robustness of day-old chicks is a crucial parameter to optimize in order to ensure their welfare, to limit their mortality, and to reduce the use of antibiotics. The age of the breeders as well as the waiting duration in the hatchery can have a negative impact on their robustness. The aim of this study was to test optimized environmental conditions during a prolonged wait (24 hours) before breeding of two sets of day-old chicks from breeders at the beginning of laying (DP) and at the end of laying (FP). For each batch (DP, FP), 2 conditions at the hatchery were compared: control (T): chicks placed in stacked crates under standard ambient conditions VS controlled atmosphere + reduced density (A): chicks placed in cases of lower density, in controlled environment, and with empty space between each box to improve air circulation. DPs and FPs found that Group A significantly have less in weight loss between hatching and arrival at the farm, a significant increase in weight at D12 in FPs, a cloacal temperature greater at D1, and at slaughter a higher breast yield. On the other hand, no significantly reduction of mortality at start-up or during the batch was shown.

INTRODUCTION

La robustesse des poussins définit leur capacité à endurer différents stress tout en conservant un potentiel de production élevé. Il s'agit d'une notion essentielle à l'adaptabilité des animaux à leur environnement d'élevage et au maintien de leur santé, menant à la réduction de l'usage des antibiotiques durant la phase d'élevage. La robustesse des poussins peut être impactée de façon négative par l'âge des reproducteurs lors de la ponte et par la durée d'attente des poussins avant la mise en élevage (Bergoug et al, 2012). Willemsem et al (2010) ont indiqué qu'une longue période d'attente des poussins avant le premier accès à la nourriture dégradait les performances zootechniques des poulets, surtout au cours de la première semaine d'élevage. Ces effets néfastes sont d'autant plus marqués lorsque les poussins sont exposés à un stress thermique (Al Alquil et al, 2009). L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact d'une optimisation des conditions d'ambiance lors d'une attente prolongée de poussins issus de reproducteurs en début ou fin de ponte, sur différents indicateurs de robustesse de ces poussins (qualité, performances zootechniques, mortalité, santé...).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Origine des poussins

Les poussins sont issus de deux élevages de reproducteurs de souche Ross 308 : l'un en début de ponte (DP : 28 semaines) et l'autre en fin de ponte (FP : 52 semaines). Les œufs à couvrir ont été stockés pendant 7 jours puis mis à incuber ensemble avec un programme classique en couvoir de production. A l'issue de l'éclosion les poussins ont été triés, vaccinés, puis stockés pendant une durée de 24 h avant leur transport à l'élevage.

Afin de pouvoir dissocier les effets de l'âge des reproducteurs des effets des conditions d'attente, les deux lots DP et FP ont été considérés pour la suite de l'étude comme 2 expérimentations séparées.

1.2. Traitement des poussins

Les poussins DP et FP ont été séparés chacun en deux groupes de 1550 animaux :

Groupe témoin (T)

Les poussins ont été mis en caisse avec un espace disponible par poussin de 21 cm². Les caisses étaient empilées dans le sas situé entre la salle de stockage et le quai de chargement. L'ambiance (température, hygrométrie) n'était pas contrôlée, et susceptible d'être modifiée par des variations dues à l'ouverture des portes. Ces conditions sont considérées comme standard dans l'industrie.

Groupe ambiance optimisée (A)

Les poussins ont été mis en caisse avec un espace disponible par poussin plus important (28 cm²) pour favoriser la circulation d'air dans les caisses. Les caisses étaient empilées dans une salle de stockage à ambiance optimale stable et contrôlée (température de l'air : 24-25°C, et hygrométrie : 55-60%, consignes issues de Mitchell et al., 2009) avec une caisse vide entre chaque caisse de poussins de façon à favoriser la circulation de l'air entre les caisses, et ainsi de permettre une meilleure thermorégulation par convection.

1.3. Mise en élevage

A l'issue des 24 heures d'attente au couvoir, les poussins ont été transportés à l'élevage expérimental de l'Anses. Les lots DP et FP ont été placés dans deux salles distinctes d'un même bâtiment. Les poussins des groupes T et A ont été mis en place chacun dans 5 parquets de 310 animaux répartis sur l'ensemble de la salle et élevés en conditions identiques jusqu'à l'abattage.

1.3. Mesures réalisées

Lors de l'attente des poussins, des mesures d'ambiance ont été réalisées dans les zones d'attente avec des sondes de température et d'hygrométrie placées dans les caisses de poussins et dans les salles.

Par ailleurs, 16 caisses par groupe ont été pesées à l'éclosion et à l'arrivée à l'élevage. A l'arrivée à l'élevage, des mesures de température cloacale ont été effectuées sur 20 poussins par groupe. En cours d'élevage, 150 animaux par groupe ont été pesés à J1, 5, 8, 12, 21, 29. L'enregistrement de la mortalité était effectué quotidiennement pour chacun des parquets.

A J29, les poids de filets ont été notés sur 25 animaux par groupe, uniquement en FP.

1.4 Traitement des données

Les données issues de DP et de FP ont été traitées séparément par le logiciel statistique Statview. Les différents indicateurs considérés ont été comparés entre les deux traitements (T et A) par une ANOVA, ou par un test de Mann Whitney en cas de variance hétérogène. Le seuil de significativité retenu est $p < 0,05$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Ambiance dans la zone d'attente

Dans la salle T (ambiance non contrôlée), l'analyse des sondes a indiqué des variations importantes de température : 18,6 à 28,1°C pendant les 24 heures d'attente, soit près de 10°C d'amplitude. Il en est de

même pour l'hygrométrie qui a varié de 38,2 à 74,2 % soit 36% d'écart.

A l'inverse, l'ambiance de la salle A correspondait aux consignes : 24-25°C, et hygrométrie : 55-60%.

2.2. Poids des animaux

La perte moyenne de poids des animaux entre l'éclosion et l'élevage est plus faible chez les animaux issus du traitement A que chez les animaux T, de manière tendancielle chez les DP (respectivement : 1,9±2,9% et 3,4±1,9%, p=0,06), et significativement chez les FP (respectivement : 3,2±3,25% et 5,5±1,9%, p=0,05).

On peut penser que ces pertes de poids peuvent être liées à des phénomènes de thermorégulation par évaporation chez les animaux T qui ont subi un stress thermique pendant leur attente, confirmant les résultats de Mitchell et al (2009), et au fait que les animaux n'ont pas été alimentés pendant 24 heures.

Chez les DP, le poids moyen des poussins issus du traitement A est significativement supérieur à celui des poussins T à J1 (p=0,04), à J5 (p=0,0002) et à J12 (p=0,01). Chez les FP, le poids moyen des poussins issus du traitement A tend à être supérieur à celui des poussins T à J1 (p=0,1), et est significativement supérieur aux poussins T à J5 (p=0,0004), à J8 (p=0,002) et à J12 (p=0,001). A J21 et J29 on n'observe plus de différence de poids entre les poussins issus des différents traitements. Aksit et al (2013) ont eux aussi observé que des températures plus froides durant l'incubation et après le stockage, comme ici des baisses importantes de température lors de l'attente des poussins, sont susceptibles de réduire le poids corporel des animaux. De même selon Al Aquil et al (2009), des animaux élevés en conditions de température contrôlée (ici A) présentent une tolérance accrue au stress, ici engendrée par le transport et les variations de température.

2.3 Mortalité

On n'observe pas de différence significative entre les taux de mortalité relevés en cours d'élevage chez les animaux issus des traitements A et T (entre 3 et 5% pour tous les groupes, p > 0.05). A l'inverse, Aksit et al (2013) indiquaient que des températures plus froides durant l'incubation et après le stockage augmentaient la mortalité totale.

2.4 Température cloacale

La température cloacale des poussins d'un jour est légèrement supérieure chez les poussins A que chez les poussins T pour les FP (40,7±0,9 °C chez les poussins A vs. 40,4±0,7 °C pour les poussins T ; p=0,02). Ce résultat va dans le sens des observations de Lin et al (2005), selon lesquelles des variations d'hygrométrie, ici rencontrées par les poussins T lors de leur attente, peuvent impacter la capacité de

thermorégulation des poussins et provoquer une augmentation de la température de plumage et une diminution de la température cloacale.

2.5 Rendement filet

Le rendement filet relevé chez les poussins A à J29 est significativement supérieur à celui des T (chez les FP : respectivement 92,2±1,3 et 88,04±0,9 g/kg de poids vif, p=0,01). Les conditions d'incubation peuvent impacter la masse musculaire des poulets (Hammond et al. (2007). Il est donc également possible que les conditions précoces de vie des poussins aient également un impact sur le développement musculaire et donc sur le rendement filet.

CONCLUSION

Cette étude confirme que les premières heures après l'éclosion sont critiques et susceptibles d'impacter certains éléments de robustesse à la mise en place, notamment la prise de poids et l'homéostasie. En particulier, les résultats indiquent que la maîtrise de la température et de l'hygrométrie durant les heures suivant l'éclosion est fondamentale, y compris pour des paramètres économiques mesurés comme la masse musculaire. Ainsi cette étude indique la nécessité de prendre en compte dans le cadre du management des poussins l'interaction entre les paramètres d'ambiance (température, hygrométrie) et l'âge des reproducteurs, dans le but d'améliorer la qualité des poussins et leurs performances futures.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été par l'UMT SANIVOL dans le cadre du projet CASDAR « Qualicouv ». Elle a été financée par le ministère de l'agriculture et le SNA.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aksit, M., Yalcin, S., Siegel, P. B., Yenisey, C., Özdemir, D., Özkan, S. Broiler respond to cooler ambient temperatures after temperature acclimation during incubation and early postnatal age. 2013. *J. Appl. Poult. Res.*, (22), 298-307.
- Al Aqil, A., Zulkifli, I., Sazili, A. Q., Omar, A. R., rajion, M. A. The effects of the hot, humid tropical climate and early age feed restriction on stress and fear responses, and performance in broiler chickens. 2009. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, (22), 1581-1586.
- De Cristo, A. B., Schimidt, J. M., Perini, R., Marques, P. F. D. S., Santo, A. L. D., Fernandes, J. I. M. Effect of housing density on pododermatitis incidence and bone characteristics in broilers rae system., 2017. *Revista Brasileira de Saude e Producao Animal.*, (18), 161-173.
- Bergoug, H., Burel, C., Guinebretière, M., Tong, Q., Mc Gonell, I.M., Demmers, T.G.M., Verhelst, R., Bahr, C., Berkman, D., Etteradossi, N. Effect of pre-incubation and incubation conditions on hatchability, hatch time and hatch window, and effect of post-hatch handling on chick quality at placement. 2013. *World's Poult. Sci. J.*, (69).
- Hammond, C.L., Simbi, B.H., Stickland, N.C. In ovo temperature manipulation influences embryonic motility and growth of limb tissues in the chick (*Gallus gallus*) (Open Access)., 2013. *J. Exp.Biol.*, 210 (15), 2667-2675.
- Lin H., Zhang H. F., Jiao H. C., Zhao T., Sui S. J., Gu X. H., Zhang Z. Y., Buyse J., Decuyper E. (2005). *Poult. Sci.*, 84: 1166-1172.
- Mitchell, M.A., Kettlewell, P. J. Welfare of poultry during transport-a review. 2009. *Poultry Welfare Symposium Crevia, Italy*, 18-22.

**ETUDE DE L'ACTIVITE MODULATRICE D'HUILES ESSENTIELLES SUR LA
COLONISATION DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* CHEZ LE POUSSIN.
ANALYSE COMPAREE DU DENOMBREMENT BACTERIEN ET DE LA
COMPOSITION DU MICROBIOTE CAECAL PAR METAGENOMIQUE 16S**

Girard Claire¹, Chabrilat Thibaut¹, Kerros Sylvain¹

¹*PHYTOSYNTHESE -57 avenue Jean Jaures- 63200 MOZAC,
Claire.girard@phytosynthese.com*

RÉSUMÉ

Campylobacter jejuni (*C. jejuni*) est une bactérie du microbiote caecal des volailles de chair, responsable d'une des premières causes d'infection d'origine alimentaire chez l'Homme. Le contrôle du développement de ce pathogène est essentiel, et la limitation de la population de *C. jejuni* en élevage constitue une mesure de prévention supplémentaire. Le but de cette étude est d'évaluer l'activité anti-bactérienne d'un additif à base d'huiles essentielles (additif phyto) contre *C. jejuni* ainsi que ses propriétés modulatrices du microbiote caecal chez le poulet de chair. Dès l'éclosion, 60 poussins Ross sont nourris *ad libitum* avec de l'aliment sans antibiotique selon le schéma expérimental : un groupe de 30 poussins supplémentés de J0 à J17 avec 500g/t de l'additif HE dans l'aliment (Groupe EXP) et un groupe de 30 poussins non supplémentés (Groupe Témoin). A J14, les poussins sont inoculés avec *C. jejuni* (10⁴ UFC/oiseau). Trois jours post inoculation (J17), 15 oiseaux de chaque groupe sont euthanasiés et le contenu caecal est prélevé. Un dénombrement de *C. jejuni* est réalisé et les échantillons de chaque groupe sont classés en « fortement colonisé » (> 5log UFC/g) ou « faiblement colonisé » (<5log CFU/g). L'analyse statistique est réalisée avec le test exact de Fisher. Une analyse métagénomique des gènes codant l'ARNr 16S est menée en parallèle par séquençage haut débit avec la plateforme Illumina (MiSeq). L'abondance relative (en OTU) des taxons bactériens est analysée selon DESeq2. Cette étude montre que la supplémentation avec l'additif phyto tend à réduire post challenge (p=0.056) le nombre d'oiseaux fortement colonisés par *C. jejuni* (5 oiseaux sur 15 pour Groupe EXP sont faiblement colonisés par *C. jejuni* contre 11 sur 15 pour Groupe Témoin). De plus, l'analyse métagénomique montre que *C. jejuni* est un genre bactérien discriminant entre les groupes EXP et Témoin. En effet, l'abondance relative du genre *Campylobacter* est plus importante chez les oiseaux du groupe Témoin (p=0.009). Cette étude, combinant dénombrements bactériens et analyse métagénomique, montre que la supplémentation avec l'additif phyto tend à réduire la colonisation des oiseaux par *C. jejuni* en période d'exposition.

ABSTRACT

Study of essential oil balance effect against *Campylobacter jejuni* colonisation in chicks

Campylobacter jejuni (*C. jejuni*), a bacteria from poultry caecal microbiota, is responsible of one of the first causes of human food born disease. The control of its growth in farm is a keypoint for campylobacteriosis prevention. The aim of this study is to evaluate the antibacterial effect of an essential oil blend additive (EO additive) and to observe the caecal bacterial microbiota evolution in poultry. Since hatching, 60 Ross chicks are fed *ad libitum* without antibiotic feed additives: 30 chicks are fed with 500g/t of EO additive in feed from day 0 to day17 (EXP Group) and 30 chicks have no supplementation in feed (Control group). At day 14, all birds are inoculated with 10⁴ CFU/mL per bird of *C. jejuni*. 3 days post challenge (D17), 15 birds from each group are sacrificed and caecal contents are sampled. *C. jejuni* counting is performed and each sample from each group is rated as either "highly colonized" (> 5 log CFU/g) or "slightly colonized" (< 5 log CFU/g). Statistical analysis is performed with Fisher exact test. 16 S bacterial DNA from caecal contents is analysed by high throughput sequencing using Miseq Illumina technology. Relative abundance (OTU) of each taxonomic level is analysed with DESeq2. This study shows EO additive supplementation aim to minimize the number of birds "heavily colonized" by *C. jejuni* post challenge (5 birds on 15 for Group EXP are slightly colonized whereas 11 birds on 15 for Control group, p=0.056). Moreover, metagenomic analysis shows that *C. jejuni* is a selective bacterial genus between EXP Group and Control group. *C. jejuni* relative abundance from Control group birds are higher than the one of EXP Group (p=0.009). The combination of bacterial counting and metagenomics analysis in this study shows that EO additive supplementation contributes to reduce *C. jejuni* colonisation in challenge period.

INTRODUCTION

Les souches de *Campylobacter* sont des bactéries à Gram négatif du microbiote caecal des volailles, responsable d'une des premières causes d'infection d'origine alimentaire chez l'Homme. *C. jejuni* est une espèce pathogène pour l'Homme et aurait été détectée sur 65 % des viandes de poulet en France dans une étude de 2009 (Guyard-Nicodème et al., 2015). Le contrôle de son développement en élevage constitue une mesure de prévention importante pour limiter les toxi-infections, en complément des mesures de biosécurité. Des stratégies non antibiotiques sont à l'étude, telles des bactériophages ou des additifs alimentaires. Cette étude a pour but d'étudier la capacité d'un additif formulé à base d'huiles essentielles (additif HE) à réduire en situation de challenge, la colonisation intestinale de *C. jejuni* chez le poulet de chair, ainsi que son impact sur la composition du microbiote caecal. Avec le développement de nouvelles techniques de séquençage à haut débit, l'étude de la composition du microbiote intestinal a été rendue possible. Ces techniques permettent désormais d'étudier le matériel génétique et d'identifier des espèces jusque-là inconnues car non cultivables *in vitro* (Medinger et al., 2010). Cette technique peut aider à comprendre le mode d'action de l'additif sur la modification du microbiote et ainsi aider à réduire la prolifération de *C. jejuni*.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Conditions expérimentales

60 poussins Ross de 1 jour, vaccinés contre la maladie de Marek et contre la bronchite infectieuse ont été mis en place en station expérimentale.

Ils ont été répartis dans un même bâtiment, en 2 salles côte à côte de 1.95m² selon le schéma expérimental suivant : un groupe de 30 poussins supplémentés de J0 à J17 avec 500g/t de l'additif HE (Phyto CSC, Phytosynthèse) dans l'aliment (Groupe EXP) et un groupe de 30 poussins non supplémentés (Groupe Témoin). Ils étaient nourris *ad libitum*. A J14, tous les poussins ont été inoculés avec *C. jejuni* A2008a (10⁴ UFC/oiseau). 3 jours post inoculation (J17), 15 oiseaux de chaque groupe ont été euthanasiés par une saignée précédée d'une éthernarcose et le contenu caecal a été prélevé.

1.2. Dénombrement bactérien

A J17, les contenus caeaux individuels ont été dilués au 1:9 (poids/volume) dans de l'eau peptonnée tamponnée (Hutchinson and Bolton, 1984). Après homogénéisation, 100µL d'une dilution préalable au 1/10^e ont été prélevés et ensemencés sur une gélose sélective mCCDA (Fisher Scientific). Après 48h d'incubation à 42°C en conditions microaérobies, les colonies de *C. jejuni* ont été dénombrées selon l'intervalle 10³ à 10⁸ UFC/g (Thibodeau et al., 2011). Les échantillons des groupes EXP et témoin ont été classés en « fortement colonisé » (> 5log UFC/g) ou « faiblement colonisé » (<5log UFC/g). L'analyse statistique a été réalisée avec le test exact de Fisher.

Une recherche de *C. jejuni* a été menée sur un échantillon composite de fientes fraîches (méconium et duvet à J0) sur l'ensemble des poussins avant de débiter l'essai. Cette démarche a suivi le même protocole que celui réalisé pour les dénombrements bactériens. Les colonies suspectes ont été testées par PCR-*Campylobacter* spécifique.

1.3. Analyse métagénomique

Une analyse métagénomique des gènes codant l'ARNr 16S a été menée en parallèle sur chaque contenu caecal des 2 groupes. Les extractions d'ADN ont été réalisées d'après Thibodeau et al (2017). Le séquençage haut débit a été effectué avec la plateforme Illumina (MiSeq) en 2x250 pb. L'analyse des données brutes a été exécutée avec DaDa2 (v 1.6.0) sous R studio (version de R 3.4.4) avec les packages suivants : phyloseq, ggplot2, vegan, dplyr, scales, grid, reshape2, igraph, ape, gplots, lme4, phangorn, plotly, tidyr, data.table, RColorBrewer, randomcoloR, DESeq2. La base de données Silva v132 a été utilisée pour l'assignation taxonomique des séquences. L'abondance relative (en OTU) des taxons bactériens dans les échantillons caeaux a été analysée avec le package DESeq2. Les différences entre les groupes ont été analysées statistiquement avec le test Permanova-adonis.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les dénombrements de *C. jejuni* dans les échantillons composites de fientes fraîches à J0 n'ont révélé aucune présence de *C. jejuni* chez les oiseaux.

La Figure 1 présente les résultats du dénombrement de *C. jejuni* à J17 dans les 2 groupes (EXP et Témoin) et selon l'intensité de la colonisation de *C. jejuni*.

Le groupe EXP présentait 1/3 d'oiseaux « fortement colonisés » alors que le groupe Témoin présentait 11

oiseaux sur 15 « fortement colonisés » ($p=0.056$). 3 jours post inoculation de *C. jejuni*, une tendance à une moindre proportion d'oiseaux fortement excréteurs lorsque supplémentés en additif HE a donc été mise en évidence. Ces résultats sont en accord avec ceux de Arsi et al. (2014), qui montrait l'intérêt potentiel d'une supplémentation en thymol et en carvacrol sur la réduction de la colonisation de *C. jejuni* chez le poulet de chair.

L'abondance relative des OTUs pour chaque groupe est représentée par un graphique Multi dimensional scaling non métrique (NMDs) (Figure 2). Ce graphique permet de visualiser la structure des microbiotes. Chaque point représente un échantillon analysé : plus les points ou les groupes de points sont rapprochés, plus les structures des microbiotes des groupes sont semblables. A J17, l'analyse graphique montre que le microbiote des oiseaux du Groupe EXP possédait une structure différente de celui des oiseaux du Groupe Témoin : le centroïde associé au nuage de points des oiseaux non traités était différent de celui des animaux traités ($p < 0.001$, indice de Bray Curtis). La dispersion des animaux au sein des 2 nuages de points était la même (beta dispersion $p=0.57$, indice de Bray-Curtis), indiquant que à J17 la variance de la structure du microbiote au sein des 2 groupes était la même. L'ensemble des poussins ayant été élevés dans les mêmes conditions, la supplémentation de cet additif HE a donc pu avoir un impact sur la structure du microbiote des oiseaux, le différenciant de celui des animaux non supplémentés.

L'abondance relative des OTUs regroupés par genre bactérien a montré des différences significatives selon le traitement (Tableau 1). Ainsi, pour le groupe témoin, l'abondance relative du genre *Campylobacter* était 4,6 fois plus importante que dans le Groupe EXP (Facteur « fold change » = 4,6 exprimé en \log_2 , $p=0.009$). L'analyse métagénomique montre que le genre *Campylobacter* est le plus différenciant pour le groupe témoin. L'analyse des genres bactériens qui regroupent de nombreuses espèces doit être corrélée au dénombrement de l'espèce pathogène. Ainsi les 2

méthodes d'analyse différentes (métagénomique et dénombrement bactérien) tendent à montrer une aptitude pour l'additif HE à limiter le développement de *Campylobacter* dans le caecum.

Certaines huiles essentielles ont démontré un mode d'action d'inhibition directe de la croissance de plusieurs pathogènes, y compris *C. jejuni* (Fisher and Phillips, 2006; Kotzekidou et al., 2008; Rota et al., 2004). Cette inhibition directe peut être ici une explication au plus grand nombre d'individus faiblement excréteurs de *C. jejuni* lorsqu'ils sont supplémentés en additif HE. Dans notre étude, l'additif HE a également un effet sur la structure du microbiote caecal (Figure 2). Une autre hypothèse pour expliquer la tendance à la moindre colonisation de *C. jejuni* est que cette influence permette une exclusion compétitive de *C. jejuni* par d'autres bactéries. En effet, l'exclusion compétitive désigne la réduction de la colonisation d'un pathogène en raison de l'occupation par une autre espèce, d'une niche écologique ou d'une compétition vis-à-vis d'une ressource (Nurmi and Rantala, 1973).

CONCLUSION

Cette étude qui combine dénombrement de *C. jejuni* et analyse métagénomique, permet de montrer la potentielle tendance inhibitrice de la colonisation de *C. jejuni* par un additif à base d'huiles essentielles sélectionnées. Les résultats obtenus montrent la pluralité des mécanismes d'action possibles de cet additif à la fois sur la bactérie en elle-même mais également sur l'équilibre du microbiote caecal du poulet de chair. Cet additif pourrait ainsi contribuer au contrôle des infections alimentaire dues à ce pathogène chez l'Homme. D'autres études à plus grandes échelles seront nécessaires pour valider la réduction de la prévalence de *Campylobacter* sur les carcasses de poulet.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arsi, K., Donoghue, A. M., Venkitanarayanan, K., Kollanoor-Johny, A., Fanatico, A. C., Blore, P. J. and Donoghue, D. J., 2014. *J. Food Saf.*, 34(4), 321–325
- Fisher, K. and Phillips, C. A., 2006. *J. Appl. Microbiol.*, 101(6)
- Guyard-Nicodème, M., Rivoal, K., Houard, E., Rose, V., Quesne, S., Mourand, G., Rouxel, S., Kempf, I., Guillier, L., Gauchard, F. and Chemaly, M., 2015. *Int. J. Food Microbiol.*, 203, 8–14
- Hutchinson, D. N. and Bolton, F. J., 1984. *J. Clin. Pathol.*, 37(8), 956–957
- Kotzekidou, P., Giannakidis, P. and Boulamatsis, A., 2008. *LWT - Food Sci. Technol.*, 41(1), 119–127
- Medinger, R., Nolte, V., Pandey, R. V., Jost, S., Ottenwälder, B., Schlotterer, C. and Boenigk, J., 2010. *Mol. Ecol.*, 19, 32–40
- Nurmi, E. and Rantala, M., 1973. *Nature*, 241(5386), 210–211
- Rota, C., Carramiñana, J. J., Burillo, J. and Herrera, A., 2004. *J. Food Prot.*, 67(6), 1252–1256

Thibodeau, A., Fravallo, P., Laurent-Lewandowski, S., Guévremont, E., Quessy, S. and Letellier, A., 2011. Can. J. Vet. Res. Rev. Can. Rech. Veterinaire, 75(4), 298-307

Thibodeau, A., Letellier, A., Yergeau, É., Larrivière-Gauthier, G. and Fravallo, P., 2017. Front. Microbiol., 8,

Figure 1 : Nombre d'oiseaux fortement ou faiblement colonisés par *C. jejuni* à 17 jours d'âge (Test exact de Fisher $p=0.056$)

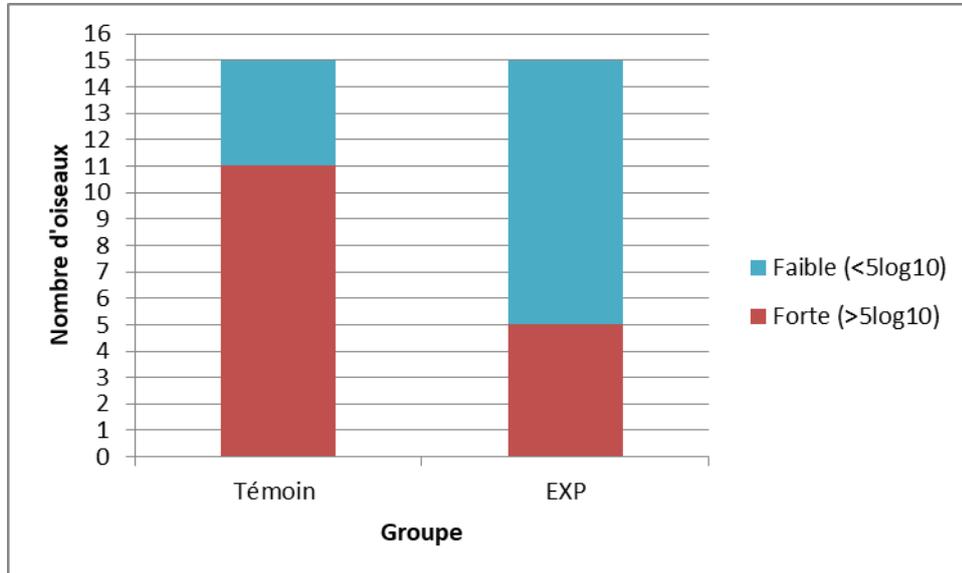


Figure 2 : Comparaison de la structure du microbiote 3 jours post challenge (J17) (indice de Bray-Curtis)

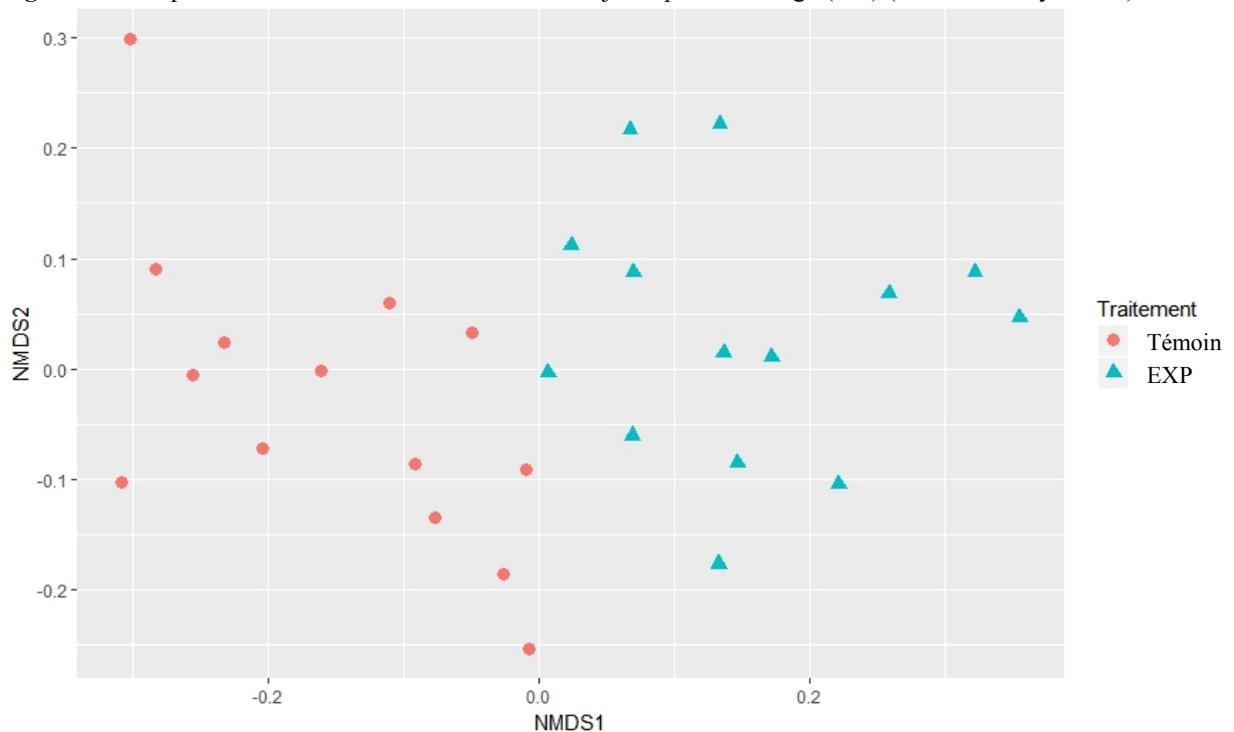


Tableau 1. Association de l'abondance relative des genres bactériens selon le traitement, après inoculation de *C. jejuni* A2008a

Traitement	Facteur	p	Assignation Taxonomique	
			Famille	Genre
Témoin	4,6	9 ^E -03	Campylobacteraceae	Campylobacter
	2,3	4 ^E -02	Lachnospiraceae	Blautia
	2,2	6 ^E -07	Ruminococcaceae	Intestinimonas
	1,5	2 ^E -03	Peptostreptococcaceae	Romboutsia
	1,5	4 ^E -05	Lachnospiraceae	ASF356
	1,0	8 ^E -05	Lactobacillaceae	Lactobacillus
	0,9	4 ^E -02	Erysipelotrichaceae	Erysipelatoclostridium
EXP	26,0	8 ^E -29	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae_UCG-005
	10,9	1 ^E -15	Ruminococcaceae	Subdoligranulum
	6,2	7 ^E -07	Enterobacteriaceae	Salmonella
	2,4	4 ^E -02	Staphylococcaceae	Jeotgalicoccus
	1,9	2 ^E -04	Leuconostocaceae	Weissella
	0,9	2 ^E -02	Clostridiales_vadinBB60_group	Clostridiales_vadinBB60_group_NA
	0,6	4 ^E -02	Ruminococcaceae	Ruminiclostridium_5

**DECROISSANCE DES TENEURS HEPATIQUES EN FUMONISINES ET
ZEARALENONE CHEZ LE POULET ET LA DINDE LORS DE DISTRIBUTION
D'UN ALIMENT NATURELLEMENT CONTAMINE**

**Travel Angélique¹, Metayer Jean Paul², Mika Amandine¹, Cleva Didier³, Boissieu Cyril³,
Le Bourhis Céleste⁴, Tardieu Didier⁵, Guerre Philippe⁵**

¹*ITAVI, Centre INRA Val de Loire, 37380 NOUZILLY, France;*

²*ARVALIS-Institut du Végétal, Station expérimentale, 91720 BOIGNEVILLE, France;*

³*Chêne Vert Conseil, Z Bellevue II – 35220 CHATEAUBOURG, France;*

⁴*INRA, Unité 1295 PEAT Centre Recherche Val de Loire, 37380 NOUZILLY, France;*

⁵*Université de Toulouse, INP, ENVT, UR Mycotoxicologie, F-31076 TOULOUSE, France.*

travel@itavi.asso.fr

RÉSUMÉ

L'objectif de cette étude, est d'évaluer, pour le poulet et la dinde, la teneur hépatique en mycotoxines après 2 semaines d'exposition à un aliment naturellement contaminé, et après 2 ou 4j de «rinçage». Les profils en mycotoxines des aliments sont équivalents pour le poulet et la dinde : 7-8 mg Fumonisines (FBs)/kg et 0,6 mg Zearalénone (ZEN)/kg. Soixante poulets de chair et 60 dindes de chair ont été élevés au sol en 4 groupes de 15 animaux. Les animaux ont reçu de l'aliment non contaminé jusqu'à 20j d'âge pour les poulets et 55j d'âge pour les dindes. Pour chaque espèce, 3 groupes de 15 animaux ont reçu de l'aliment contaminé (J20-J34 pour les poulets et J55-J69 pour les dindes), un groupe de chaque espèce continuant de recevoir l'aliment témoin. Après 15j d'exposition, pour chaque espèce, les animaux témoins et un groupe d'animaux exposés, sont abattus après 8h de jeûne pour prélever les foies. Les deux groupes de poulets et dindes restant reçoivent alors un aliment non contaminé pendant 2 ou 4j. Les teneurs hépatiques en FBs et ZEN sont déterminées par UHPLC-MS/MS après purification sur colonne d'immuno-affinité. Des conditions d'exposition similaires (dose, mycotoxine, durée) entraînent des concentrations hépatiques similaires en FB1 dans les deux espèces alors que les teneurs en ZENs sont très supérieures chez la dinde comparativement au poulet. Les profils de décroissance en FBs et ZEN sont similaires dans les deux espèces. Une décroissance linéaire lente des FBs est observée, des teneurs résiduelles étant toujours présentes après 4 j de distribution d'aliment indemne. La ZEN a été principalement retrouvée sous forme de métabolites réduits et conjugués. Après un premier temps de décroissance rapide, une phase lente de décroissance est observée, des teneurs en alpha-zearalénol largement supérieures à la LOQ sont retrouvées après 4 j de distribution d'aliment indemne.

ABSTRACT

Decrease of FBs and ZON level in chicken and turkey liver when exposing to naturally contaminated feed

The objective of this study is to evaluate, for chicken and turkey, the hepatic mycotoxin content after 2 weeks of exposure to a naturally contaminated feed, and after 2 or 4 days of "rinsing". Mycotoxic feed profiles are equivalent for chicken and turkey: 7-8 mg FBs/kg and 0.6 mg ZON/kg. Sixty broilers and 60 turkeys were raised, in floor pens, in 4 groups of 15 animals. Poultry received diet « mycotoxin free » until 20 days of age for chickens and until 55 days of age for turkeys. For each species, 3 groups of 15 animals received the contaminated feed (D20-D34 for chickens and D55-D69 for turkeys), with one group of each species continuing to receive the control feed. After 15 days of exposure, for each species, the control animals and a group of exposed animals are slaughtered after 8h of 'no-feeding' to collect livers. The 2 remaining groups of chickens and turkeys then receive a diet « mycotoxin free » for 2 or 4 days. Liver levels of FBs and ZON are determined by UHPLC-MS/MS after purification on an immuno-affinity column. Similar exposure conditions (dose, mycotoxin, duration) result in similar hepatic concentrations of FB1 in both species, while ZON levels are much higher in turkeys than in chickens. Decrease profiles in FBs and ZON are similar in both species. A slow linear decrease in FBs is observed, with residual levels still present after 4 days of 'free mycotoxin' feed distribution. The ZON was mainly found as reduced and conjugated metabolites. After a first time of rapid decrease, a slow phase of decrease is observed, alpha-zearalenol levels much higher than the quantification limit are found after 4 days of 'free mycotoxin' feed distribution.

INTRODUCTION

La demande du consommateur de disposer d'aliments sains et sûrs est légitimée par les autorités publiques. Des réglementations établissent les limites maximales de certaines substances indésirables dans les denrées alimentaires pour l'Homme et dans les aliments pour animaux (Règlement CE 466/2001 modifié et Recommandation 2006/576 CE et ses modifications). Les mycotoxines, métabolites toxiques produits par certaines espèces fongiques, peuvent contaminer les céréales au champ ou au cours du stockage. Ainsi, les hommes et les animaux d'élevage peuvent être exposés à ces toxines via leur alimentation.

En France, les fusariotoxines : les trichothécènes (essentiellement déoxynivalénol (DON)), les fumonisines (FBs) et la zéaralénone (ZEN) sont les principales mycotoxines qui altèrent la qualité sanitaire des récoltes. Les teneurs de ces mycotoxines sont réglementées dans les denrées d'origine végétale destinées à l'homme et aux animaux. Cependant, aucun seuil n'est fixé pour les produits d'origine animale, bien qu'ils puissent contenir des résidus de mycotoxines.

Les données de la littérature suggèrent un niveau de transfert assez limité depuis l'aliment du bétail vers les produits animaux, aussi bien pour les FBs (Vudathala et al., 1994 ; Tardieu et al, 2008 et 2009) que la ZEN (Mirocha et al., 1982 ; Maryamma et al., 1992 ; Danicke et al., 2002). Cependant, l'hétérogénéité des protocoles expérimentaux utilisés dans ces études (concentrations de toxine, une durée d'exposition, une espèce de volaille et un stade physiologique) rend difficile l'établissement de relations précises entre le niveau de contamination de l'aliment et le niveau de résidu dans les tissus animaux. Des travaux récents (Metayer et al., 2017 et Travel et al., 2017), réalisés en situation d'exposition « pire cas » (incorporation de mycotoxines aux maxima tolérés par l'UE pour l'aliment volaille) ont montré la présence, en teneur non négligeable, de fumonisines ($\approx 40\mu\text{g FB1/Kg}$), zéaralénone et ses métabolites ($1,5$ à $3 \alpha\text{-ZEL/Kg}$) dans le foie de poulets et de dindes.

L'objectif du projet a consisté à caractériser, en milieu contrôlé, le transfert des fumonisines (FBs) et zéaralénone (ZEN et métabolites) vers le foie de poulet et de dinde, lors d'une exposition chronique à un aliment naturellement contaminé (situation de «pire cas terrain»). En parallèle, l'effet de la distribution d'un aliment exempt de mycotoxines, pendant 2 ou 4 jours après arrêt de l'exposition, a été évalué sur le niveau résiduel en FBs et ZEN des foies de poulets et de dindes.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Aliments naturellement contaminés en mycotoxines

Au cours des campagnes de récolte 2012, 2013 et 2014, des lots de matières premières (maïs, blé) naturellement contaminés par des FBs et de la ZEN ont été activement recherchés. Deux lots de maïs (A : $2490 \mu\text{g/kg}$ de ZEN et B : $21700 \mu\text{g/kg}$ de FBs et $120 \mu\text{g/kg}$ de ZEN) et un lot de blé ($208 \mu\text{g/kg}$ de ZEN) ont été utilisés afin de formuler des aliments pour volailles représentatifs de la situation « la plus critique », susceptible d'être rencontrée sur terrain sur la période 2012-2014 et qui répondent aux recommandations de l'UE. Les analyses (LC-MS/MS) ont confirmé les profils suivants pour l'aliment poulet : $7,3 \text{ mg FBs/kg}$ et $0,6 \text{ mg ZEN/kg}$ et pour l'aliment dinde : $7,9 \text{ mg FBs/kg}$ et $0,6 \text{ mg ZEN/kg}$ (Tableau 1).

1.2. Les animaux

1.2.1. Les poulets de chair

Soixante poulets de chair (Cobb 500 mâles) ont été élevés au sol, en 4 groupes de 15 animaux. De 0 à 34 jours d'âge, les poulets ont tous reçu 2 phases alimentaires classiques (démarrage et croissance). Jusqu'à J20, tous les groupes ont été élevés selon les mêmes modalités, un ré-allotement a été effectué à J17 afin de constituer des groupes homogènes pour le poids avant l'exposition. Puis pendant 14j (J20-J34), les 3 groupes M, M2 et M4 ont reçu le même aliment contenant les mycotoxines, le dernier groupe (Témoin, T) ayant reçu sur cette même période un aliment non contaminé. A J34, 10 poulets des lots T et M ont été sacrifiés afin de prélever les foies. Les poulets des 2 autres groupes ont reçu, pendant 2 jours (M2) ou 4 jours (M4) un aliment non contaminé. Dix poulets du lot M2 ont été sacrifiés à J36 et 10 poulets du lot M4 ont été sacrifiés à J38. Pour chaque groupe, un jeûne de 8h a précédé les prélèvements.

1.2.2. Les dindes de chair

Soixante dindes de chair (Grade Maker mâles) ont été élevées au sol, en 4 groupes de 15 animaux. De 0 à 69 jours d'âge, les dindes ont toutes reçu 3 phases alimentaires classiques (démarrage, croissance 1, croissance 2). Jusqu'à J55, tous les groupes ont été élevés selon les mêmes modalités, un ré-allotement a été effectué à J48 afin de constituer des groupes homogènes pour le poids. Puis pendant 14j (J55-J69), les 3 groupes M, M2 et M4 ont reçu le même aliment contenant les mycotoxines, le dernier groupe (Témoin) ayant reçu sur cette même période un aliment non contaminé. A J69, 10 dindes des lots T et M ont été sacrifiées afin de prélever les foies. Les dindes des 2 autres groupes ont reçu, à partir de J59, pendant 2 jours (M2) ou 4 jours (M4) un aliment non contaminé. Dix dindes du lot M2 ont été sacrifiées à J71 et 10 dindes du lot M4 ont été sacrifiées à J73. Pour chaque groupe, un jeûne de 8h a précédé les prélèvements.

1.3. Détermination des teneurs hépatiques en mycotoxines

Les teneurs hépatiques en FBs et en ZEN et ses métabolites ont été déterminées sur homogénats de foie conservés à -20°C par UHPLC-MS/MS après purification des échantillons sur colonnes d'immuno-affinité.

1.3.1. Fumonisinés

Un gramme d'homogénat est broyé au potter dans du tampon NaCl comme précédemment décrit (Tardieu et al., 2009). Un volume fixe de U-[13C34]-FB1 et U-[13C34]-FB2 (Romer, 3131 Getzersdorf, Austria) est ajouté aux échantillons (12,5µl d'une solution à 1µg/ml dans l'acétonitrile/eau, v/v). Les FBs sont extraites par un mélange acétonitrile/eau puis purifiées sur colonnes FUMONIPREP (Romer, 3131 Getzersdorf, Austria) selon les recommandations du fabricant et comme précédemment décrit (Tardieu et al., 2009). L'éluat de filtration est séché et repris dans 200µl de méthanol/eau, 10µl sont injectés dans le système HPLC.

La séparation des FBs est réalisée sur colonne C18 Poroshell 120 (Agilent) à l'aide d'un gradient méthanol/eau contenant 0,1% d'acide formique. Le dosage est réalisé en ESI (Agilent G6410B), avec deux ions qualifiants pour chaque toxine.

Les teneurs tissulaires en FB1 et FB2 sont exprimées après correction des rendements de la méthode d'analyse respectivement mesurés pour chaque échantillon à l'aide de 13CFB1 et 13CFB2. Les teneurs en FB3 sont corrigées en utilisant la 13CFB1.

1.3.2. Zéaralénone

Dix grammes d'homogénats sont broyés au potter dans du tampon acétate (0,2M, pH7,2) et répartis en deux fractions aliquotes. Un volume fixe de U-[13C18]-ZEN (Romer, 3131 Getzersdorf, Austria) est ajouté à chaque homogénat (12,5µl d'une solution à 1µg/ml dans l'acétonitrile/eau, v/v). Les homogénats sont extraits en présence d'acétonitrile (1V/4V) et évaporés à sec. Un extrait sec est conservé au frais en vue du dosage ultérieur des formes libres de la ZEN et de ses métabolites. L'autre extrait est repris dans du tampon acétate (0,2M, pH5) et incubé une nuit à 37°C en présence de bêta-glucuronidase (Helix pomatia SIGMA, >1700 U/g) comme précédemment décrit (Kolf-Clauw M. et al., 2007). L'incubat est extrait en présence d'acétonitrile (1V/4V) et évaporés à sec, en vue du dosage ultérieur des formes totales de la ZEN et de ses métabolites (libres plus conjugués).

Les deux extraits secs sont repris dans du tampon acétate (0,2M, pH7,2) et purifiés sur colonne Easi-extract zearalenone (RBiopharm, Darmstadt, Allemagne) selon les recommandations du fabricant. L'éluat de filtration est séché et repris dans 200µl de méthanol/eau, 10µl sont injectés dans le système HPLC.

La séparation de la ZEN et de ses métabolites est réalisée sur colonne C18 Poroshell 120 (Agilent) à l'aide d'un gradient méthanol/eau contenant 0,1% d'acide formique. Le dosage est réalisé en ESI (Agilent G6410B), avec deux ions qualifiants pour chaque toxine.

Les teneurs tissulaires en ZEN et métabolites sont exprimées après correction des rendements de la méthode d'analyse mesurés à l'aide de 13CZEN.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Fumonisinés

L'évolution des teneurs hépatiques en FBs chez la dinde et le poulet après distribution d'un aliment contaminé par 7,3 mg FB1+FB2/kg pendant 14 jours, suivie de la distribution d'un aliment indemne pendant 4 jours est donnée, dans la Figure 1. La consommation d'aliment contaminé entraîne la présence de FB1 dans le foie pour les deux espèces, et ce malgré la réalisation d'un jeûne de 8h avant abattage des animaux. Aucune différence significative entre espèce n'est constatée, les teneurs mesurées en FB1 sont voisines de 2,5 µg FB1/kg.

La distribution d'un aliment indemne pendant 4 jours entraîne une décroissance lente des teneurs hépatiques en FB1, des teneurs faibles mais largement supérieures à la LOQ sont toujours mesurées dans les deux espèces et ce malgré la réalisation d'un jeûne de 8 heures. Chez la dinde, la décroissance est lente, un temps de demi-élimination hépatique voisin de 5 jours est calculé. Les teneurs en FB1 peuvent être ajustées selon un modèle linéaire (Figure 1A). Chez le poulet, la décroissance des teneurs hépatiques en FB1 est plus rapide, un temps de demi-élimination voisin de 2 jours est calculé. Les teneurs en FB1 peuvent être ajustées selon un modèle exponentiel (Figure 1B).

Les teneurs en FB2 et FB3 étaient généralement inférieures à la LOQ tout au long de l'essai. Les teneurs en FBs chez les animaux non exposés aux FBs étaient inférieures à la LOQ.

Ces résultats, qui mettent en évidence une persistance longue de la FB1 dans le foie, peuvent apparaître surprenants. En effet, des études antérieures de toxicocinétique réalisées chez les volailles suggèrent une élimination plasmatique rapide de la FB1. Le temps de demi-vie plasmatique rapporté chez la dinde était de 20 à 80 minutes selon le modèle utilisé (Tardieu et al., 2008). Un temps de demi-vie plasmatique de 106 min ayant par ailleurs été observé chez le poulet (Antonissen et al., 2015).

La persistance longue de FB1 dans le foie est néanmoins en accord avec des travaux antérieurs conduits chez le porc. La distribution d'un aliment contenant 70 mg FB1+FB2/kg pendant 22 jours ayant entraîné la persistance de FB1 dans le foie 10 jours après arrêt de l'aliment contaminé et la distribution d'un aliment indemne (Fodor et al., 2008).

2.2. Zéaralénone

La distribution chez la dinde et le poulet d'un aliment contaminé par 0,6 mg de ZEN/kg pendant 14 jours entraîne la présence de ZEN et de ses métabolites dans le foie, et ce malgré la réalisation d'un jeûne de 8h avant abattage des animaux. De fortes différences sont toutefois constatées selon les composés mesurés. Aucune trace de zéaralanone ou de ses métabolites, alpha-zéaralanol, bêta-zéaralanol, libres ou conjugués n'a pu être mise en évidence dans les échantillons. Ce résultat confirme que la réduction de la zéaralénone en zéaralanone n'est pas présente chez la volaille (Guerre, 2016).

En ce qui concerne la zéaralénone et ses métabolites réduits, alpha-zéaralanol (α -ZEL) et bêta-zéaralanol (β -ZEL), ces composés sont principalement retrouvés sous forme conjugués, aussi bien chez la dinde que le poulet. Seul l' α -ZEL a pu être régulièrement dosé sous forme libre dans les foies des animaux exposés. La ZEN et le β -ZEL libres étaient inférieurs à la LOQ dans la plus grande partie des échantillons.

L'évolution des teneurs hépatiques en formes totales de ZEN et métabolites réduits chez la dinde et le poulet après distribution d'un aliment contaminé par 0,6 mg ZEN/kg pendant 14 jours suivie de la distribution d'un aliment indemne pendant 4 jours est donnée dans la Figure 2. L' α -ZEL est le métabolite principal, aussi bien chez la dinde que le poulet. Sa teneur hépatique moyenne est voisine de 6 mg/kg chez la dinde contre 0,4 mg/kg chez le poulet. Dans les deux espèces, la ZEN représentait moins de 10% du total des composés retrouvés. Ce résultat confirme l'importance du métabolisme de la ZEN chez la volaille, et notamment la formation d' α -ZEL, considéré comme plus toxique que la zéaralénone (Guerre, 2016 ; Kolf-clauw 2008 ; EFSA, 2017). La teneur en β -ZEL représente environ 25% de la teneur en α -ZEL chez la dinde contre plus de 50% chez le poulet. Ce résultat, associé à la forte variabilité en ZEN et métabolites totaux dans les deux espèces, confirme que la volaille ne constitue pas un groupe homogène en termes de métabolisation des toxines, au

moins en ce qui concerne la ZEN. Etant donné que l' α -ZEL est considéré comme 60 fois plus oestrogénique que la ZEN, alors que le β -ZEL l'est 5 fois moins (EFSA, 2017), la mise en évidence d'une forte différence de persistance et de métabolisation entre espèces peut revêtir une importance particulière dans l'exposition humaine à ce xéno-estrogène.

Dans les deux espèces, la décroissance des teneurs hépatiques en toxines au cours du temps semble suivre un phénomène biphasique. Une première phase de décroissance rapide est observée, elle conduit à un temps de demi-élimination de la toxine inférieure à deux jours. Il semble en revanche que la clairance hépatique totale de l' α -ZEL soit longue, la pente de décroissance après 2 jours de distribution d'un aliment indemne suggère que plus de 10 jours de distribution seraient nécessaires avant d'atteindre la LOQ. Ce dernier point est toutefois à considérer avec précaution, un suivi plus prolongé dans le temps des teneurs hépatiques en toxines étant nécessaire pour le confirmer.

CONCLUSION

En conclusion, cette étude montre la présence de teneurs résiduelles en FBs, et métabolites de la ZEN dans le foie de dindes et poulets après deux semaines de distribution d'aliment contaminé à des niveaux très largement inférieurs aux maxima recommandés en Europe. Suite à cette exposition, la distribution d'un aliment indemne de mycotoxines permet de réduire la teneur hépatique en toxines, mais pas de la supprimer complètement. L'analyse des courbes de décroissance suggère une persistance longue de certains métabolites, avec de fortes différences entre espèces aviaires.

Cette étude a été financée par le CAS DAR (projet 2012-2015 MYCOVOL) et a été réalisée dans le cadre de l'UMT Biologie Intégrative Recherche et Développement (BIRD).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Antonissen G. et al., 2015. *Toxins*, (7), 560-71.
 Efsa, 2017. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4851.
 Fodor J. et al., 2008, *Food Addit Contam.*, (23), 492-501.
 Guerre P., 2015. *Toxins*, (7), 2289-2305
 Kolf-Clauw M. et al., 2007. *Revue Méd. Vét.*, (158), 504-508.
 Kolf-Clauw M. et al., 2008. *Food Chem Toxicol.*, (46), 1467-1473
 Tardieu D. et al., 2008. *Food Chem Toxicol.*, (46), 3213-8
 Tardieu D. et al., 2009. *Chem-Biol. Interac.*, (182), 239-244.

Tableau 1. Teneurs en fusariotoxines dans les aliments expérimentaux distribués aux poulets de 20 à 34j d'âge et aux dindes de 55 à 69j d'âge (Valeur attendue : valeur estimée à partir de formulation théorique des aliments)

ALIMENTS		Essal Poulet		Essal Dinde	
		ZEN (ppm)	FBs (ppm)	ZEN (ppm)	FBs (ppm)
Témoin	<i>Analysé</i>	0,025	0,03	0,04	0,055
Contaminé	<i>Analysé</i>	0,6	7,34	0,59	7,88

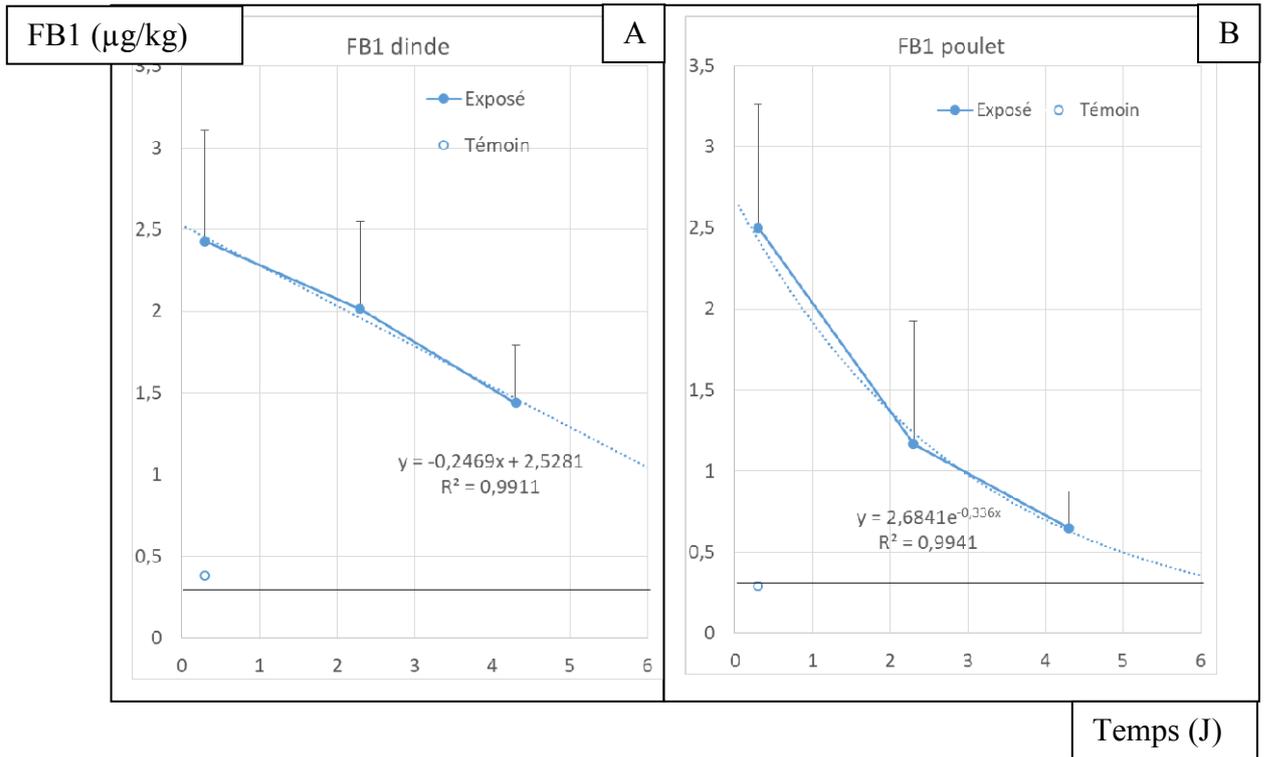


Figure 1. Evolution des concentrations hépatiques en FB1 chez la dinde (A) et le poulet (B) - _____ : LOQ

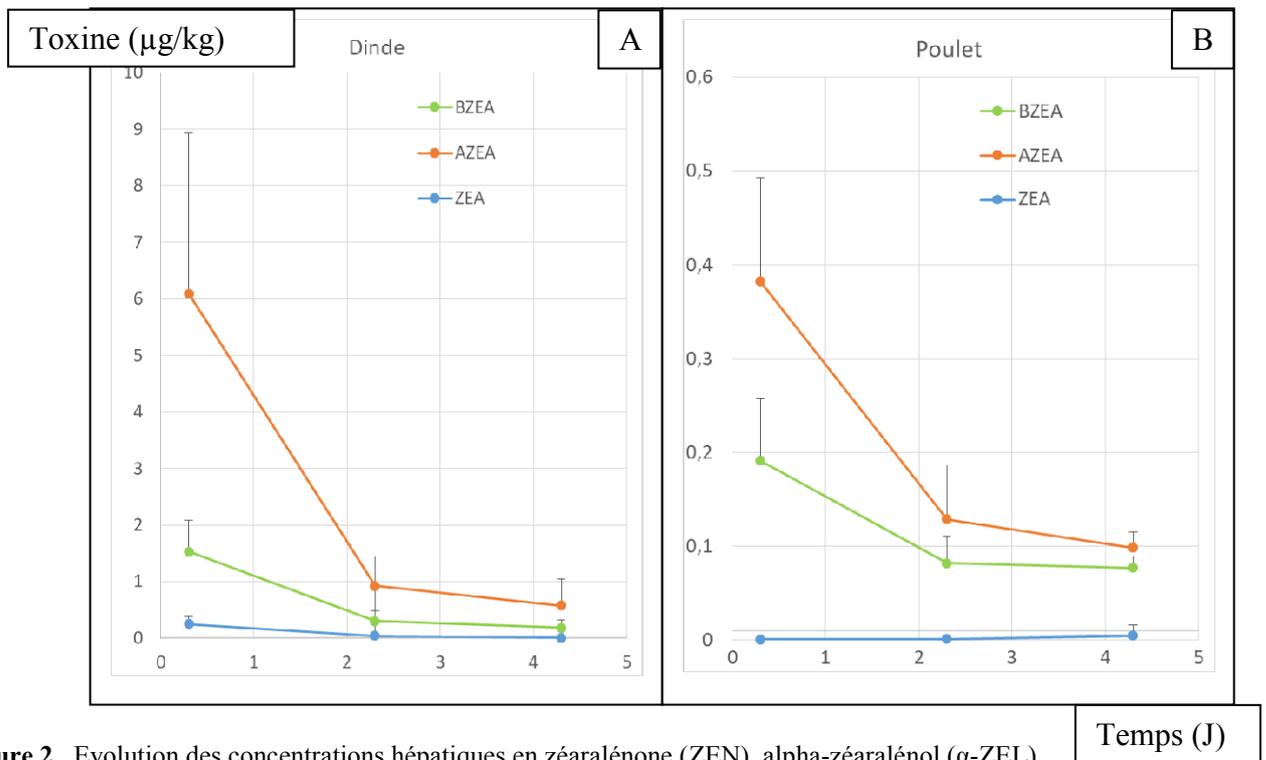


Figure 2. Evolution des concentrations hépatiques en zéaralénone (ZEN), alpha-zéaraléno (α-ZEL), béta-zéaraléno (β-ZEL) chez la dinde (A) et le poulet (B)

DÉTECTION ET QUANTIFICATION DE RÉSIDUS ANTIBACTÉRIENS DANS LA VIANDE DE *GALLUS GALLUS* APRÈS ADMINISTRATION D'UN ALIMENT COMPLÉMENTAIRE À BASE D'HUILES ESSENTIELLES

Ruppin Romaric¹, Mauvisseau Thierry¹, Mallem Yassine²

¹RESEAU CRISTAL - LABOVET LES ESSARTS - 28 rue des Sables, 85140 LES ESSARTS

²UPSP NP3 NUTRITION, PHYSIOPATHOLOGIE ET PHARMACOLOGIE, 2017.B146 -

Oniris, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation, Nantes

Atlantique- 44307 NANTES

r.ruppin@reseaucristal.fr

RÉSUMÉ

L'utilisation d'aliments complémentaires à base d'huiles essentielles (HE) est de plus en plus fréquente en élevage de volaille pour réduire l'utilisation des antibiotiques. Ces substances pourraient générer l'apparition de résidus antibactériens dans la viande, potentiellement détectables par les tests utilisés à l'abattoir pour la recherche des résidus antibiotiques. Nous avons commencé par évaluer la sensibilité de ces tests aux composés antibactériens contenus dans cinq mélanges d'HE. Nous avons recherché et quantifié des résidus antibactériens dans la viande de poulets de chair ayant reçu des HE par Chromatographie en Phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse (CPG-SM). Un aliment complémentaire à base d'HE a été administré pendant cinq jours consécutifs à 13600 poulets certifiés atteints de colibacillose, *via* l'eau de boisson. Des animaux ont été prélevés avant traitement, à l'arrêt du traitement, puis 24h, 48h, 72h et 5 jours après (cinq animaux à chaque fois). Sur chaque animal prélevé, les muscles du bréchet et des cuisses ont été analysés par la méthode des 4 boîtes et le Premi®Test (N=50). Les cinq jus de viande de chaque jour de prélèvement ont été *poolés* et analysés par CPG-SM afin de rechercher le thymol, le carvacrol, le cinnamaldéhyde, majoritaires dans la spécialité. Les 50 échantillons testés ont donné des résultats négatifs par les deux méthodes de détection rapide ($p < 0,05$, modèle linéaire à effets mixtes). L'analyse des jus de viande par CPG-SM (N=5) a révélé la présence de 0,5 à 5µg/kg de cinnamaldéhyde, carvacrol et thymol dans la viande, quel que soit le jour de prélèvement. Le Premi®Test et la méthode des 4 boîtes peuvent détecter les composés antibactériens des HE. Néanmoins, dans nos expériences aucun résidu de composé antibactérien n'a été détecté, suite à l'administration de notre aliment complémentaire à base d'huiles essentielles à des poulets atteints de colibacillose.

ABSTRACT

Detection and quantification of antibacterial residues in *Gallus gallus* meat after administration of a complementary food based on essential oils

The use of complementary food based on essential oils (EO) is increasingly common in poultry farming to reduce the use of antibiotics. These substances could lead to the appearance of antibacterial residues in meat, potentially detectable by the tests used at the slaughterhouse for the investigation of antibiotic residues. We began by evaluating the sensitivity of these tests to the antibacterial compounds contained in five EO mixtures. Antibacterial residues were investigated and quantified in meat of broilers fed with EO by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). A supplemental EO-based food was administered for five consecutive days to 13600 certified chickens with colibacillosis, *via* drinking water. Animals were sampled before treatment, stopped treatment, then 24h, 48h, 72h and 5 days after (five animals each time). On each animal sampled, breast and thigh muscles were analyzed by the 4-Plates method and the Premi®Test (N = 50). The five meat juices from each day of sampling were pooled and analyzed by GC-MS to search for the thymol, carvacrol, cinnamaldehyde, majority in the specialty. The 50 samples tested gave negative results by both methods of rapid detection ($p < 0.05$, Linear Mixed-effects model). Analysis of the meat juices by GC-MS (N = 5) revealed the presence of 0.5 to 5 µg/kg of cinnamaldehyde, carvacrol, and thymol in meat, regardless of the day of collection. The Premi® Test and the 4-Plates method appear to be able to detect the antibacterial compounds of EO, in very small quantities in meat, and therefore not detectable by them, following the administration of our complementary EO-based food for chickens with colibacillosis.

INTRODUCTION

La colibacillose est une maladie majeure en élevage avicole, et notamment en élevage de poulets de chair. Les moyens de lutte passent en général par une antibiothérapie et ont généré l'apparition de nombreuses résistances. Sous l'influence des consommateurs, des instances politiques, et de la communauté scientifique, une volonté de rechercher des traitements alternatifs aux antibiotiques s'est développée, et les huiles essentielles (HE) sont une des réponses possibles à cette demande.

Les propriétés antibactériennes des HE, notamment sur *E.coli* sont bien connues et confirmées par des études *in vitro* et *in vivo*. Les avancées scientifiques permettent de comprendre en partie le mécanisme d'action des différentes molécules anti-infectieuses, comme le carvacrol, le thymol, l'eugénol ou le cinnamaldéhyde. En revanche, les données sur leur métabolisme et leur toxicité sont beaucoup moins disponibles en médecine vétérinaire.

Le statut réglementaire des HE pose aujourd'hui problème. Néanmoins, utilisées dans le cadre du traitement d'une maladie comme la colibacillose, en lieu et place des antibiotiques, elles pourraient être considérées comme des médicaments vétérinaires. Or, un médicament vétérinaire utilisé sur des animaux producteurs de denrées à destination humaine, doit nécessairement avoir un temps d'attente (TA) et une limite maximale de résidus (LMR). Actuellement, aucune donnée n'existe pour les huiles essentielles, et encore moins pour un mélange d'HE.

Enfin, le respect des LMR dans les viandes, passe par la recherche des résidus de médicaments à activité antibactérienne dans les denrées, notamment à l'abattoir. On utilise des tests de détection rapide et qualitative (Premi®test et méthode des 4 boîtes) réalisés sur le terrain puis des tests de confirmation et quantification de résidus (Chromatographies et spectrométrie de masse), réalisés en laboratoire. Les données de sensibilité et de spécificité de ces tests pour la recherche d'antibiotiques et de leurs résidus sont bien documentées dans la plupart des denrées. Concernant les huiles essentielles, ces données commencent à apparaître pour le lait, mais ne sont pas disponibles pour la viande et les œufs de volaille.

Nous avons donc essayé de déterminer la sensibilité du Premi®Test et de la méthode des 4 boîtes aux composés antibactériens présents dans les HE, lors d'une étude *in vitro*, non développée ici. Le second objectif était, après administration d'un aliment complémentaire à base d'HE à des volailles, de déterminer si le composant antibactérien de ce mélange pouvait être retrouvé et quantifié dans la viande à l'arrêt du traitement. Ceci dans le but de fournir des éléments sur le métabolisme et l'élimination de ces molécules et de pouvoir discuter de l'intérêt ou non d'une LMR et d'un TA pour celles-ci.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1 Choix des huiles essentielles administrées

Nous avons décidé de travailler avec un mélange d'huiles essentielles réputées antibactériennes vis-à-vis d'*E.coli* et que nous utilisons classiquement sur le terrain dans cette indication. Le produit contient à titre d'exemple de l'HE d'écorce de cannelle de Chine, de l'HE de clou de girofle et de l'HE de thym vulgaire à thymol. Le produit a ensuite été analysé par chromatographie en phase gazeuse (CPG) pour déterminer les composants majoritaires, qui seront par la suite recherchés dans la viande des volailles ayant reçu le produit. Il en est ressorti que ce produit contient 33 % de cinnamaldéhyde, 18 % de thymol et 15 % de para-cymène, qui seront donc les trois composants recherchés par la suite.

1.2 Critères d'inclusion des élevages et des animaux

Pour être inclus dans l'étude, les poulets de chair ne devaient avoir reçu aucun traitement antibiotique ou à base d'HE depuis leur naissance. Aucun critère portant sur le type de production (label, standard, certifié) ou sur le sexe des animaux n'a été retenu. Des animaux devaient avoir été autopsiés et un vétérinaire devait diagnostiquer des lésions colibacillaires. Une analyse bactériologique devait enfin prouver la présence d'*E.coli* dans l'élevage, peu importe le sérotype incriminé. Enfin, un Phytogramme® était réalisé et devait montrer que la bactérie isolée dans l'élevage, était bien sensible *in vitro* au mélange d'HE que nous voulions tester.

Le Phytogramme® est un outil complémentaire qui permet d'orienter la décision thérapeutique du vétérinaire, en mesurant *in vitro* la sensibilité d'un germe donné à différents mélanges d'HE. Pour ce faire, des puits sont creusés dans une gélose de Mueller-Hinton. Cette boîte de gélose estensemencée en surface avec la bactérie à tester. Chacun des puits est rempli avec un mélange d'HE à tester. Après 24h d'incubation, si le mélange d'HE est efficace sur la bactérie, on observe une zone circulaire sans colonies bactériennes autour du puits, appelée diamètre d'inhibition (DI). Ce diamètre est mesuré, en sachant que plus il est important, plus la bactérie est considérée sensible au produit testé.

Sur ces critères, un seul élevage de 13600 poulets de chair certifiés, âgés de 37 jours, a été recruté.

1.3 Modalités d'administration des traitements et de prélèvement des échantillons

Le produit à base d'HE a été administré *via* l'eau de boisson à la dose de 1L de produit pour 1000L d'eau consommée par les animaux sur 24h. Ceci correspond aux doses classiques efficaces et utilisées dans le traitement des colibacilloses sur le terrain. La durée totale de traitement était de 5 jours consécutifs. Avant la mise en place de celui-ci, 2 animaux témoins négatifs ont été prélevés, autopsiés et les muscles du bréchet et des cuisses ont été récupérés et congelés (-20°C) en attendant la fin de la période de prélèvement. Dès la fin du 5^e jour de traitement, les 5 premiers animaux ont été prélevés aléatoirement dans l'ensemble du bâtiment (J0). 5 autres ont été prélevés 24h (J1) après l'arrêt du traitement puis 48h (J2), 72h (J3) et 5 jours après (J5), pour un total de 25 poulets à analyser. Sur chaque animal, les muscles du bréchet et des cuisses ont été récupérés, mis en sachet de congélation, identifiés par individu et par jour de prélèvement, puis congelés pour regrouper les analyses.

Enfin, les sérums sanguins des 5 animaux prélevés à J0 ont été congelés également afin d'être analysés et d'évaluer la biodisponibilité des composants antibactériens du produit à base d'HE.

1.4 Détection par les tests rapides de résidus antibactériens dans la viande

Sur chacun des échantillons, le Premi®Test et la méthode des 4 boîtes ont été réalisés. Le Premi®Test est vendu sous forme de kits prêts à l'emploi. Chaque échantillon de viande est pressé pour récupérer 100 µL de jus de viande. Ces 100 µL sont déposés dans le tube, au contenu violet, préalablement identifié et on laisse incuber 10 minutes à température ambiante. Le tube est ensuite rincé à l'eau du robinet trois fois de suite, puis fermé avec le film fourni dans le kit, et mis à incuber 3 à 4h dans l'incubateur dédié, à 64°C. Un tube témoin négatif, c'est-à-dire n'ayant pas reçu de jus de viande, est mis en incubation également. Une fois ce dernier devenu jaune (donc négatif), on procède à la lecture. Si le jus de viande testé contient des résidus antibactériens en quantité suffisante, ils empêchent le développement de la bactérie contenue dans le tube (*Bacillus stearothermophilus*) : le tube reste violet. Dans le cas contraire, la bactérie se développe, acidifie le milieu et le tube devient jaune. Au total, 27 échantillons de muscle de bréchet (25 animaux testés + 2 témoins) et 27 échantillons de muscle de cuisse ont été testés (N=54).

Le protocole de la méthode des 4 boîtes est protégé par l'Anses et interdit de diffusion (sauf dérogation). Chaque échantillon de viande à tester est découpé sous forme de rondelle de 6 mm de diamètre et 2 mm d'épaisseur à l'aide d'un emporte-pièce. 4 boîtes de gélose contenant une bactérie à une concentration standardisée et à un pH donné sont

préparées : *Bacillus subtilis* à pH 6 (boîte 1), pH 7,4 (boîte 2), pH 8 (boîte 3) et *Micrococcus luteus* à pH 8 (boîte 4). Deux rondelles de chaque échantillon sont déposées sur chacune des 4 boîtes (6 rondelles maximum par boîte), puis celles-ci sont mises à incuber à 37°C (boîtes 1, 2 et 3) ou 42°C (boîte 4) pendant 24h. Si un diamètre d'inhibition (DI) supérieur à 2mm apparaît autour de l'échantillon, le test est positif aux résidus antibactériens. Au total 54 échantillons ont été testés deux fois sur chaque boîte (N=216).

1.5 Quantification des résidus par CPG-SM

Les jus de viande de chaque jour de prélèvement ont été regroupés et envoyés en analyse CPG-SM au laboratoire ITEIPMAI (Chemillé 49) pour une quantification du cinnamaldéhyde, du thymol et du para-cymène (3 molécules majoritaires de la spécialité), du carvacrol et de l'eucalyptol (molécules témoins négatifs non apportées par le produit). Au total 1 pool témoin négatif, et 4 pools tests ont été analysés (un par jour de prélèvement), de 15 mL de jus de viande chacun (N=5).

Les 5 sérums prélevés sur les animaux à J0 ont également été regroupés et analysés par CPG-SM.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Sur les 54 Premi®Test réalisés, la totalité se sont révélés négatifs pour la recherche de résidus antibactériens, peu importe le jour de prélèvement ou le muscle prélevé (Figure 1). De la même manière, toutes les expériences menées avec la méthode des 4 boîtes ont fourni des résultats négatifs quel que soit le jour du prélèvement ou le muscle analysé (Figure 2).

Les analyses par CPG-SM ont montré que le cinnamaldéhyde, le thymol mais également le carvacrol sont présents à l'état des traces (0,5 à 5 µg/kg) sur l'ensemble des échantillons analysés y compris les témoins négatifs (Figure 3A et 3B). Or ces trois molécules sont utilisées comme substances aromatiques et additifs en alimentation des volailles, ce qui peut expliquer qu'on les retrouve même sur les témoins négatifs. Quoiqu'il en soit, il n'y a pas d'accumulation et d'augmentation de la concentration de ces trois molécules dans les muscles du bréchet et des cuisses dans les 5 jours suivants l'arrêt du traitement. Le para-cymène, bien que majoritaire dans le produit administré, n'est pas retrouvé, que ce soit dans les 5 pools de jus de viande ou dans le sérum des animaux.

Une étude *in vitro* réalisée en parallèle, sur le seuil de sensibilité du Premi®Test et de la méthode des 4 boîtes à cinq aliments complémentaires à base d'HE, a montré que ces derniers réagissent au minimum à une quantité de 2,5 mg d'HE (Ruppin et al., 2018). De plus, une autre étude sur le Delvo®Test

(identique au Premi®Test mais adapté au lait) a montré un seuil de sensibilité au thymol, carvacrol et cinnamaldéhyde de 1 à 2 mg/kg (O'Donnell et al., 2011). La seule donnée disponible concernant la méthode des 4 boîtes est le seuil le plus bas aux résidus d'antibiotiques : 50 µg/kg (Diez et al., 2009). Nos résultats semblent donc cohérents, les tests de détection rapide s'étant tous révélés négatifs car les résidus sont présents en quantité trop faible dans les échantillons testés, ou du moins en quantité bien inférieure aux seuils de détection des deux tests utilisés.

En 2015, l'EFSA a publié une étude sur les résidus de carvacrol, thymol et cinnamaldéhyde après utilisation d'un aliment complémentaire (100 mg/kg) contenant ces trois molécules. Les résultats sont similaires aux nôtres, avec des traces de ces molécules n'excédant pas 5µg/kg dans la viande (EFSA FEEDAP, 2015). Il faut rappeler que certains aliments consommés au quotidien peuvent contenir jusqu'à 122 mg/kg de cinnamaldéhyde (barre de céréale à la cannelle). Ces traces de résidus (50000 fois inférieures) semblent donc garantir une sécurité d'utilisation du produit à base d'HE testé pour l'animal et le consommateur. Néanmoins, nous n'avons utilisé qu'un seul produit, dans un seul élevage et à une seule dose, ce qui ne permet pas de généraliser nos résultats. Ils doivent être confirmés et validés dans d'autres élevages, à différentes doses et avec d'autres produits à base d'HE.

Une étude cinétique complémentaire paraît indispensable pour analyser parfaitement nos résultats. En effet, on ne connaît pas la biodisponibilité des composants antibactériens que nous avons recherchés par CPG-SM. D'autre part, si ces molécules sont liées à d'autres molécules dans le

sérum ou la viande, il est possible que nous n'ayons pas pu les doser complètement et sous-estimer leur concentration.

CONCLUSION

Le produit à base d'HE, à la dose utilisée, ne semble pas générer de résidus antibactériens (carvacrol, thymol, cinnamaldéhyde) en quantité significative, ceux-ci étant retrouvés à l'état de traces et apportés en partie par l'aliment dans les échantillons testés. La sécurité pour le consommateur semble donc être respectée et une LMR ne semble pas nécessaire. Le Premi®Test et la méthode des 4 boîtes, bien que capables de réagir aux molécules antibactériennes des HE, ont un seuil de sensibilité trop élevé pour détecter de si faibles quantités de résidus antibactériens.

Il s'agit d'une étude préliminaire, dont les résultats doivent être confirmés, dans d'autres élevages et avec d'autres produits, et associés avec une étude cinétique qui paraît indispensable. L'association des deux permettrait de pouvoir apporter des éléments de discussion et de réflexion sur la nécessité de LMR pour les produits à base d'HE. Ceci correspond à une demande réitérée par l'Anses en avril 2018, mais répondrait à une interrogation plus globale des différents acteurs de la filière avicole. Une association avec des stations expérimentales, les LNR et les GDS pourrait permettre de recruter plus facilement les élevages, réaliser des analyses plus nombreuses et ainsi fournir des données à une plus large échelle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

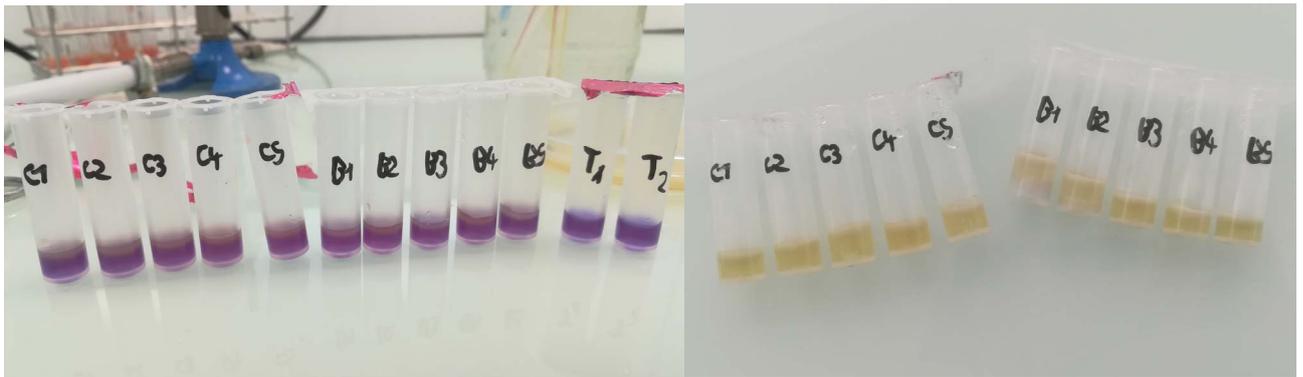
Diez P., Medina E., Martín M. and Calderón V., (2009). Validation of the five-plate screening test for the detection of antibiotic residues in food. Estimation of the limit of detection. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 16, pp. 109-130.

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) (2015). Scientific Opinion on the safety and efficacy of XTRACT® Evolution-B, Code X60-6930 (carvacrol, cinnamaldehyde and capsicum oleoresin), as a feed additive for chickens for fattening. *EFSA Journal*, 13(2):4011, pp. 18.

O'Donnell, Stacey L., (2011). The Efficacy of Antibiotic Residue Screening Tests for the Detection of Natural Antimicrobials in Milk. *Master's Theses pp. 30-46. 175.*
[EN LIGNE] http://digitalcommons.uconn.edu/gs_theses/175 consulté le 14/11/2018

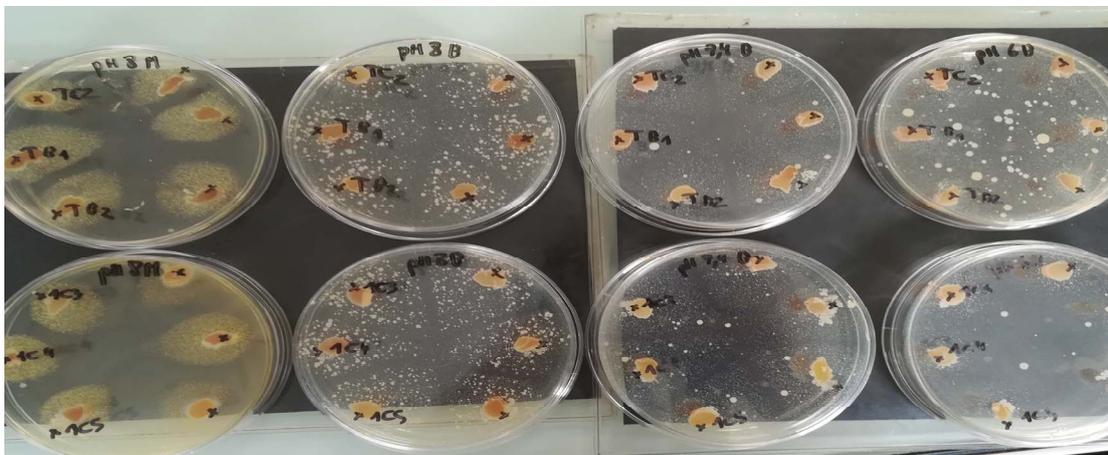
Ruppin R. (2018). Recherche de résidus antibactériens dans la viande de Gallus gallus après administration d'un aliment complémentaire à base d'huiles essentielles dans le cadre de l'accompagnement d'une colibacillose. *Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine de Nantes, Oniris : Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'alimentation Nantes Atlantique. 120 p*

Figure 1 : Résultats des tests Premi®Test



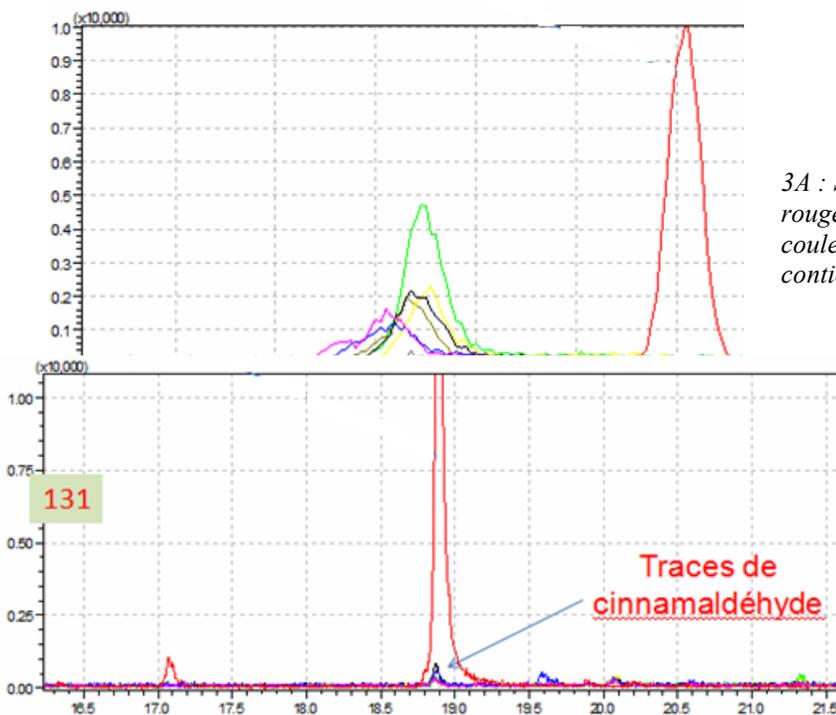
A gauche, tubes contenant 100 µL de jus de viande avant incubation /
A droite les mêmes tubes après incubation : le jaune indique un résultat négatif

Figure 2 : Résultats des expériences avec la méthode des 4 boîtes



Ligne du haut : les bactéries (jaune et blanc) poussent au contact des échantillons témoins négatifs (cuisse et bréchet)
Ligne du bas : les bactéries poussent également au contact des échantillons de cuisses prélevés à l'arrêt du traitement : le résultat est donc négatif

Figure 3 : Exemples de résultats obtenus suite aux analyses CPG-SM sur les jus de viande



3A : Spectrogramme obtenu pour l'eucalyptol (pic rouge = témoin positif). Il n'y a pas de pics de couleurs sous le témoin positif : les échantillons ne contiennent pas d'eucalyptol.

3B : Spectrogramme obtenu pour le cinnamaldéhyde (pic rouge = témoin positif). On observe des petits pics de couleur (un par jour de prélèvement) sous le témoin positif : les échantillons contiennent des traces de cinnamaldéhyde (5µg/kg)

EFFET D'UNE ASSOCIATION D'EXTRAITS DE PLANTES ET DE VITAMINE E SUR LES DEFAUTS DE WHITE STRIPING ET WOODEN BREAST DU FILET DE POULET.

Bébin Karine⁽¹⁾, Gardan-Salmon Delphine⁽¹⁾ et Panheleux-Lebastard Marina⁽¹⁾,
⁽¹⁾ CCPA, Z.A. Nord Est du Bois de Teillay, 35150 Janzé, France

kbebin@ccpa.com

RESUME

La production de poulet représente environ 90% de la production mondiale de volaille. La majorité de cette viande est consommée sous forme de découpe ou de produits transformés, provenant principalement de la production standard. Ces dernières années, la production fait face à l'apparition de défauts dégénératifs du filet : white striping, wooden breast, spaghetti meat. Ces défauts auraient des origines multiples : croissance, lignée, vascularisation du muscle, stress oxydatif et inflammation, conditions environnementales... Dans cette étude, nous avons mesuré les effets de l'apport d'une association d'extraits de plantes combinée à de la vitamine E dans l'aliment, sur la prévalence des défauts de white striping et wooden breast sur les filets de poulets. 216 poulets mâles Ross 308 ont été répartis en 3 groupes (18 cages de 4 poulets / groupe) : G1 = poulets recevant un aliment témoin contenant 80 ppm de vitamine E de 0 à 42j; G2 = aliment avec extraits de plantes (36,8 mg équivalent acide gallique/kg aliment) + 200 ppm de vitamine E de 0 à 42j ; G3 = même apport que G2 de 0 à 30j uniquement. Les niveaux nutritionnels des phases de démarrage, croissance et finitions étaient identiques pour les 3 groupes. Les performances de croissance ainsi que les poids de filet n'étaient pas différents entre les groupes. Les mesures de pHu du filet n'étaient également pas différentes (5,82, 5,85 et 5,84 respectivement pour G1, G2 et G3). La prévalence de white striping (note modérée) était significativement diminuée par l'apport d'extraits de plantes et vitamine E : 62,9%, 42,4% et 39,7% de présence respectivement pour G1, G2 (P<0,05) et G3 (P<0,01). Si des différences numériques existaient entre les groupes pour la prévalence du wooden breast (en faveur des groupes G2 et G3), aucun effet significatif des traitements n'a été reporté pour ce défaut. En conclusion, l'association de différents extraits de plantes ayant un rôle sur la protection cellulaire et la vascularisation, associée à de la vitamine E anti-oxydante, distribuée sur les premières périodes de vie permet d'améliorer la qualité des filets de poulet en diminuant la prévalence du défaut white striping.

Mots clés : Poulet, viande, white striping, wooden breast

ABSTRACT: EFFECT OF A PLANT EXTRACT ASSOCIATION ON WHITE STRIPING AND WOODEN BREAST APPERENCE IN CHICKEN BREAST.

Chicken production accounts for about 90% of world poultry production. The majority of this meat is consumed as cutting or processed products, mainly from standard production. In recent years, production has faced the appearance of degenerative defects in breast: white striping, wooden breast, spaghetti meat. These defects have multiple origins: growth, genetic, vascularization of the muscle, oxidative stress and inflammation, environmental conditions. In this study, we measured the effects of an association of plant extracts combined with vitamin E in the feed, on the prevalence of white striping and wooden breast defects on chicken breast. 216 male Chickens Ross 308 were divided into 3 groups (18 cages of 4 chickens/group): G1 = chickens receiving a control feed containing 80 ppm of vitamin E from 0 to 42j; G2 = diet with plant extracts (36.8 mg expressed as gallic acid equivalent/Kg of feed) + 200 ppm Vitamin E from 0 to 42j; G3 = same diet as G2 from 0 to 30d only. The nutritional levels of the starter, grower, and finisher feeds were identical between the 3 groups. The growth performances as well as the breast weights were not different between the groups. The post-mortem pH measurement in the breast were also not different (5.82, 5.85 and 5.84 respectively for G1, G2 and G3). The prevalence of white striping (moderate scores) was significantly reduced by the intake of plant extracts and vitamin E: 62.9%, 42.4% et 39.7% respectively for G1, G2 (P<0.05), and G3 (P<0.01). Despite numerical differences between groups for the prevalence of the wooden breast (in favour of the G2 and G3 groups), no significant treatment effect was reported for this defect. In conclusion, the association of different plant extracts having a role on cell protection, coupled with antioxidant vitamin E, distributed since early stage of growth improves the quality of chicken breast by decreasing the incidence of white striping.

INTRODUCTION

La production de poulet représente environ 90% de la production mondiale de volaille. La consommation des viandes de volaille se tourne de plus en plus vers les produits de découpe et transformés provenant principalement de la production standard (Petracci et Berri, 2017).

Ces dernières années, la production fait face à l'apparition de défauts dégénérateurs du filet, non visibles avant l'abattage : white striping, wooden breast, spaghetti meat. La fréquence d'apparition de ces défauts est plus élevée chez les poulets de souche lourde et présentant de forts rendements en filets (Kuttappan et al., 2009 ; Petracci et al., 2013 ; 2014). Les mâles sont également plus touchés que les femelles (Kuttappan et al., 2013 ; Meloche et al., 2014) concernant le white striping et le wooden breast.

Le white striping est caractérisé par la présence sur les filets de stries blanches parallèles aux fibres musculaires. Le wooden breast est défini par la présence de zones plus ou moins étendues présentant une texture plus dure, un aspect plus bombé et plus pâle sur les filets (avec pour les cas les plus sévères, présence d'un exsudat clair et visqueux et de pétéchie). Au niveau histologique, ces défauts sont associés à une dégénération/régénération des fibres musculaires, une fibrose, une lipidose, ainsi qu'une inflammation interstitielle et des dommages péri vasculaires (Kuttappan et al 2013, Sihvo et al 2014, 2017). Au niveau cellulaire, les phénomènes de nécrose s'accompagnent d'inflammation et de stress oxydatif.

L'objectif de cette étude est de mesurer les bénéfices d'un apport d'une association d'extraits de plantes aux propriétés bénéfiques sur la protection cellulaire et vasculaire, combinée à de la vitamine E, anti-oxydante, dans l'aliment, sur la prévalence des défauts de white striping et wooden breast sur les filets de poulets lourds.

1. MATERIEL ET METHODES

1. Animaux et alimentation

L'essai est mené sur 216 poulets mâles Ross 308 élevés de 1 à 42 jours en 54 cages de 4. A 1 jour, les animaux sont répartis en 3 lots en fonction de leur poids. Les poulets du groupe 1 (G1) reçoivent un aliment témoin contenant 80 ppm de vitamine E de 0 à 42 jours. Les poulets du groupe 2 (G2) reçoivent un aliment avec des extraits de plantes (36,8 mg équivalent acide gallique/kg aliment = MEGA® Tender, CCPA) + 200 ppm de vitamine E de 0 à 42 jours. Enfin, les poulets du groupe 3 (G3) reçoivent la même supplémentation que G2 de 0 à 30 jours uniquement. Les aliments des 3 groupes, pour chaque stade, ont été formulés sur la même base nutritionnelle (Tableau 1).

2. Mesures et analyses

2.1. Suivi des performances zootechniques

Les poulets ont été pesés par parquet à chaque transition alimentaire. Un bilan des consommations d'aliment par parquet est également réalisé à chaque phase.

2.2. Abattage

A 42 jours, 195 poulets sont abattus, plumés et vidés, conservés en chambre froide (4°C) pendant 24 h.

24h après l'abattage, les poulets sont découpés, les 2 filets sont pesés et le filet droit est prélevé pour mesure de pHu effectuée avec un pHmètre (Mettler Toledo) et une sonde d'insertion.

Une notation des défauts visuels de white striping et wooden breast a été effectuée sur les filets selon le référentiel ITAVI-INRA (Bourin et al., 2017).

3. Traitement statistique

Le traitement statistique des données (performances, pHu) a été réalisé par analyse de variance selon la procédure UNIANOVA (modèle linéaire général) de SPSS 17 avec l'effet traitement alimentaire et un seuil de signification de 5%.

Les notations ont été analysées avec un test de Khi-2 et les fréquences ont été comparées séparément pour chaque note de défauts (normale, modérée et sévère).

2. RESULTATS

1. Performances zootechniques

L'objectif de cet essai était de se placer dans des conditions favorables à l'apparition de défauts de viande. Les poulets de cet essai ont eu une croissance rapide (>80g de GMQ de 0 à 42j) et ont atteint un poids supérieur à 3,5kg à 42 jours.

Les performances des animaux ne sont pas statistiquement différentes entre les groupes de 0 à 42j (Tableau 2). Cependant, bien que le seuil de significativité ne soit pas atteint dans ce dispositif, on peut noter que les performances sont numériquement améliorées sur la phase de finition 30-42j dans le groupe G2.

2. Poids et pHu des filets

Le poids de filets et le pHu à 42 jours sont identiques selon les groupes, ne perturbant pas ainsi l'interprétation des notations de défauts de viande (Tableau 3).

La répartition par gamme de poids de filets est également similaire entre les groupes (~20% des filets inférieur à 400g et 28% supérieur à 470g) (Figure 1).

3. Notation des défauts white striping et wooden breast des filets

Les animaux témoin (G1) présentent une prévalence élevée en terme de défauts de viande (72,6% de white striping et 75,8% de wooden breast ; Figure 2).

La notation des filets montre une diminution des notes modérées pour le défaut white striping en présence de la supplémentation en extraits de plantes : 42,4% (P<0,05) et 39,7% (P<0,01) vs 62,9% pour les groupes G2 et G3, respectivement. Concernant les notes sévères, il existe une diminution numérique dans les groupes traités mais non significative (G1 : 9,7%, G2 : 3,0% et G3 : 4,8%).

Aucune différence significative n'est mise en évidence concernant le wooden breast, même si des différences numériques sont observées entre groupes pour les notes sévères (43,5%, 31,8% et 30,2% respectivement pour G1, G2 et G3 ; Figure 2).

DISCUSSION

Dans un contexte favorable à l'apparition de défauts visuels sur les filets (poulets lourds à croissance rapide), notre étude a permis de mettre en évidence une réduction significative des défauts de white striping par l'apport alimentaire d'extraits végétaux combiné à la vitamine E.

L'apport combiné d'extraits de plantes et vitamine E n'a pas eu d'impact sur les performances et le poids de filets des poulets. Dans la littérature, l'apport d'antioxydant sous la forme de vitamine E seule n'est pas suffisant pour réduire ces défauts

dégénératifs comme démontré par Kuttappan et al. (2012) même si de potentiels effets bénéfiques ont été observés au niveau histologique (Guetchom et al., 2012). De même, un ajout d'ingrédients visant à améliorer la vascularisation, apportés seuls, n'ont pas ou peu d'effets (cf. le cas de l'arginine, Zampiga et al. 2017).

L'apport conjoint et raisonné de différents extraits de plantes ayant des rôles sur la protection cellulaire et la vascularisation en synergie avec la vitamine E, anti-oxydante, permet sans doute de potentialiser les effets. La distribution depuis le début de la vie semble également importante. En effet, dans leur étude sur le développement et la morphologie du wooden breast au cours de la croissance chez le poulet, Sihvo et al. (2017) ont montré l'apparition de dommages vasculaires dès 10 jours d'âge puis des signes de myodégénérescence et de wooden breast à partir de 18 jours.

CONCLUSIONS

En conclusion, l'association de différents extraits de plantes ayant un rôle sur la protection cellulaire et la vascularisation du muscle, associée à de la vitamine E, distribuée dès les premières périodes de vie permet d'améliorer la qualité des filets de poulet en diminuant l'incidence du white striping. Cette solution, qui aide à diminuer les problèmes d'intégrité musculaire chez le poulet, doit être valorisée dans le cadre d'une démarche globale qui contribue à une bonne gestion de la courbe de croissance des animaux et des conditions d'ambiance de leur environnement d'élevage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bourin M., Souchet C., Baéza E., 2017. 12ème Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, pp 1085-1090.
- Kuttappan V.A., Brewer V.B., Clark F.D., Mac Kee S.R., Meullenet J.F., Emmert J.L., Owens C.M., 2009. *Poult. Sci.*, 88 (E-Suppl.1), 136-137.
- Kuttappan V.A., Goodgame S.D., Bradley C.D., Mauromoustakos A., Hargis B.M., Waldroup P.W., Owens C.M., 2012. *Poult. Sci.*, 91, 3230-3235.
- Kuttappan V.A., Brewer V.B., Mauromoustakos A., Mac Kee S.R., Emmert J.L., Meullenet J.F., Owens C.M., 2013. *Poult. Sci.*, 92, 811-819.
- Meloche K.J., Dozier W.A., Bilgili S.F., 2014. *Proceedings of XIV WPSA European Poultry Conference*, Stavanger (Norway).
- Petracci M., Mudalal S., Bonfiglio A, Cavani C., 2013. *Poult. Sci.* 92, 1670-1675.
- Petracci M., Mudalal S., Babini E., Cavani C., 2014. *Ital. J. Anim. Sci.* 13, 179-183.
- Petracci M, Berri C., 2017. *Poultry Quality Evaluation - Quality Attributes and Consumer Values.*, Technology and Nutrition, 370.
- Sihvo H.K., Immonen K., Puolanne E., 2014. *Vet. Pathol.*, 51, 619-623.
- Sihvo H.K., Linden J., Airas N., Immonen K., Valaja J., Puolanne E., 2017. *Vet. Pathol.*, 54, 119-128.
- Zampiga M., Laghi L., Petracci M., Zhu C., Meluzzi A., Dridi S., Sirri F., 2018. *J Anim Sci Biotechnol*, 9: 79.

Tableau 1. Valeurs nutritionnelles des aliments.

	Démarrage 0-10j	Croissance 10-21j	Finition1 21-30j	Finition2 30-42j
EM (kcal/kg aliment)	2950	3050	3100	3150
Matière grasse (%)	3.8	4.5	4.7	5.2
Protéines (%)	22.5	20.5	19.3	18.2
Lysine digestible (%)	1.15	1.10	1.05	0.98

Tableau 2. Effet d’une supplémentation alimentaire en extraits de plantes sur les performances de poulets abattus à 42 jours (n = 18 / groupe)

		G1	G2	G3	Etr*	p
0-30j	Poids 30j (g)	2070	2038	2023	74,1	0,458
	GMQ (g/j)	69,0	67,9	67,4	3,2	0,458
	CMJ (g/j)	93,4	92,4	91,8	3,8	0,396
	IC	1,354	1,360	1,362	0,0	0,298
30-42j	Poids 42j	3555	3613	3514	184,6	0,306
	GMQ (g/j)	123,8	131,2	124,2	14,9	0,267
	CMJ (g/j)	213,5	218,9	212,2	15,5	0,423
	IC	1,734	1,675	1,730	0,1	0,302
0-42j	GMQ (g/j)	83,7	85,1	82,7	4,4	0,306
	CMJ (g/j)	127,7	128,5	126,2	5,3	0,450
	IC	1,527	1,512	1,528	0,0	0,319

Tableau 3. Effet d’une supplémentation alimentaire en extraits de plantes sur les poids de filets et pHu de poulets abattus à 42 jours (n = 65 / groupe) (* : Etr = écart-type résiduel)

	G1	G2	G3	Etr	p
Poids de filets (g)	443	439	431	52,4	0,654
pHu du filet	5,82	5,85	5,84	0,2	0,856

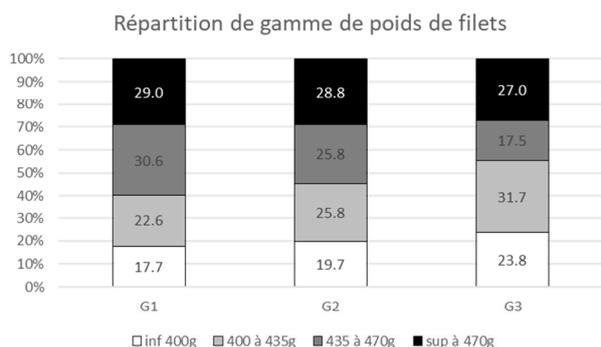


Figure 1. Répartition des poids de filet des 3 groupes de poulets abattus à 42 jours (n = 65 / groupe)

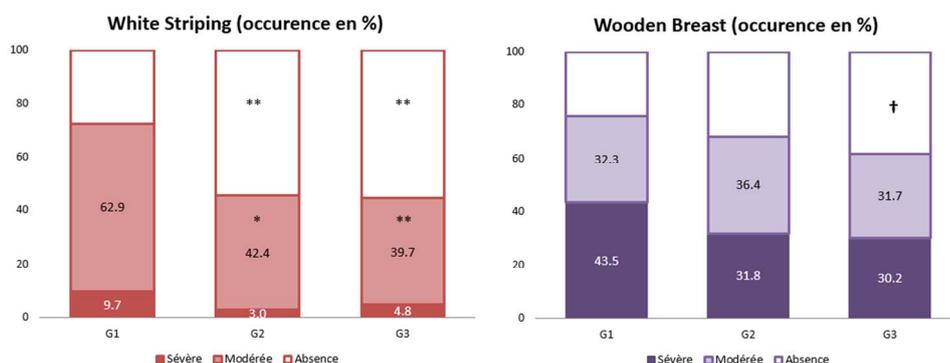


Figure 2. Effet d’une supplémentation alimentaire en extraits de plantes sur la prévalence du whitestriping et du wooden breast sur les filets de poulets abattus à 42 jours (n = 65 / groupe). Test Khi-2 en comparaison au G1 ; pour chaque note : † P=0,1, * P<0,05, ** P<0,01.

ÉVALUATION DE L'IMPACT DES TRAITEMENTS THERMIQUES DE PASTEURISATION SUR LE TAUX DE FONTE DU FOIE GRAS ENTIER DE CANARD

Provenzano Florian ^a ; Cordier Grégoire ^a ; Zuber François ^b

a : CTCPA Auch ; ZAC du Mouliot, 2 allée Dominique Serres, 32000 AUCH

b : CTCPA Avignon ; 449 Avenue Clément Ader, 84911 AVIGNON cedex 9

fzuber@ctcpa.org

RÉSUMÉ

La maîtrise du paramètre « taux de fonte » des foies gras est un facteur primordial pour les industriels tant sur les plans économique que technologique et réglementaire. Ce paramètre a déjà été étudié en relation avec la partie amont agricole (étapes d'élevage, gavage et abattage). Les objectifs du projet sont d'évaluer quantitativement l'influence des paramètres du traitement thermique final (température, durée, CUT (Come Up Time ou durée de montée en température), objectif de valeur pasteurisatrice) sur le comportement technologique de fonte du foie gras entier.

Des échantillons de foie gras de canard sont prélevés par carottages « en miroir » dans des zones réputées homogènes du gros lobe de foies gras de taille moyenne (450 – 550 g), puis traités soit au four soit à l'autoclave pour une pasteurisation. La méthodologie développée présente une répétabilité statistique acceptable (p value = 0,978) avec cependant des écarts (maximum de 7%) en valeur absolue. Ces écarts peuvent être dus au manque d'homogénéité des prélèvements carottés sans éveinage fin ou à l'hétérogénéité de la matière y compris dans une zone contiguë. Les pasteurisations thermiques combinant CUT (durée de montée en température) et température de barème : (CUT 10'/70°C) ; (CUT 10'/82°C) ; (CUT 40'/70°C) ; (CUT 40'/82°C) avec des durées calculées pour une même cible de valeur pasteurisatrice de 40 minutes à cœur, ne sont pas à l'origine de différences mesurables sur le paramètre taux de fonte, dont la variabilité semble surtout due aux différences de comportement intrinsèque entre les différents foies. La variation des paramètres propres au traitement thermique semble ainsi n'avoir quasiment aucune influence sur le taux de fonte du foie gras, avec le dispositif expérimental utilisé, pour cette gamme de taille de foie.

ABSTRACT

Impact assessment of pasteurization heat treatments on the melting rate of whole duck foie gras

Controlling the melting rate of duck whole Foie Gras during heat stabilization is key factor for manufacturers, for regulatory, technological and economic reasons. Melting rate was previously studied related to agricultural upstream steps: duck breeding, fattening, slaughter. The present study aims to quantitatively evaluate the impact of different pasteurization parameters (temperature, duration, Come Up Time, pasteurization value target) on the melting behavior. Samples of duck Foie Gras were taken by "mirror like" double coring out of homogeneous areas of the large lobe of medium-sized fatty livers (450 - 550 g), then heat treated for pasteurization either in oven or autoclave. This methodology has acceptable statistical repeatability (p value = 0.978) with deviations (maximum of 7%) in absolute value, due to a lack of homogeneity of the cored samples without deveining or to non-homogeneity of the material contained in an adjacent zone. The pasteurization treatments combining CUT (come up time) and pasteurization temperature: (CUT 10' / 70°C); (CUT 10' / 82°C); (CUT 40' / 70°C); (CUT 40' / 82°C), with scheduled duration adapted for the same pasteurization value target of 40 minutes at center point, did not impact on melting rate: variability of this parameter is more related to intrinsic behavior of the different foie gras samples. Variation of the heat treatment parameters seems to have no influence on the melting rate of fatty liver, with the experimental device used, within this range of liver size.

INTRODUCTION

La maîtrise du paramètre « taux de fonte » des foies gras est un facteur primordial pour les industriels tant sur les plans économique et réglementaire que technologique. Or, les connaissances sur les facteurs influençant ce paramètre sont principalement issues d'études réalisées par la partie amont agricole (influences des étapes d'élevage / gavage / abattage). Peu d'études ont évalué l'influence des paramètres des traitements thermiques sur le comportement technologique de fonte.

Les objectifs globaux du projet sont :

- Mettre au point une méthode expérimentale permettant de suivre le taux de fonte en continu en cours de traitement thermique.
- Évaluer les cinétiques de fonte du foie gras en cours de traitement thermique.
- Évaluer qualitativement et quantitativement l'impact des différents paramètres de pasteurisation (température, durée, CUT (Come Up Time ou durée de montée en température) sur le taux de fonte du foie gras entier.
- Définir une ou plusieurs modalités de process optimales vis-à-vis du paramètre taux de fonte.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Echantillonnage

Des foies gras frais de canard, éveinés, ont été utilisés, maximum 24 h après prélèvement à l'abattage, avec des poids moyens (450 – 550 g). Les foies sont travaillés dans une pièce climatisée (+12°C) afin de garantir une température constante et homogène des échantillons. Un prélèvement « en miroir » (appariement croisé), suivant la méthode illustrée ci-dessous, permet de comparer deux à deux des traitements thermiques de pasteurisation en verrines twist-off de 120 mL pour 90 g (2 morceaux de 45 g ± 0,5 g), prélevés sur des échantillons du gros lobe d'un même foie (**Figure 1**). Une série de 20 foies a été utilisée pour chaque essai. *Cette méthode permet de s'affranchir autant que possible de la variabilité intrinsèque du produit.*

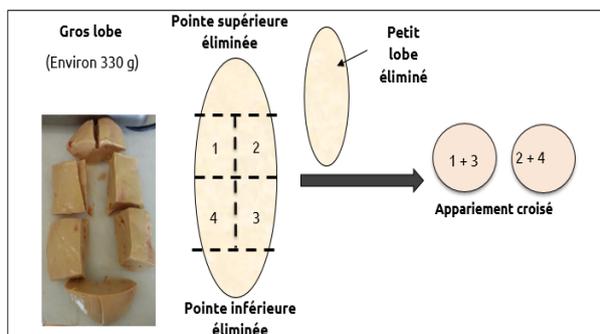


Figure 1. Prélèvement des échantillons dans les foies gras pour essais « en miroir »

1.2. Traitement thermique et évaluation du taux de fonte

Les bocaux sont traités en autoclave ou au four pour une pasteurisation. Dès la Valeur Pasteurisatrice cible atteinte (VP^{70}_{10}), les bocaux sont refroidis dans de l'eau à 20°C.

Les échantillons sont ensuite placés en chambre froide positive (+4°C) pendant 2 à 3 jours avant de déterminer leur taux de fonte suivant une méthodologie spécifiquement développée et validée pour l'étude : réchauffage de l'échantillon à 50°C pendant 2 heures afin d'enlever l'exsudat grasseux sans grattage.

Tableau 1. Plan d'expérience réalisé pour évaluer l'impact de la température de pasteurisation, et du Come Up Time (durée de montée en température de l'enceinte), pour une même VP cible de 40 minutes

	CUT (min)	T (°C)
Carottage 1	10	70
Carottage 2		82
Carottage 1	40	70
Carottage 2		82
Carottage 1	10	82
Carottage 2	40	

2. RESULTATS ET DISCUSSION

La comparaison des deux distributions est réalisée par paire entre les échantillons appariés, chacun traité à 70°C ou à 82°C. On constate (**Figure 2**) :

- Pour un même foie gras,
- Une même VP cible à cœur (40 min)
- Et une même durée de montée en régime, ou CUT (10 min),

➔ Une assez forte variation du taux de fonte d'un foie à l'autre. Ce résultat confirme la variabilité intrinsèque de comportement, bien connue, des foies gras.

➔ L'absence de corrélation entre poids de foie et taux de fonte dans une même classe de poids (450 à 550 g).

➔ **Les traitements thermiques à 70°C ou à 82°C, de durées différentes, conduisent sensiblement aux mêmes taux de fonte.** Pour un CUT nettement plus long (40 min), on constate également que, toutes choses égales par ailleurs, les traitements thermiques à 70°C ou à 82°C de durées différentes conduisent à encore quasiment aux mêmes taux de fonte (**Figure 3**).

La comparaison des deux distributions est également réalisée entre des échantillons appariés, traités l'un avec un CUT court 10 min et l'autre avec un CUT long 40 min. On constate que :

- Pour un même foie gras,
- Une même Valeur Pasteurisatrice cible (40 min)
- Et une même température de régime (82°C),

les traitements thermiques avec une montée en régime imposée de 10 ou 40 min conduisent aux mêmes taux de fonte (**Figure 4**).

Impact du niveau d'intensité cumulée de pasteurisation

Sur une population de 20 foies, nous constatons que le niveau de Valeur Pasteurisatrice cible (40 ou 100 min) est *a priori* sans impact sur le taux de fonte d'un foie gras de canard (**Figure 5**). La variance est de 0,2% pour les deux séries. Les moyennes ne sont pas statistiquement différentes.

Temps d'attente réfrigéré avant transformation

La durée d'entreposage réfrigéré entre l'abattage et le temps de traitement thermique des échantillons augmente le taux de fonte : écart de 20% à Jo+48h pour une VP = 40 min. (**Figure 6**). La variance est de 1% pour les deux séries.

Enfin, un comparatif suivant la même méthodologie « en miroir » a été réalisé sur une série de 20 foies entre un traitement de pasteurisation avec VP cible = 40 min, et un traitement d'appertisation à 105°C pour une Valeur Stérilisatrice (VS ^{121,1}₁₀) cible de 0,6 min : le taux de fonte est en moyenne 2,2 fois plus élevé pour le traitement d'appertisation (**Figure 7**). La variance est de 1% pour les deux séries.

CONCLUSION

Le protocole de carottage utilisé pour la méthode « en miroir » permet d'étudier avec succès les paramètres de process deux à deux, en s'affranchissant autant que possible de la qualité intrinsèque de la matière première. Une forte variabilité inter échantillon est constatée.

La variation des paramètres propres au traitement thermique (CUT, température) semble n'avoir quasiment aucune influence sur le taux de fonte du foie gras, avec le dispositif expérimental utilisé et pour une cible de VP prédéfinie. Ceci ouvre des perspectives sur des réductions de temps de traitement et donc sur la productivité des équipements de traitement thermique de type autoclave. Également, aucun impact de l'intensité de la pasteurisation (entre VP 40 ou 100 min), n'est observé.

Un entreposage réfrigéré de 48h entre l'abattage et le temps de traitement fait passer le taux de fonte de 6 à 26 %, soit une augmentation du taux de fonte d'un facteur 4. Ceci confirme la nécessité de réduire les délais entre l'abattage et la transformation pour réduire les taux de fonte.

Le traitement impacte le taux de fonte (en moyenne 2,2 fois plus élevé) lorsque l'on compare des traitements industriels usuels de pasteurisation et de stérilisation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Théron, L., Bouillier-Oudot, M., Marie-Etancelin, C., Bonnefont, C., Fernandez, X., Molette, C. 2013. La fonte lipidique du foie gras à la cuisson. *Inra Productions Animales*, 26(5) : 415-424

Leprettre S., Dubois J.P., Bouillier-Oudot M., Babilé R., 2002. Technique de gavage des oies : Incidence de la fréquence des repas et de la durée du gavage sur les performances et les caractéristiques technologiques et organoleptiques des foies gras – 5èmes Journ. Rech. Palmipèdes à Foies Gras, Pau, France.

Figure 5. Impact de la Valeur Pasteurisatrice sur le taux de fonte (moyenne de 20 foies)

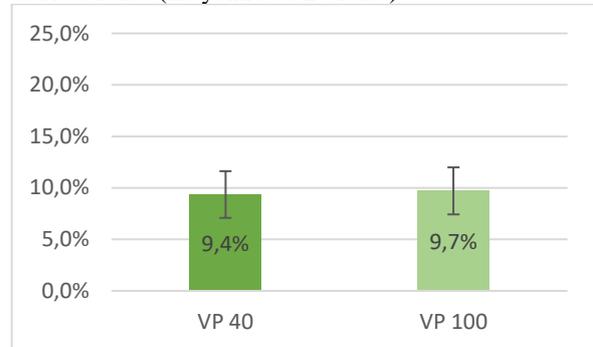


Figure 6. Impact du temps d'entreposage réfrigéré avant transformation, sur le taux de fonte

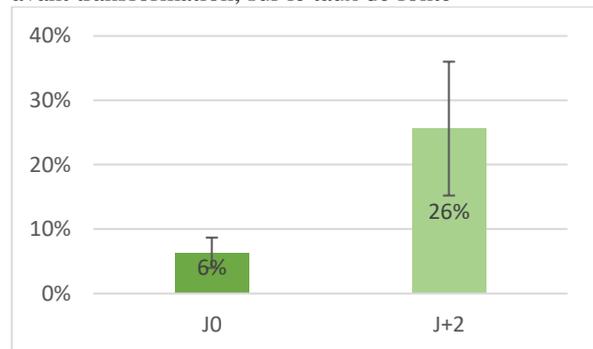


Figure 7. Comparatif entre traitement de pasteurisation et d'appertisation (stérilisation)

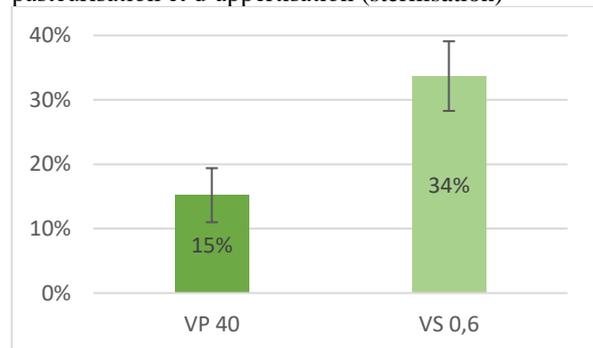


Figure 2. Impact de la température (70 et 82°C) de pasteurisation sur le taux de fonte, pour une Valeur Pasteurisatrice cible identique de 40 min., et pour un Come Up Time court : 10 min.

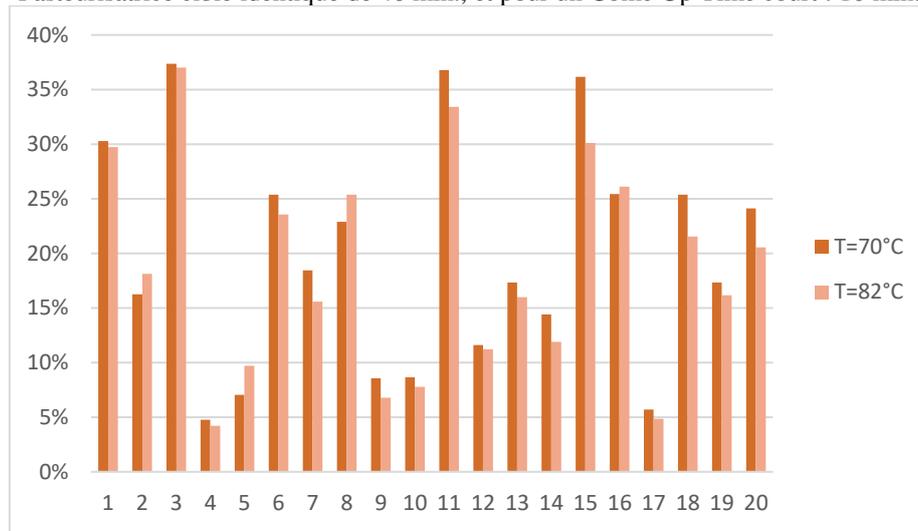


Figure 3. Impact de la température (70 et 82°C) de pasteurisation sur le taux de fonte, pour une Valeur Pasteurisatrice cible identique de 40 min., et pour un Come Up Time long : 40 min.

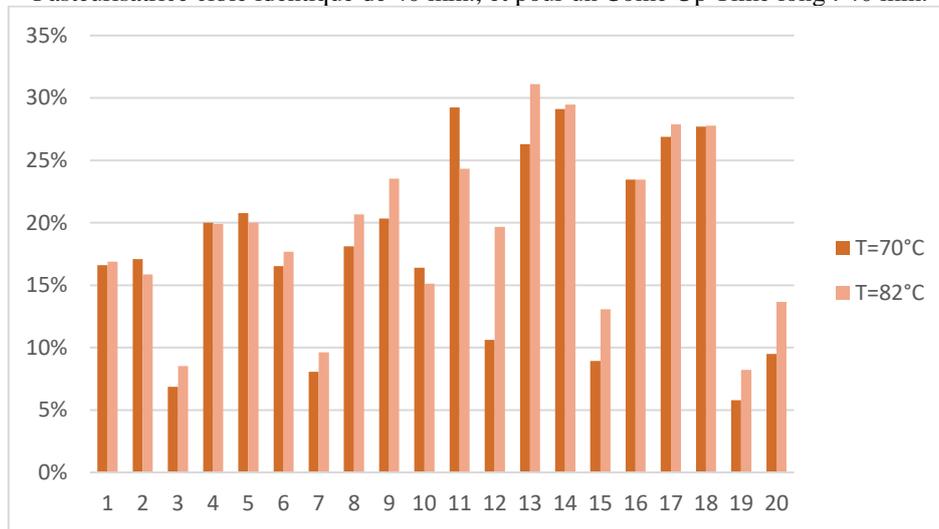


Figure 4. Impact de la durée de montée en température (Come Up Time = 10 et 40 min) sur le taux de fonte (température de pasteurisation : 82°C) pour une Valeur Pasteurisatrice cible identique de 40 min.

