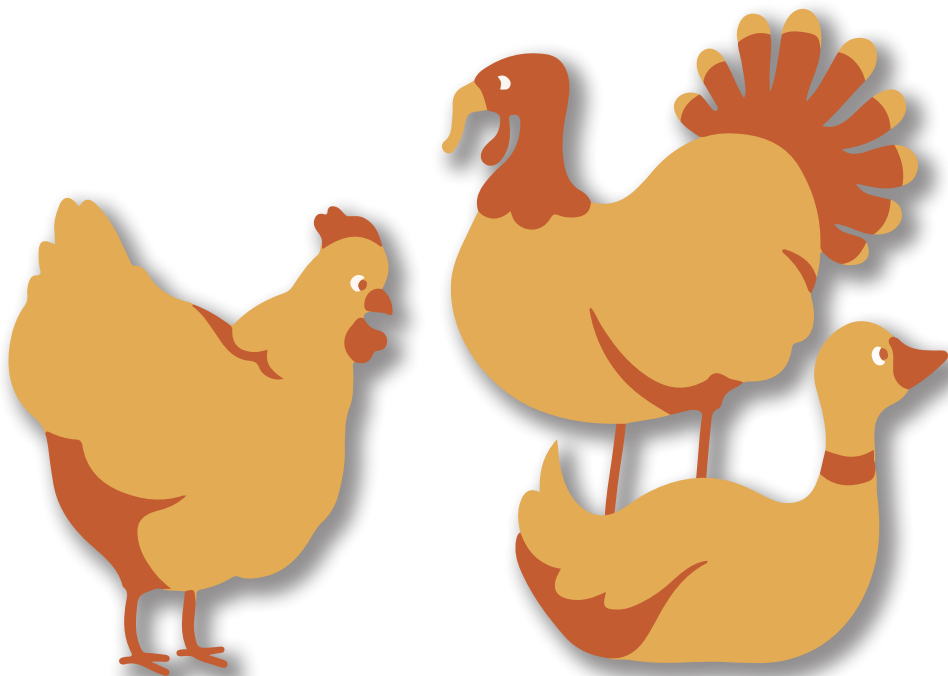


12^e Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras



5 & 6 avril 2017

TOURS - Centre des congrès Vinci



WVPA



INRA
SCIENCE & IMPACT



alimentation, environnement, travail



ITAVI



RAISING LIFE



NOTHING IS MORE PRECIOUS THAN LIFE. THAT IS THE PHILOSOPHY DRIVING PHILEO.

With global population increasing, the world faces a growing demand for sustainable food.

Phileo Lesaffre Animal Care works at the crossroads of nutrition and health. We are committed to delivering poultry health and performance solutions that contribute to food safety and the responsible use of antibiotics.

In every country, our progress is led by the most advanced science as well as practical on-farm experience.

phileo-lesaffre.com



ORVIA GOURMAUD SÉLECTION

5, La Seigneurtière – Saint-André-Treize-Voies
85260 MONTREVERD – FRANCE
Tél : +33 (0)2 40 02 02 00 // Fax : +33 (0)2 40 02 02 07
E-mail : contact@orvia.fr
WWW.ORVIA.FR

**MASTERING
A WHOLE PROCESS**

La maîtrise de tout un process

GENETIC SELECTION / Sélection Génétique

INTEGRAL INDUSTRIAL PROCESS / Processus Industriel Complet

ENVIRONMENT & ANIMAL WELFARE / Environnement & BEA

RISK MANAGEMENT / Management des Risques

CONSULTANCY & SERVICES / Conseils & Services

ST6



MUSCOVY DUCK
Canard de Barbarie

ST5



PEKIN DUCK
Canard Pékin

STIMUL



MULE DUCK
Canard Mulard

SI



WHITE & GREY GEESSE
Oie blanche & grise



Les 12^{èmes} Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras ont été organisées avec le soutien financier des sociétés et organismes suivants :



Ensemble, pour nourrir l'excellence

SESSION
HYGIENE ET QUALITE
DES PRODUITS

Synthèse

ÉMERGENCE DE NOUVEAUX PROBLEMES DE QUALITE DE LA VIANDE DE FILET CHEZ LE POULET DE CHAIR : QUELLES SONT LES CONNAISSANCES ACTUELLES ET LES PERSPECTIVES DE PROGRES ?

Berri Cécile¹, Bourin Marie², Toudic Claude³

¹URA, INRA, F-37380 Nouzilly, France

² Institut Technique de l'Aviculture, URA, BP, F-37380 NOUZILLY, France

³HUBBARD SAS, Mauguérand - BP169, F-22800 Le Foeil – Quintin, France

Cecile.berri@inra.fr

RÉSUMÉ

Depuis quelques années, l'industrie de la volaille est confrontée à de nombreux problèmes de qualité de viande qui ont un impact sur sa compétitivité. La viande de volaille est très sensible aux variations de pH post-mortem qui, en cas de valeurs extrêmes, conduisent à des défauts d'apparence, de conservation et de rendement. Plus récemment, des défauts qui atteignent l'intégrité du tissu musculaire, tels que le white striping et le wooden breast, sont apparus. Leur occurrence est clairement liée à l'augmentation de la vitesse de croissance et des rendements en muscle. Des analyses histopathologiques ont montré que ces phénomènes correspondent à une dégénérescence pouvant être suivie par une régénérescence des fibres musculaires, une fibrose, une lipidose, ainsi qu'une inflammation interstitielle. Des études récentes ont utilisé les technologies moléculaires à haut débit pour déterminer les dérégulations physiologiques impliquées dans l'apparition des principaux défauts de qualité de viande chez les volailles. Cette revue de synthèse a pour objectif de présenter les principales connaissances acquises à ce jour sur les processus biologiques à l'origine des défauts de qualité de viande chez les volailles et les perspectives d'amélioration possible pour réduire leur apparition.

ABSTRACT

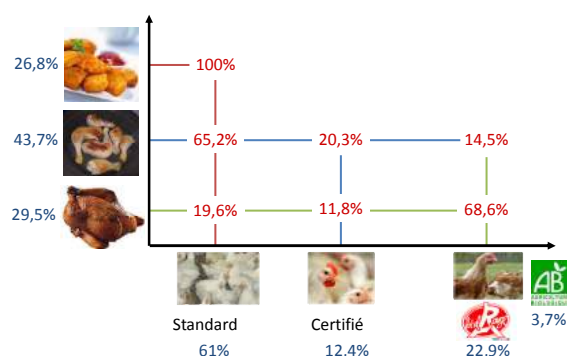
Emergence of new meat quality defects in poultry: what are the current knowledge and perspectives of progress?

In recent years, the poultry industry has faced many meat quality problems that have an impact on its competitiveness. Poultry meat is very sensitive to changes in post-mortem pH, which in the case of extreme values, lead to defects in appearance, storage ability and processing yield. More recently, defects that affect muscle integrity, such as white striping and wooden breast, have appeared. Their occurrence is clearly related to the increase in growth rate and breast muscle yields. Histopathological analyzes have shown that these defects correspond to a degeneration which can be followed by regeneration of the muscle fibers, fibrosis, lipidosis, as well as interstitial inflammation. Recent studies have used high-throughput molecular technologies to determine the physiological deregulations involved in the emergence of major meat quality defects in poultry. This review aims to present the main knowledge on the biological processes that cause meat quality defects in poultry and the prospects for possible improvement to reduce their appearance.

1. PRODUCTION DE VIANDES DE VOLAILLES

Au niveau mondial, la production de viandes de volailles est en constante progression (+ de 2 % par an). Elle constitue une source de protéines animales convoitée puisque rapide et peu chère à produire. Elle n'est pas concernée par des interdits religieux et pour cette raison sa consommation se développe dans la plupart des pays. Selon la FAO, la production de volailles en 2013 se situe au second rang mondial, juste derrière la viande de porc et loin devant la viande bovine. Le poulet représente à lui seul 90% de la production de volaille mondiale. A l'instar de la viande de porc, la volaille est largement utilisée pour la transformation en produits élaborés. Elle est aussi consommée sous forme de découpes et de moins en moins en carcasses entières. Ainsi, aux États-Unis la consommation de poulets entiers ne représente plus que 10% alors que celles des découpes et des produits élaborés sont respectivement de 40 et 50 %. En France, la répartition est plus équilibrée, le poulet entier représentant 29,5 % de la consommation, la découpe 43,4 % et les produits élaborés 26,8 % (données 2014). Ces deux derniers types de produits constituent les principaux débouchés de la production de poulets standards (figure 1).

Figure 1. Répartition de la consommation française de poulet (2014)



2. LES PRINCIPALES PROBLÉMATIQUES DE QUALITÉ

2.1 Défauts liés aux réserves énergétiques et au métabolisme post-mortem du muscle

Du fait de l'utilisation croissante de la viande de volaille pour la découpe et l'élaboration de charcuteries ou de produits élaborés cuits, des problématiques technologiques ont progressivement émergé. Comme chez le porc, dont la viande est largement transformée, il est apparu que les défauts technologiques mais aussi sensoriels sont

principalement liés à des variations importantes de métabolisme énergétique, qui influencent la glycolyse et donc la chute de pH qui se produit dans le muscle après la mort des animaux. Cette variabilité concerne essentiellement les muscles blancs du filet, dont le métabolisme est purement glycolytique. Comme chez le porc, la variabilité de la qualité s'exprime au niveau de la couleur, de la capacité de rétention d'eau (exsudat en frais et rendements technologiques au cours de la transformation) et de la texture de la viande cuite.

Des défauts de type PSE (« Pale, Soft, Exudative ») peuvent être observés en lien avec une accélération de la chute de pH juste après la mort des animaux, due en grande partie aux battements d'ailes que produisent les animaux lors de leur accrochage. Chez le poulet, ce type de défaut est essentiellement observé dans les productions alternatives qui utilisent des souches de volailles rustiques, à croissance lente, abattues à un âge deux fois plus élevé que les souches standards, et dont l'activité sur la chaîne d'abattage est nettement plus prononcée que celle des souches standards (Debut et al., 2003). Les défauts de type PSE peuvent aussi être observés au niveau du filet chez certaines souches lourdes de dinde (Fernandez et al., 2001). Ils résultent le plus souvent d'une chute de pH post-mortem rapide, conjuguée à un refroidissement lent du muscle.

Chez le poulet standard et jusqu'à récemment, la source principale de variabilité de la qualité reste néanmoins le pH ultime dont le niveau est largement déterminé par les réserves en glycogène du muscle présentes au moment de l'abattage (encore appelée potentiel glycolytique musculaire). Ainsi, il est fréquent d'observer des filets de poulet dont le pH ultime est très bas (< 5,7) ou au contraire très élevé (> 6,1) et qui présentent respectivement les caractéristiques de viandes acides (exsudatives, pâles et dures après cuisson) et DFD (« Dark, Firm, Dry ») qui sont au contraire sombres, sèches en bouche mais caractérisées par un excellent pouvoir de rétention d'eau (figure 2). En France, l'incidence des filets acides a été estimée à 16 % et celle des viandes à pH élevé à 11 % dans la filière standard (Enquête INRA/ITAVI, 2008-2010).

Figure 2. Viande DFD (à gauche) et acide (à droite)



2.2 Myopathies liées au potentiel de croissance des animaux

Depuis la fin des années 2000, plusieurs anomalies de texture, structure, composition et potentiel technologique de la viande de filet de poulet sont apparues d'abord en Italie, dans les pays du Nord de l'Europe, au Brésil et aux Etats-Unis. Ces pays ont en commun d'utiliser des souches à haut rendement en viande blanche à des poids d'abattage élevés. Ces anomalies appelées « white striping », « wooden breast » et « spongy fillets » (ou « filets spaghetti »), en référence à leur aspect visuel et leur texture, ont été décrites précisément dans une revue de synthèse présentée lors de la dernière édition des JRAPFG (Baéza et al., 2015).

Brièvement, le **white striping** (WS) correspond à l'apparition de stries blanches qui se développent parallèlement à l'axe des fibres musculaires (figure 3). Ce défaut concerne surtout le muscle *Pectoralis major* du filet mais peut aussi apparaître sur l'aiguillette (*Pectoralis minor*) ou certains muscles de la cuisse ou du dos. Les conséquences de la présence de WS pour la qualité sont multiples : en premier lieu, elle dégrade l'aspect du produit, qui a l'air plus gras et qui est moins bien accepté par le consommateur voire rejeté (Kuttapan et al., 2012b). Ce défaut va par ailleurs entraîner une modification de la valeur nutritionnelle de la viande, qui est à la fois plus grasse et moins riche en protéines (Kuttapan et al., 2013b). Sur le plan technologique, les filets atteints de WS sévère sont caractérisés par une mauvaise capacité de rétention d'eau, qui s'exprime par des pertes à la cuisson plus élevées, des rendements technologiques plus faibles, et une texture plus molle que celle des filets normaux (Petracci et al., 2013).

Figure 3. Filet atteint de white striping



Le **wooden breast** (WB, figure 4) se caractérise par une hétérogénéité de coloration, un exsudat de surface excessif et une perte d'élasticité du muscle qui se traduit au touché par une dureté anormale et l'apparition de zones bombées (Sihvo et al., 2014). Un même muscle peut être atteint par les deux types de défauts (WS et WB) mais ce n'est pas systématique.

L'aspect et la texture des filets atteints par le WB rend leur vente en frais quasiment impossible. Par ailleurs, leur utilisation par l'industrie de la transformation pose question puisque ces filets ont des caractéristiques fonctionnelles très peu adaptées à ce type d'utilisation. Ils présentent notamment un pouvoir de rétention d'eau très faible qui se traduit par des pertes élevées à la cuisson ou lors de prise de marinade (Soglia et al., 2016, Zambonelli et al., 2017).

Figure 4. Filets atteints de wooden breast



Ces défauts touchent tous les pays abattant et découpant des souches à croissance rapide et fort rendement en filets (parmi lesquelles les souches les plus distribuées au monde). Dans le même temps, la prévalence s'est fortement accentuée dans les premiers pays atteints. En conditions commerciales, les études publiées (Italie, Brésil) d'après des relevés faits en 2013-2015 donnent des prévalences de 20 à 80 % de WS, dont 1 à 10 % qualifiées de sévères. Les données sur le WB sont plus rares et celles sur les filets spaghetti sont quasi inexistantes.

Les résultats préliminaires d'une enquête qui a débuté en 2016 dans des abattoirs français montrent à partir de l'étude d'une quarantaine de lots que les filets des souches de poulets de production standard et semi lourdes (1,9 à 2,3kg) sont touchés par ces défauts musculaires. Le WS atteint la totalité des lots suivis et la proportion de filets atteints par ce défaut est comprise entre 33 à 90 %. Le WB est détecté dans 98 % des lots et affecte 10 à 70 % des filets. La proportion de filets spaghetti est loin d'être négligeable avec 65 % des lots touchés au sein desquels la part de filets affectés peut atteindre 20 %. Par ailleurs, il a été constaté que certains filets pouvaient être atteints simultanément par plusieurs de ces défauts, et tous lots confondus, cette proportion est en moyenne de 15 %.

En Italie, une étude similaire a montré des prévalences globales de WS de 70 et 82 % chez les poulets de chair de poids lourds (2,6 kg) et très lourds (3,6 kg), respectivement. Au sein de ces populations,

les pourcentages de WS sévère étaient respectivement de 13 et 26 % en moyenne (Russo et al., 2015).

En conditions expérimentales, la prévalence du WS peut atteindre des niveaux supérieurs à 80 %, celle du WB et des filets spaghetti, plus de 50 %. Les conditions expérimentales exacerbent ces défauts du fait d'une vitesse de croissance maximisée. L'évolution de la prévalence est si rapide, qu'elle rend les chiffres de l'année précédente caduques avant leur publication. La projection de la dynamique actuelle fait craindre la généralisation de ces myopathies sur les poulets lourds et une forte atteinte des poulets de moins de 2 kg à moins de 5 ans. La réduction de la vitesse de croissance par une dilution nutritionnelle significative, générale ou ciblée sur la lysine, semble plus efficace vis-à-vis du WB que du WS. Elle n'est pas employée à grande échelle du fait de la forte dégradation des performances. Les enrichissements en Vitamine E, Sélénium ou minéraux organiques n'ont pas prouvé leur efficacité.

Les conséquences économiques sont variables en fonction du contexte : arrêt des souches à très haut rendement filet (Italie, Allemagne) donc perte de potentiel de rendement ; Saisie par les Services Vétérinaires, en particulier pour le WB qui a un caractère rebutant ; Utilisation de la viande dans des produits élaborés même s'il y a une perte de rendement technologique. Au-delà des coûts immédiats, les myopathies du filet représentent un risque pour le bien-être des animaux et détériorent les qualités nutritionnelles de la viande. Enfin, elles font peser sur la filière un fort risque d'image en relation avec l'éthique.

L'ensemble des recherches menées sur les viandes de volailles montre que la plupart des caractéristiques de qualité de viande sont sous un contrôle complexe, incluant des facteurs génétiques, d'élevage et d'abattage. Ces facteurs influencent la façon dont les muscles se développent et en conséquence leur composition chimique, leur structure et leur métabolisme, pré- et post-mortem, caractéristiques qui vont dans leur ensemble déterminer la qualité finale du produit. Dans le but d'améliorer la compréhension des processus biologiques à l'origine des défauts de qualité, des études utilisant les méthodologies haut débit de génomique, protéomique et métabolomique ont été entreprises avec pour objectif final d'aider au développement de solutions innovantes de génétique ou d'élevage pour améliorer la qualité des viandes de volaille tout en préservant la compétitivité des filières

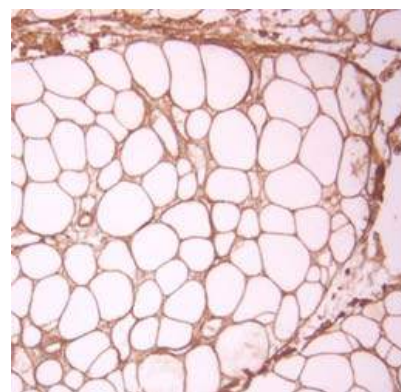
3. ETIOLOGIE ET PRINCIPAUX FACTEURS DE VARIATION

Comme mentionné précédemment, le **pH ultime** du filet est dépendant de la teneur en glycogène présent dans le muscle au moment de la mort de l'animal (Le Bihan-Duval et al., 2008). Il est influencé par de

nombreux facteurs, dont la génétique qui peut expliquer jusqu'à 40 % à 60 % de la variabilité observée au sein d'une population (Le Bihan-Duval et al., 2001 et 2008, Chabault et al., 2012, Alnahhas et al., 2014). L'alimentation, en particulier l'apport en acides aminés dans la période de finition, peut aussi moduler le pH ultime, dans une gamme de variation plus réduite mais avec néanmoins des conséquences en terme de couleur et de rétention d'eau (Berri et al., 2008, Guardia et al., 2014, Alnahhas et al., 2016). Enfin, comme chez la plupart des espèces les conditions qui précèdent l'abattage (mise à jeun, transport, variations de température, conditions d'accrochage...) vont influencer la mise en réserve ou au contraire l'utilisation du glycogène musculaire, affectant ainsi la vitesse initiale de chute de pH et/ou l'acidité finale de la viande (Gigaud et al., 2009).

Concernant le **WS** (figure 5), les analyses histologiques révèlent différents états d'avancement de nécrose des fibres musculaires selon la gravité du défaut (Ferreira et al., 2014). Par ailleurs, plusieurs phénomènes sont observés tels que la lipodose (accumulation de tissu adipeux) (Kuttappan et al., 2013b), la fibrose (accumulation de tissu conjonctif interstitiel) (Kuttappan et al., 2013b), la présence de lésions myopathiques (fibres hyper-éosinophiles, internalisation du noyau cellulaire, infiltrations de cellules inflammatoires tels que les lymphocytes et les macrophages) (Kuttappan et al., 2013b), de fibres musculaires en dégénérescence (Mazzoni et al., 2015) et une variabilité accrue de la taille des fibres (Mazzoni et al., 2015).

Figure 5. Vue histologique d'un filet atteint de white striping. On note en particulier un remplacement des fibres musculaires par des composants de la matrice extracellulaire



Même si l'étiologie du défaut reste encore largement méconnue, l'influence de certains facteurs d'élevage ou liés à l'animal a pu être montrée. Ainsi une étude récente a démontré que l'apparition de ce défaut est sous fort contrôle génétique avec un niveau d'hérédité (h^2) de 0,65 (Alnahhas et al., 2017). Cette étude a par ailleurs révélé des niveaux de corrélations génétiques positives extrêmement élevées

avec le rendement en filet ($r_g = 0,68$) mais aussi la teneur en lipides intramusculaires ($r_g = 0,63$). Le lien entre WS et poids vif des animaux est plus faible mais néanmoins significatif ($r_g = 0,33$).

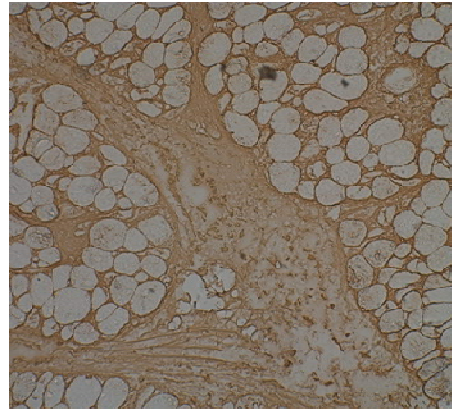
En lien avec ces résultats, il a été montré que la classe commerciale des poulets influence largement la proportion de cas modérés et sévères de WS qui augmente avec le format des animaux : moyen-femelles (2,2 à 3,0 kg) < moyen-mâles (2,2 à 3,0 kg) < mi-lourd-mâles (3,0 à 3,8 kg) < très lourd-mâles (3,8 à 4,2 kg) (Lorenzi et al., 2014). De manière générale, les animaux mâles, plus lourds que les femelles, seraient davantage touchés par le WS (Kuttappan et al., 2013a).

La fréquence d'apparition du défaut WS varie également selon l'origine génétique des animaux. Selon le type de souches présentant des rendements en filets modérés à élevés, la fréquence des cas sévères peut aller de 2,9 à 19 % (Kuttappan et al., 2013a). Les souches à rendement en filet élevé présentent des fréquences de cas modérés et sévères supérieures à celles des poulets à rendement standard (Petracci et al., 2013 ; Lorenzi et al., 2014). De manière intéressante, il a été récemment montré que la fréquence d'apparition et la gravité du WS étaient également plus importantes dans une lignée sélectionnée pour un pHu élevé par rapport à une lignée sélectionnée pour un pH acide (Alnahhas et al., 2017), suggérant un lien négatif possible entre réserves énergétiques musculaires (sous forme de glycogène) et occurrence du défaut.

En influençant la croissance et le développement relatif du filet, l'alimentation influence également l'incidence du WS. En effet, l'incidence des cas sévères de WS diminue quand on réduit la densité énergétique et protéique des aliments (Kuttappan et al., 2012a). De même, distribuer des aliments qui respectent au plus près les besoins en acides aminés des animaux (en mixant des aliments à forte et basse densité ou en supplémentant en lysine) favorise la croissance musculaire mais également l'apparition de cas sévères de WS (Kuttappan et al., 2013a, Cruz et al., 2016).

Dans le cas du **WB** (figure 6), il a été observé des fibres en division, dégénérées et parfois lysées, avec des phénomènes de lipidose mais surtout de fibrose associés (Sihvo et al., 2013). De plus, des cellules inflammatoires de type lymphocytaires sont présentes. On note également une accumulation de tissu conjonctif interstitiel donnant lieu à des striations blanches allant de 0,5 à 3 mm de largeur. Dans l'étude de Sihvo et al. (2013), les muscles *Pectoralis major* présentant visuellement le défaut WB ont été caractérisés histologiquement par une myo-dégénérescence régénérative de fibres musculaires.

Figure 6. Vue histologique d'un filet atteint de wooden breast. On note en particulier l'expansion très importante du tissu conjonctif au détriment des fibres musculaires



Il existe moins de données disponibles dans la littérature concernant les facteurs de variations de ce défaut. Selon l'étude de Bailey et al. (2015) l'héritabilité du défaut est relativement faible ($h^2 = 0,024$ à $0,097$ selon la lignée étudiée) et la corrélation génétique avec le WS est modérée ($0,2$ à $0,35$). Certains travaux suggèrent que l'apparition du WB pourrait être liée à une faible teneur en Sélénium et/ou en vitamine E susceptible(s) d'altérer la capacité anti-oxydative contre le stress oxydatif dans le muscle *Pectoralis major* (Immonen, communication personnelle). De plus, selon cet auteur il semblerait que les mâles seraient davantage touchés que les femelles.

4. PROCESSUS BIOLOGIQUES IMPLIQUES DANS L'APPARITION DES DEFAUTS DE QUALITE

4.1 Généralités

Depuis une quinzaine d'années, des études ont été entreprises basées sur l'utilisation de méthodologies haut débit pour avoir une meilleure connaissance des bases génétiques (recherche de mutations ou de marqueurs génétiques) et des processus biologiques impliqués dans l'apparition des défauts de qualité de viande chez les volailles. Ces études ont essentiellement été menées chez le poulet, en raison de la disponibilité plus forte d'outils pour cette espèce (puces SNP et à ADN, notamment) et aussi de l'importance grandissante de cette filière. Les premières études se sont intéressées à l'expression des gènes et plus récemment aux variations de teneur en métabolites ou protéines afin d'avoir une vision intégrée des modifications physiologiques liées à l'apparition des défauts de qualité mais aussi d'évaluer la possibilité d'identifier des marqueurs génétiques ou biologiques non invasifs (sanguins par exemple) à même de prédire le potentiel de qualité de viande d'un animal.

Du fait de l'apparition relativement récente des défauts liés à la croissance des animaux (WS, WB, ...), les premières approches dites à haut-débit ont été d'abord consacrées aux mécanismes biologiques impliqués dans les variations de qualité liées à la cinétique de pH post-mortem et aux réserves énergétiques (glycogène) du muscle. Plus récemment, des études ont été réalisées en lien avec l'apparition des défauts émergents WS et WB.

Les recherches sur les transcrits musculaires ont été basées dans un premier temps sur l'utilisation de puces à ADN (ou microarray) qui sont actuellement composées de 60 000 sondes oligonucléotides et permettent l'analyse simultanée d'environ 40 000 gènes uniques. L'expression des gènes peut aussi être quantifiée par des techniques de séquençage (RNA-seq) qui permet d'avoir des informations complémentaires sur d'éventuels polymorphismes de séquence. On peut aussi faire appel à des techniques microfluidiques, dites à moyen débit, qui permettent de quantifier simultanément par PCR en temps réel l'expression d'une centaine de gènes sur une centaine d'individus. L'analyse des métabolites peut être réalisée par différentes méthodes spectrales : la RMN (Résonnance Magnétique Nucléaire) haute résolution ou des méthodes de chromatographie gazeuse ou liquide couplées à la spectrométrie de masse. Enfin, les analyses protéomiques sont généralement réalisées par électrophorèse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse.

Les analyses transcriptomiques ont été essentiellement menées sur le muscle *Pectoralis major* du filet qui est le plus concerné par les problèmes de qualité. Ces études ont mis à profit plusieurs types de dispositifs animaux. Ainsi, des comparaisons ont été réalisées en considérant des groupes d'animaux extrêmes en terme de qualité des viandes issus de lignées expérimentales, de croisements commerciaux ou de populations pedigree pour lesquelles on dispose de l'information génétique des animaux et qui permettent de valoriser les données obtenues sur la transcription des gènes dans des études de génomique positionnelle qui visent à identifier les zones du génome (QTL), marqueurs génétiques ou mutations impliquées dans le contrôle génétique des caractères de qualité étudiés.

Ainsi, c'est grâce à cette démarche qu'il a été possible de détecter un QTL d'expression (ou eQTL) qui a permis de démontrer que le gène BCMO1 (qui code la β -carotène 15,15'-monooxygénase 1) était responsable des variations de coloration jaune de la viande de poulet, et a accéléré l'identification de mutations causales au sein de sa région promotrice (Le Bihan-Duval et al., 2011). Ces résultats ont conduit au développement d'un test génétique breveté (Le Bihan-Duval et al., 2010) et actuellement disponible pour les sélectionneurs qui souhaitent maîtriser la coloration

jaune du filet de poulet, notamment en réponse aux variations de composition des rations alimentaires. Une démarche similaire est actuellement en cours pour identifier les polymorphismes impliqués dans le contrôle du pHu (Le Bihan-Duval et al., 2017) et du défaut WS.

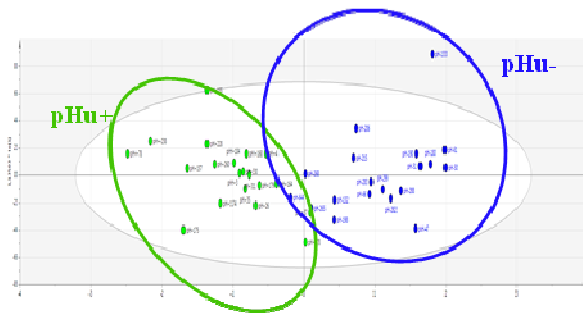
4.2 Déterminisme des caractères de qualité liés à la cinétique de pH post-mortem dans le muscle

Concernant le pHu du filet, un premier réseau de gènes a été obtenu en étudiant le transcriptome musculaire de deux lignées expérimentales de poulets, maigre et grasse, qui en plus de se différencier sur leur engraissement abdominal présentent des teneurs en glycogène musculaire différentes (gras > maigre) et des caractéristiques de qualité de viande bien spécifiques (Sibut et al., 2008). L'étude a mis en évidence l'intervention de plusieurs voies importantes pour le contrôle du glycogène dans le muscle comme la voie AMP dépendante impliquant le complexe AMPK (AMP-activated protein kinase) mais aussi des voies de signalisation dépendantes de l'AMP cyclique ou encore impliquées dans le contrôle de la disponibilité des glucides dans le muscle (Sibut et al., 2011).

Pour s'affranchir des liens entre engraissement périphérique et capacités de stockage du glycogène musculaire, un dispositif de lignées divergeant spécifiquement sur le pH ultime du filet a été créé (Alnahhas et al., 2014, 2015). Au bout de 6 générations de sélection, la différence moyenne de pHu était proche de 0,5 unité pH entraînant des différences de qualité marquées entre les deux lignées (pHu+ et pHu-), notamment en termes de couleur, de pouvoir de rétention d'eau, de texture mais aussi de susceptibilité à l'oxydation. Une analyse plus fine des muscles a permis de montrer que la différence de pHu observée entre lignées correspond à une différence de glycogène musculaire proche de 20% et que le nombre de capillaires par fibre est par ailleurs inférieur d'environ 20% dans les muscles à pHu élevé par rapport aux muscles produisant des viandes acides (Alnahhas et al., 2015).

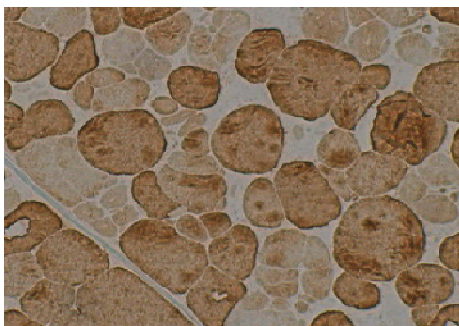
Des premières analyses RMN réalisées au niveau du muscle mais aussi du sérum ont mis en évidence des signatures métaboliques très spécifiques aux deux lignées (figure 7). Les changements observés ont permis d'avoir une vision intégrée des voies métaboliques privilégiées pour la production d'énergie dans les muscles à haut et bas pHu (Beaulercq et al., 2016). Ainsi, si la lignée pHu-sollicite essentiellement des voies métaboliques basées sur l'utilisation des glucides, la lignée pHu+ met en œuvre d'autres mécanismes impliquant de la protéolyse musculaire, du catabolisme des acides aminés, des processus d'oxydation, y compris lipidiques, ce qui en retour stimule les processus de réponse au stress oxydant au niveau musculaire.

Figure 7. Modèle basé sur la quantification de 7 métabolites sanguins (acétylglutamine, arginine, formate, glucose, hypoxanthine, phénylalanine, xanthine) permettant de discriminer ($R^2Y(\text{cum}) = 0,73$) des filets à pH élevé ou acide



En complément de ces résultats, une récente analyse du protéome de muscles à pH normal ou acide indique que la plupart des protéines surreprésentées dans les muscles acides participent au métabolisme glycolytique, la contraction musculaire et la régénération de l'ATP (Desai et al., 2016). Par ailleurs, l'analyse du transcriptome musculaire des animaux pHu+ et pHu- a mis en évidence près de 1500 gènes différentiellement exprimés entre lignées. L'analyse fonctionnelle a confirmé l'utilisation intensive du métabolisme des glucides dans les muscles de la lignée pHu- et le recours à des voies cataboliques alternatives pour produire de l'énergie dans le muscle des poulets pHu+. De manière intéressante, cette analyse a également révélé qu'un grand nombre de gènes surexprimés dans le muscle à haut pHu sont impliqués dans le remodelage musculaire et la réponse au stress oxydatif suggérant qu'un déficit énergétique pouvait compromettre le développement et l'intégrité du tissu musculaire. D'ailleurs, l'analyse conjointe de coupes histologiques et des profils d'expression génique a mis en évidence un processus de régénérescence des fibres musculaires plus intense dans le muscle à haut pH par rapport aux muscles acides (figure 8).

Figure 8. Illustration de présence de fibres en régénérescence (en clair) sur une coupe histologique de filet de poulet



L'ensemble des observations réalisées sur les lignées pHu+ et pHu- sont extrêmement intéressantes puisqu'elles soulignent le rôle probable d'une baisse du statut énergétique dans les processus de régénérescence musculaire qui sont largement impliquées dans la mise en place des défauts émergents de WS et de WB.

4.3 Déterminisme des défauts émergents white striping et wooden breast

Le white striping. Une analyse différentielle du transcriptome musculaire a été réalisée en comparant des individus sur la base de leur phénotype (présence ou non du défaut) et de leur génotype (homozygote à un marqueur SNP identifié par une analyse QTL comme étant impliqué dans le contrôle du défaut WS) (Combémoré et al., 2015). L'analyse fonctionnelle des données a révélé deux voies majeures de régulation potentiellement liées à l'apparition du défaut : la voie Wnt/Ca+, qui régule le Ca+ cellulaire et le développement précoce du muscle, et une voie impliquant l'Hepatocyte Growth Factor (HGF) qui contribue à l'activation des cellules satellites (cellules souches musculaires) pour former de nouvelles fibres lors de la régénérescence musculaire (Volonte et al., 2005). Ces observations peuvent être mises en relation avec la présence plus fréquente de foyers de régénérescence cellulaire dans les muscles atteints de WS et qui pourrait impliquer des mécanismes moléculaires similaires à ceux activés durant la myogenèse. D'ailleurs, parmi les fonctions biologiques révélées par l'analyse fonctionnelle, une participe au développement musculaire et implique plusieurs réseaux de gènes qui contribuent à la prolifération et à la différenciation des cellules musculaires. Enfin, parmi les gènes différentiels identifiés, certains sont impliqués dans l'apparition de différents syndromes comme l'hyperplasie du tissu conjonctif ou la lipodystrophie (perte du tissu adipeux sous-cutané) qui peut être associée à des modifications de type myopathique au sein du muscle (Rajab et al., 2010 ; Llamas-Velasco M et al., 2012).

Le wooden breast. Dans une démarche impliquant à la fois des analyses transcriptomiques et métabolomiques, il a été possible de décrire précisément les principaux processus biologiques impliqués dans la mise en place du défaut WB. Ainsi l'analyse RNA-seq de filets de poulets indemnes ou atteints par le WB a mis en évidence que l'apparition du défaut était lié à plusieurs processus dont : l'accumulation anormale de calcium intracellulaire, des phénomènes d'hypoxie localisée, l'augmentation du stress oxydatif et l'accumulation de ROS (espèces réactives à l'oxygène), le changement de typologie des fibres des types rapides vers lents, l'augmentation de la réparation cellulaire et de la régénérescence dans le muscle squelettique, la régulation négative de gènes

liés au système de coagulation et au contraire la surexpression des gènes codant différentes formes de collagènes musculaires (Mutryn et al., 2015). De manière cohérente, une analyse ciblée réalisée par PCR en temps réel a aussi révélé la surexpression de plusieurs gènes ayant un rôle dans l'organisation du collagène et dans les processus de réparation de lésions des fibres musculaires impliquant les cellules satellites (Velleman et Clark, 2015).

L'analyse du profil en métabolites des muscles atteints de WB a confirmé leur faible statut énergétique (teneur en glycogène 1,7 fois plus basse), l'augmentation du stress oxydatif, des niveaux élevés de composés protéiques, signe d'une dégradation musculaire intense, une modification des voies d'utilisation du glucose et une altération de l'homéostasie redox (Abasht et al., 2016). Cette étude a aussi mis en évidence un certain nombre de métabolites discriminants entre muscles normaux et atteints par le WB, dont l'hypoxanthine et la xanthine, qui de manière intéressante sont les catabolites dont la teneur sanguine est la plus différentielle entre les individus pHu+ et pHu- (pHu+ > pHu-, Beauclercq et al., 2016).

En accord avec l'ensemble de ces résultats, une étude vient d'être publiée qui décrit les modifications transcriptomiques liées à l'apparition conjointe du WB et du WS (Zambonelli et al., 2017). Elle confirme que les gènes différentiels exprimés dans les muscles affectés interviennent dans les processus d'inflammation, de dégénérescence et de régénérescence musculaire, le stress oxydatif, l'altération de l'homéostasie ionique et du métabolisme du glucose, la lipodose, la fibrose et la synthèse des protéoglycanes.

D'une manière générale l'ensemble des observations réalisées sur les défauts de viande liés à un déficit énergétique des muscles ou à leur potentiel de croissance révèle des voies de régulations physiologiques communes :

- L'augmentation de la dégradation protéique et du catabolisme des acides aminés qui induirait des processus de régénérescence des fibres musculaires, avec des conséquences en termes de type contractile et métabolique.
- Une diminution de la vascularisation des muscles qui pourrait être à l'origine de leur mauvaise oxygénation, d'une utilisation accrue des réserves glycolytiques du muscle et d'une augmentation du stress oxydatif et de la production de ROS conduisant à une réduction de l'homéostasie redox du tissu musculaire.

Dans le cas des défauts WB et WS des processus biologiques spécifiques ont également été mis en évidence :

- Une nécrose plus prononcée des fibres musculaires qui induit des processus de réparation cellulaire à

l'origine de l'extension plus ou moins importante de tissu de soutien (ou matrice extracellulaire) au détriment des fibres musculaires et qui sont à l'origine des phénomènes d'inflammation, de fibrose et de lipodose qui caractérisent ces défauts.

- Une accumulation de Ca⁺⁺ intracellulaire à même d'induire des dommages cellulaires importants liés notamment à l'activation de protéases et de lipases et qui peuvent être en partie responsables de dérégulations biologiques telles que la dégradation des fibres musculaires, la perte d'intégrité membranaire, la diminution de l'activité mitochondriale et l'augmentation de la production de ROS.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La production de volaille 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 énergétique, hypertrophie des fibres musculaires) jusqu'à entraîner des dérégulations métaboliques et cellulaires à l'origine des défauts actuels. La problématique est complexe puisque l'apparition de ces défauts est relativement récente et l'augmentation de leur incidence extrêmement rapide. Les recherches menées ont permis d'améliorer nos connaissances sur les différents processus biologiques impliqués dans l'apparition de ces défauts mais pour l'heure aucune solution n'a été identifiée pour réduire leur incidence sur le terrain. On peut néanmoins faire l'hypothèse qu'une partie de la solution passera par l'amélioration génétique, qui s'est malheureusement peu intéressée à la qualité des viandes jusqu'à ce jour, mais aussi (et certainement en complément) par des solutions nutritionnelles ou d'élevage permettant de préserver les réserves énergétiques du muscle et de réduire les processus de dégénérescence / régénérescence des fibres musculaires durant la croissance des animaux. Sur le plan pratique, la mise en place de ces solutions sera facilitée par le développement d'outils non invasifs de prédiction de la qualité (marqueurs génétiques, métabolites sanguins par exemple) qui pourront être utilisés à des fins de sélection ou dans le cadre d'étude sur l'impact des conditions d'élevage. 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.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abasht B., Mutryn M. F., Michalek R. D., Lee W. R., 2016. PloS one, (11), e0153750.
- Alnahhas N., Berri C., Boulay M., Baéza E., Jégo Y., Baumard Y., Chabault M., Le Bihan-Duval E., 2014. J. Anim. Sci., (92), 3816-3824.
- Alnahhas N., Berri C., Chabault M., Chartrin P., Boulay M., Bourin M. C., Le Bihan-Duval E., 2016. BMC Genet. (17), 61.
- Alnahhas N., Berri C., Chabault-Dhuit M., Bourin M., Arnould C., Le Bihan-Duval E., 2017. Animal, (11), 335-344.
- Alnahhas N., Le Bihan-Duval E., Baéza E., Chabault M., Chartrin P., Bordeaux T., Cailleau-Audouin E., Météau K., Berri C., 2015. J. Anim. Sci., (93), 4524-4531.
- Baeza E., Bourin M., Allain V., Roul H., Prigent J. P., Le Bouquin S., Magras C., 2015. In : 11. Journées de la Recherche Avicole et des Palmipèdes à Foie Gras. pp. 1095-1103.
- Bailey R. A., Watson K. A., Bilgili S. F., Avendano S., 2015. Poult. Sci., (94), 2870-2879.
- Beauclercq S., Nadal-Desbarats L., Hennequet-Antier C., Moroldo M., Le Bihan-Duval E., Berri C., 2015. In: 17. European Symposium on the Quality of Poultry Meat, Nantes, France.
- Beauclercq 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.
- Berri C., Besnard J., Relandeau C., 2008. Poult. Sci., (87), 480-484.
- Chabault M., Baeza E., Gigaud V., Chartrin P., Chapuis H., Boulay M., Arnould C., D'Abbadie F., Berri C., Le Bihan-Duval E. 2012. BMC Genet. 13.
- Combémourel C. 2015. Mémoire de fin d'étude d'ingénieur, VetAgroSup, Clermont-Ferrand
- Cruz R.F., Vieira S.L., Kindlein L., Kipper M., Cemin H.S., Rauber S.M., 2016. Poult. Sci., pii: pew310.
- 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.
- Desai M.A., Jackson V., Zhai W., Suman S.P., Nair M.N., Beach C.M., Schilling M.W., 2016. Poult. Sci., (95), 2696-2706.
- Fernandez X., Sante V., Baeza E., Le Bihan-Duval E., Berri C., Remignon H., Babile R., Le Pottier G., Millet N., Berge P., Astruc T., 2001. Br. Poult. Sci., (42), 462-469.
- Ferreira T.Z., Casagrande R.A., Vieira S.L., Driemeier D., Kindlein L., 2014. J. Appl. Poult. Res., (23), 748-753.
- Gigaud V., Le Bihan-Duval E., Berri C., 2009. In : 8. Journées de la Recherche Avicole. pp. 124-131.
- Guardia S., Lessire M., Corniaux A., Metayer-Coustard S., Mercierand F., Tesseraud S., Bouvarel I., Berri C., 2014. Poult. Sci., (93), 1764-1773.
- Kuttappan V.A., Brewer V.B., Apple J.K., Waldroup P.W., Owens C.M., 2012a. Poult. Sci., (91), 2677-2685.
- Kuttappan V.A., Brewer V.B., Mauromoustakos A., McKee S.R., Emmert J.L., Meullenet J.F., Owens C.M., 2013a. Poult. Sci. 92, 811-819.
- Kuttappan V.A., Goodgame S.D., Bradley C.D., Mauromoustakos A., Hargis B.M., Waldroup P.W., Owens C.M., 2012b. Poult. Sci., (91), 3230-3235.
- Kuttappan, V. A., H. L. Shivaprasad, D. P. Shaw, B. A. Valentine, B. M. Hargis, F. D. Clark, S. R. McKee, and C. M. Owens. 2013b. Poult. Sci. 92 (2): 331-38.
- Le Bihan-Duval E., Berri C., Baeza E., Millet N., Beaumont C., 2001. Poult. Sci., (80), 839-843.
- Le Bihan-Duval E., Debut M., Berri C. M. C., Sellier N., Santé-Lhoutellier V., Jégo Y., Beaumont C., 2008. BMC Genet., (9), 53.
- Le Bihan-Duval E., Nadaf J., Berri C., Duclos M., Pitel F. 2010. Marqueurs génétiques pour la coloration de la viande (Brevet international).
- Le Bihan-Duval E., Nadaf J., Berri C., Pitel F., Graulet B., Godet E., Leroux S. Y., Demeure O., Lagarrigue S., Duby C., Cogburn L. A., Beaumont C.M., Duclos M.J., 2011. PloS one, (6), e14825.
- Le Bihan-Duval E., Hennequet-Antier C., Berri C., Beauclercq S., Bourin M., Boulay M., Demeure O., Boitard S., 2017. In: 12. Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras.
- Llamas-Velasco M., Daudén E., Martínez-Peñas G., García-Diez A., 2012. Actas Dermo-Sifiliográficas, (103), 729-732.
- Lorenzi M., Mudalal S., Cavani C., Petracci M., 2014. J. Appl. Poult. Res., (23), 754-758.
- Mazzoni M., Petracci M., Meluzzi A., Cavani C., Clavanzani P., Sirri F., 2015. Poult. Sci., (94), 123-130.
- Mutryn M.F., Brannick E.M., Fu W., Lee W.R., Abasht B., 2015. BMC Genomics, (16), 1.
- Petracci M., Mudalal S., Bonfiglio A., Cavani C., 2013. Poult. Sci., (92), 1670-1675.
- Rajab A., Straub V., McCann L.J., Seelow D., Varon R., Barresi R., Schulze A., 2010. PLoS Genet., (6), e1000874.
- Russo E., Drigo M., Longoni C., Pezzotti R., Fasoli P., Recordati C., 2015. Poult. Sci., (94), 1843-1848.

- Sibut V., Hennequet-Antier C., Le Bihan-Duval E., Marthey S., Duclos M. J., Berri C., 2011. BMC Genomics, (12), 112.
- Sibut V., Le Bihan-Duval E., Tesseraud S., Godet E., Bordeau T., Cailleau-Audouin E., Chartrin P., Duclos M. J., Berri C., 2008. J. Anim. Sci. (86), 2888–2896.
- Sihvo H.-K., Immonen K., Puolanne E., 2013. Vet. Pathol., (51), 619-623.
- Soglia F., Mudalal S., Babini E., Di Nunzio M., Mazzoni M., Sirri F., Cavani C., Petracci M., 2016. Poult. Sci., (95), 651–659.
- Velleman S.G., Clark D.L., 2015. Avian Dis., (59), 410-418.
- Volonte D., Liu Y., Galbiati F., 2005. FASEB J., (19), 237-239.
- Zambonelli P., Zappaterra M., Soglia F., Petracci M., Sirri F., Cavani C., Davoli R., 2016. Poult. Sci., (95), 2771-2785.

CARACTERISATION PHENOTYPIQUE ET METABOLIQUE PRECOCE DE POUSSINS ISSUS D'UNE SELECTION DIVERGENTE SELECTIONNEE SUR LE PH ULTIME DE LA VIANDE

Métayer-Coustard Sonia¹, Royer David¹, Bordeaux Thierry¹, Cailleau-Audouin Estelle¹,
Godet Estelle¹, Praud Christophe¹, Delaveau Joël², Rat Christophe², Raynaud Emilie¹,
Le Bihan-Duval Elisabeth¹, Berri Cécile¹

¹ INRA, UR83 Recherches Avicoles - 37380 - Nouzilly

² INRA, UE1295 Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours – 37380 - Nouzilly
sonia.metayer-coustard@inra.fr

RÉSUMÉ

Chez le poulet, le pH ultime (pHu) de la viande est en grande partie déterminé par la teneur en glycogène du muscle à l'abattage. Une sélection divergente sur le pHu du filet a permis la création des lignées pHu+ et pHu-, qui représentent un modèle unique pour étudier le contrôle génétique et physiologique des réserves énergétiques et de la qualité de la viande. Plusieurs caractéristiques ont été mesurées dans les deux lignées à l'éclosion puis à 5 jours d'âge: le poids vif, les rendements en muscles, le glycogène musculaire et hépatique et plusieurs paramètres plasmatiques. A l'éclosion, les lignées pHu+ et pHu- présentent des poids vifs et des rendements musculaires équivalents. Toutefois, la lignée pHu- présente une glycémie supérieure à celle de la lignée pHu+, différence qui va persister jusqu'à l'âge d'abattage. Par ailleurs, les cultures primaires des myoblastes issues des deux lignées révèlent des différences de réponse à l'insuline. Après 5 jours, les lignées pHu+ et pHu- sont déjà divergentes en terme de glycogène (et de pHu) et de rendement en muscle, pour un poids vif similaire. Les différences entre lignées observées à l'éclosion et à 5 jours ont pu être associées à des régulations au niveau des voies de signalisation impliquées dans la synthèse protéique et le turn-over du glycogène musculaire. En conclusion, les poussins pHu+ et pHu- présentent dès l'éclosion des capacités de réponses différentes aux nutriments et aux hormones cohérentes avec le fait qu'après seulement 5 jours d'alimentation, des différences significatives de rendement et de teneur en glycogène musculaire existent entre les deux lignées.

ABSTRACT

Early growth and metabolic characterizations of two chicken lines divergently selected on their breast meat ultimate pH

In chicken, the ultimate pH (pHu) of meat is largely determined by the muscle glycogen content at slaughter age. A divergent selection on the *Pectoralis major* pHu allowed the creation of the pHu+ and pHu- lines, which represent a unique model for studying the genetic and physiological control of energy reserves and the meat quality. Several characteristics have been measured in the two lines at hatch then at 5 days of age: animal weight, muscle yields, muscular and hepatic glycogen content and several plasma parameters. At hatch, the pHu+ and pHu- lines present equivalent body weights and muscle yields. However, the pHu- line shows a higher glycemia than the pHu+ line, a difference that will persist until the slaughter age. In addition, primary myoblasts cultures from both lines show differences in insulin response. After 5 days, the pHu+ and pHu- lines are already divergent in terms of glycogen (and pHu) and muscle yield, for a similar body weight. Differences between both lines observed at hatch and at 5 days may have been associated with regulation of signaling pathways involved in protein synthesis and muscle glycogen turnover. In conclusion, pHu+ and pHu- chicks already have at hatch the ability to respond differently to nutrients and hormones consistent with the fact that after only 5 days of feeding, significant differences in yield and muscular glycogen contents exist between the two lines.

INTRODUCTION

Les lignées expérimentales pHu- et pHu+ représentent un modèle animal unique pour étudier les contrôles génétique et physiologique des caractéristiques de qualité des viandes associées aux variations de glycogène et de pH musculaire. L'objectif de l'étude est de déterminer si les différences phénotypiques des animaux caractérisés à l'âge d'abattage (Alnahhas et al., 2014, 2015) sont déjà effectives à l'éclosion (J0), avant tout apport nutritionnel, ou bien si elles se mettent en place au cours de l'élevage des animaux. Les lignées pHu+ et pHu- ont donc été caractérisées physiologiquement et métaboliquement à l'éclosion (J0) puis 5 jours post-éclosion (J5) pour évaluer l'impact de la nutrition sur le démarrage des animaux, qui constitue une phase critique de la croissance, en particulier musculaire, des poulets.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et matériel biologique

Soixante animaux (30 pHu+ et 30 pHu-) sont prélevés dès le jour de l'éclosion avant tout apport alimentaire (J0). Un second lot de 60 animaux est mis en élevage au sol dans des conditions de température et de lumière classiques. Ce deuxième groupe est nourri *ad libitum* jusqu'à 5 jours d'âge (J5).

Les poussins sont pesés puis mis à mort par décapitation à l'éclosion et après 8h de jeûne pour les animaux élevés jusqu'à J5. Du sang est prélevé sur tubes héparinés (135 USP U Lithium Heparin, VENOSAFE, Dominique Dutscher, Brumath, France), centrifugé (3000g, 10 min., 4°C), puis les surnageants correspondant sont aliquotés et congelés à -20°C jusqu'à la mesure des paramètres plasmatiques. Les muscles *Pectoralis major* sont prélevés immédiatement après la mort, pesés et congelés dans de l'azote liquide. Six muscles par lignée et par âge sont réservés pour les extractions de cellules myogéniques.

1.2. Dosages plasmatiques

Les mesures de glycémie, d'acide urique et de triglycérides sont réalisées sur plasma avec des kits commerciaux (Glucose RTUTM, Acide Urique Enzymatique PAP 150, Triglycérides Enzymatiques PAP 150, Biomérieux, Craponne, France). Les acides aminés libres (AAL) sont mesurés après extraction avec 10% (v/v) d'acide sulfo-salicylique en utilisant 2% de réactif ninhydrine (SIGMA-ALDRICH, Lyon, France). La L-serine a été utilisée comme standard (Dupont et al., 2008). Ces dosages enzymatiques ont été réalisés avec un spectrophotomètre TECAN infinite M200 selon les recommandations du fournisseur (Fossati et Prencipe, 1982; Artiss & Entwistle, 1981).

1.3. Mesure du pHu des muscles *Pectoralis major*

Les muscles sont broyés avec un Ultra-Turrax T25 dans une solution de KCl-iodoacétate (sodium iodoacetate 5mM, KCl 150mM) à raison de 1 g de tissu pour 9 ml de solution. Le pH de cette solution a ensuite été mesuré.

1.4. Voies de signalisation impliquées dans la synthèse protéique et le turn-over du glycogène musculaire

Trois cent milligrammes de *Pectoralis major* de poulet sont broyés avec l'Ultra-Turrax T25 à 4°C dans du tampon de lyse (Cell lysis buffer (10X), Cell Signaling Technology, Leiden, Pays-Bas) dans lequel sont ajoutées 4 pastilles de cocktail d'inhibiteurs de protéases pour 50 ml de tampon (Roche, Boulogne-Billancourt, France). Les homogénats sont laissés 30 min dans la glace avant d'être centrifugés pendant 30 min à 1000 g et 4°C. Le surnageant est prélevé et soumis à une seconde centrifugation à 30000 g pendant 45 min à 4°C. Le surnageant est de nouveau prélevé, aliquoté et congelé à -80°C.

Les protéines sont réduites dans un tampon de Laemmli (Tris HCl, SDS 4%, glycérol 20%, bleu de bromophénol 0,05%) contenant du β -mercaptoéthanol (5%) pour réduire les ponts disulfure, puis dénaturées par chauffage à 95°C pendant 5 min. Les protéines sont séparées sur gel d'acrylamide (10%) SDS PAGE. Les protéines du gel sont transférées par électrotransfert sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes sont ensuite saturées avec du TBS-Tween (0,1%) lait écrémé ou BSA (5%) pendant 1 h à température puis incubées la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (anti-MF20 ou vinculine) dilué 1/1000 dans un tampon TBS-Tween (0,1%). Les membranes sont enfin incubées avec l'anticorps secondaire correspondant couplé à un fluorophore pendant 1 h dans l'obscurité à température ambiante puis scannées avec un scanner Odyssey SYSTEM (LI-COR Inc. Biotechnology, Lincoln, NE, USA). L'intensité des bandes détectées est mesurée avec le logiciel Odyssey software release 1.2.

1.5. Culture de cellules musculaires *in vitro*

A J0 et à J5, 6 muscles *Pectoralis major* provenant d'animaux des lignées pHu+ et pHu- ont été prélevés pour extraire les cellules satellites musculaires et évaluer leurs caractéristiques en conditions de prolifération et différenciation mais aussi leurs réponses respectives à l'insuline.

Pour les expériences de stimulation des cellules, les cellules sontensemencées en plaques de 6 puits à raison de 30000 cellules/cm² dans du milieu de prolifération complet DMEM-HAMF12 SIGMA-ALDRICH, Lyon, France). Après 48 h de prolifération, le milieu de culture des cellules est remplacé par du milieu de différenciation DMEM-HAMF12 contenant les antibiotiques et l'antifongique

mais supplémenté avec 2% de sérum de cheval et 0,5% de sérum de veau fœtal. Après 48 h de différenciation, les cellules sont lavées une fois avec du PBS avant d'être sévrées dans un milieu DMEM-HAMF12 sans sérum pendant 4 h, puis sont utilisées pour les expériences de stimulation. Les cellules sont alors incubées dans du milieu DMEM-HAMF12 supplémenté ou pas avec de l'insuline (100 nM) pendant 0, 15 ou 45 min. La stimulation est stoppée par un lavage avec du PBS froid. Les cellules sont récupérées par grattage du puits avec 200 µl de tampon de lyse (identique à celui utilisé pour la solubilisation des protéines de la partie *in vivo*). Les extraits de cellules sont lysés pendant 30 min à 4°C puis les tubes sont centrifugés (12000 g, 30 min, 4°C) et les surnageants sont prélevés et conservés à -80°C jusqu'à leur analyse par électrophorèse SDS-PAGE et Western Blot comme décrit dans la partie *in vivo*.

1.5. Analyses statistiques

Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM. Les analyses statistiques sont effectuées par analyse de variance (ANOVA) avec le logiciel Statview Software Program version 5 (SAS Institute, Carry NC). Les différences entre traitements sont considérées comme significatives pour une probabilité $P < 5\%$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

À J0, le rendement musculaire ne présente pas de différence entre la lignée pHu+ et la lignée pHu- (Tableau 1). De même, le pHu mesuré sur le *Pectoralis major* n'est pas différent entre les deux lignées. Chez le poulet, le pHu est génétiquement corrélé négativement avec la teneur en glycogène du muscle (le Bihan-Duval et al., 2008). Or ce glycogène musculaire est le principal substrat énergétique dont dispose un poussin en fin d'incubation pour bêcher la coquille et sortir de l'œuf. La qualité des poussins a également été évaluée selon une grille de scores établie par Tona et al. (Tona et al., 2003). Les pHu+ présentaient plus de jaune résiduel non réabsorbé à l'éclosion. Les pHu+ n'étant pas plus petits que les poussins de l'autre lignée à l'éclosion, ce résultat peut laisser penser à une utilisation différente des nutriments dans l'œuf. Cette hypothèse est étayée par le fait qu'à J0, les différents paramètres plasmatiques mesurés sont très différents entre les poussins pHu+ et pHu- (Tableau 2): la glycémie et les triglycérides sont plus élevés chez les pHu- alors que l'acide urique est plus élevé chez les pHu+. L'acide urique étant le déchet du catabolisme des acides aminés, les pHu+ pourraient avoir un catabolisme protéique plus actif que les pHu- et activer des voies de la protéolyse pour dégrader les protéines musculaires et pallier ainsi à son déficit en glycogène musculaire. Une fonte musculaire dû à de la protéolyse a en effet déjà été observée chez des poussins en fin d'incubation (Guernec et al., 2003 ; Everaert et al., 2013).

Après seulement 5 jours d'élevage, les poussins pHu+ sont différents des pHu- avec un poids de muscle, un rendement musculaire et un pHu (*Pectoralis major*) supérieurs aux poussins pHu-. Ainsi, le poids de muscle pectoral des poussins pHu+ est 10% supérieur à celui des pHu- ($P = 0,017$), ce qui se traduit par un rendement supérieur de +9 % ($P = 0,001$). Alors que le pHu ne variait pas entre lignées à J0, l'écart de la valeur de pHu à J5 entre les pHu+ et pHu- est de 0,45 unité pH et est comparable à celui observé à l'âge d'abattage (Alnahhas et al., 2014). En revanche au niveau plasmatique, plus aucun effet lignée n'est observé sur la teneur en acide urique. En effet la teneur élevée observée à J0 chez les pHu+ diminue et rejoint celle des pHu-. Les teneurs en triglycérides diminuent également de manière significative entre J0 et J5 et ce dans les deux lignées. Cette diminution peut s'expliquer par la réorientation du métabolisme des poussins à l'éclosion. En effet, dans l'œuf les poussins disposent comme principale source de nutriments et d'énergie des composants du jaune d'œuf, riches en lipides, tandis qu'après l'éclosion les poussins vont utiliser majoritairement les glucides de l'alimentation qui leur sera distribuée. Seule la glycémie est encore affectée par la lignée à J5, avec une glycémie plus élevée chez les pHu-. Cette différence est encore observée à 6 semaines d'âge (Beauclercq et al., 2016). Pour comprendre ce résultat, il serait intéressant de vérifier si cette différence de glycémie est liée à des différences d'insulinémie et/ou de ses récepteurs entre les deux lignées. Ainsi, il serait intéressant de vérifier si les deux lignées expriment différemment au niveau de leurs muscles les transporteurs de glucose (GLUTs) car le transport de glucose constitue l'étape limitante d'entrée du glucose dans la cellule.

Des approches complémentaires réalisées *in vivo* et *in vitro* ont été développées pour caractériser le métabolisme les poussins issus des deux lignées. Dès J0, les poussins présentent des capacités différentes pour activer des voies de signalisation impliquées dans la synthèse protéique et le stockage de glucose sous forme de glycogène.

Ainsi les pHu+ présentent une meilleure capacité à activer les phosphorylations en cascade de la voie P70S6K/S6, qui est directement impliquée dans la protéosynthèse. Ce résultat est cohérent avec le fait que ce sont ces poussins qui présentent les poids et les rendements en muscles pectoraux les plus élevés.

Une autre voie, impliquant l'AMPK, senseur énergétique majeur de la cellule musculaire, est aussi moins activée chez les poussins pHu-. Ceci pourrait en partie expliquer la glycémie plus élevée chez ces animaux. En effet, lorsque l'AMPK est phosphorylée et active, elle stimule la translocation des transporteurs de glucose insulino-sensibles à la membrane des cellules favorisant ainsi l'entrée du glucose dans celles-ci (Russell et al., 1999). Son activation moindre chez les pHu- est donc cohérente avec un moindre transport de glucose vers l'intérieur

de la cellule et une glycémie plus élevée. Les résultats obtenus concernant une des cibles de l'AMPK, la glycogène synthase (ou GS) sont plus difficiles à expliquer. En effet, l'activation par phosphorylation de l'AMPK inhibe la GS et donc la synthèse de glycogène (Wojtaszewski et al., 2002). Or la GS est plus phosphorylée et donc plus inhibée chez les pHu-, qui pourtant présentent une activation de l'AMPK et des niveaux de glycogène musculaire supérieurs à ceux de la lignée pHu+. Sachant que la GS est sous le contrôle direct d'autres kinases comme la GSK3 (glycogène synthase kinase, Oreña et al., 2000), des études complémentaires seront nécessaires pour comprendre ce résultat.

Les approches *in vitro* nous ont permis de montrer qu'une fois en culture les cellules prélevées à J0 issues des muscles pHu- ont une capacité inférieure à se différencier que celles des pHu+ (Figure 1). Ainsi, les myotubes des pHu- sont beaucoup plus petits et fins que ceux des pHu+. Concernant les cellules prélevées à J5, les différences sont beaucoup plus ténues entre les deux lignées même si les myotubes sont un peu plus nombreux dans les cultures de cellules issues des pHu+. Afin d'objectiver cette différence, la myosine sarcomérique (marqueur de différenciation cellulaire) a été quantifiée sur les lysats de cellules avec un anticorps MF20 pour évaluer leur état de différenciation (Figure 2). La quantification de la myosine sarcomérique dans les lysats cellulaires montre une capacité supérieure des cellules prélevées

à J5 à se différencier que celles prélevées à J0 ($P < 0.0001$). Un effet lignée ($P = 0,03$) en faveur de pHu+ a également pu être mis en évidence à J0 et à J5.

Les résultats *in vitro* concernant la réponse à l'insuline restent préliminaires et à confirmer mais semblent néanmoins indiquer que l'insuline active différemment des voies de signalisation telle que la P70S6K/S6 dans les cellules issues des deux lignées.

CONCLUSION

Cette étude qui combine des approches *in vivo* et *in vitro* montre que les différences phénotypiques (poids, rendement, pHu et glycogène musculaires) des lignées pHu+ et pHu- observées à l'âge d'abattage ne sont pas détectables à l'éclosion mais sont établies dès 5 jours d'âge. Par contre, dès l'éclosion, les lignées pHu+ et pHu- présentent des différences physiologiques qui pourraient en partie expliquer leurs différences de réponse aux nutriments et aux hormones. Ces travaux vont se poursuivre en étudiant la réponse des animaux issus de ces deux lignées à des variations nutritionnelles précoces ou des conditions de démarrage dégradées et évaluer de manière plus large l'impact des réserves énergétiques musculaires du poussin sur sa robustesse et ses capacités de croissance ultérieure.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alnahhas N., Berri C., Boulay M., Baéza E., Jégo Y., Baumard Y., Chabault M., Le Bihan-Duval E., 2014. JAS., [92(9)], 3816-24
- Alnahhas N., Le Bihan-Duval E., Baéza E., Chabault M., Chartrin P., Bordeau T., Cailleau-Audouin E., Meteau K., Berri C., 2015. JAS., [93(9)], 4524-31
- Artiss J.D. & Entwistle W.M., 1981. Clin Chim Acta., (116), 301-309
- Beauclercq S., Nadal-Desbarats L., Hennequet-Antier C., Collin A., Tesseraud S., Bourin M., Le Bihan-Duval E., Berri C., 2016. J Proteome Res., [15(4)], 1168-78
- Dupont J., Tesseraud S., Derouet M., Collin A., Rideau N., Crochet S., Godet E., Cailleau-Audouin E., Métayer-Coustard S., Duclos M.J., Gespach C., Porter T.E., Cogburn L.A., Simon J., 2008. Journal of Endocrinology., (197), 531-542
- Everaert N., Métayer-Coustard S., Willemsen H., Han H., Song Z., Ansari Z., Decuypere E., Buyse J., Tesseraud S., 2013. Br J Nutr., [110(2)], 265-74
- Fossati P. & Prencipe L., 1982. Clin Chem., (28), 2077-2080
- Guerneq A., Berri C., Chevalier B., Wacrenier-Cere N., Le Bihan-Duval E., Duclos M.J., 2003. Growth Horm IGF Res., [13(1)], 8-18
- Le Bihan-Duval E., Debut M., Berri C.M., Sellier N., Santé-Lhoutellier V., Jégo Y., Beaumont C., 2008. BMC Genet., (9), 53.
- Oreña S.J., Torchia A.J., Garofalo R.S., 2000. J Biol Chem., [275(21)], 15765-72
- Russell R.R. 3rd, Bergeron R., Shulman G.I., Young L.H., 1999. Am J Physiol., [277(2 Pt 2)], H643-9
- Tona K., Bamelis F., De Ketelaere B., Bruggeman V., Moraes V.M.B., Buyse J., Onagbesan O., Decuypere E., 2003. Poult. Sci., (82), 736-741
- Wojtaszewski J.F., Jørgensen S.B., Hellsten Y., Hardie D.G., Richter E.A. 2002. Diabetes., [51(2)], 284-92

Tableau 1. Poids vif, poids et rendement en muscle *Pectoralis major* des poussins à J0 et J5

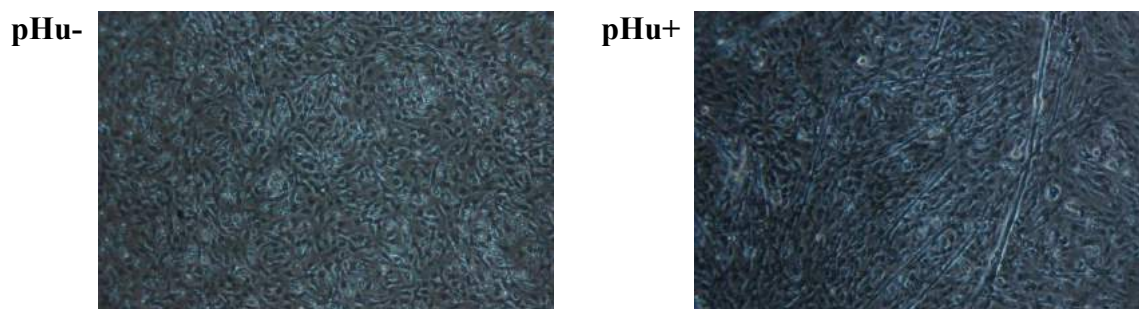
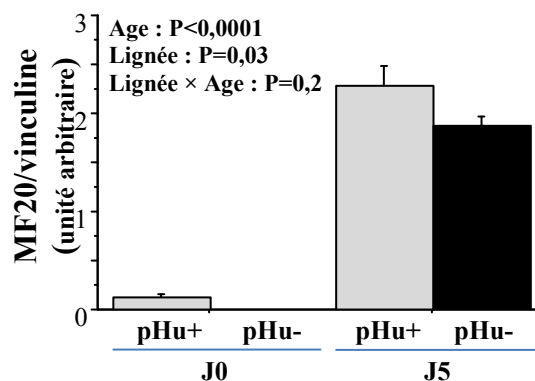
Jour	J0		J5		Effet lignée	
	pHu+	pHu-	pHu+	pHu-	J0	J5
Poids vif (g)	42,45 ± 0,46	40,84 ± 0,40	98,96 ± 1,40	96,0 ± 1,97	*	NS
Poids <i>P. major</i> (g)	0,52 ± 0,01	0,48 ± 0,01	4,37 ± 0,09	3,92 ± 0,13	NS	*
Rdt ^s <i>P. major</i> (%)	1,21 ± 0,02	1,27 ± 0,02	4,43 ± 0,06	4,06 ± 0,07	NS	***

^sRdt : rendement = (poids du tissu × 100)/poids de l'animal ; NS : non significatif ; *P < 0,05 ; ***P < 0,001

Tableau 2. Concentrations plasmatiques en glucose, acide urique, triglycérides et acides aminés libres

Age	Lignée	Glycémie (g/L)	Acide Urique (μmoles/L)	Triglycérides (mmoles/L)	Acides Aminés Libres
J0	pHu+	2,96 ± 0,02	650,90 ^a ± 40,86	0,331 ± 0,014	0,513 ± 0,025
	pHu-	3,08 ± 0,02	414,77 ^b ± 24,66	0,441 ± 0,017	0,478 ± 0,019
J5	pHu+	3,01 ± 0,03	412,29 ^b ± 25,92	0,214 ± 0,009	0,492 ± 0,019
	pHu-	3,04 ± 0,04	447,14 ^b ± 20,06	0,236 ± 0,013	0,545 ± 0,030
Effet Lignée		*	***	**	NS
Effet Age		NS	***	****	NS
Lignée X Age		NS	****	NS	NS

NS : non significatif ; *P < 0,05 ; **P < 0,01 ; ***P < 0,001 ; ****P < 0,0001

Figure 1. Culture de cellules pHu+ et pHu- issues de poussins à l'éclosion après 2 jours de différenciation. Le grossissement utilisé est ×20.**Figure 2.** Quantification par Western Blot de la myosine sarcomérique (MF20), marqueur de différenciation cellulaire, dans les cultures de cellules J0 et J5. Les valeurs sont normalisées avec la vinculine.

DES OUTILS SCIENTIFIQUES POUR CARACTERISER LES RETRAITS DES CARCASSES DE VOLAILLES A L'ABATTOIR ET LEURS FACTEURS DE VARIATION

Salines Morgane^{1,2}, Allain Virginie¹, Roul Hélène¹, Le Bouquin Sophie¹, Magras Catherine²

¹ *Anses Laboratoire de Ploufragan, BP 53, 22440 Ploufragan, France*

² *UMR 1014 SECALIM, INRA, Oniris, CP40706, 44307 Nantes, France*

sophie.lebouquin-leneveu@anses.fr

RÉSUMÉ

L'analyse de données d'inspection post mortem des carcasses apporte un intérêt pour appréhender la situation sanitaire de la production (sécurité des viandes, santé et bien-être animal), suivre les principaux facteurs de variation et identifier des risques sanitaires émergents, des impacts techniques ou structurels. Néanmoins, les rares études à ce sujet sont difficilement comparables : variabilité des échantillons, de la méthode de calcul des retraits, de la dénomination des motifs, de la conduite tenue, des facteurs de variation contradictoires. Une méthode harmonisée a été mise en place pour enregistrer les données de retrait, sur une année dans 8 abattoirs agréés représentatifs des différents types de production et tonnages. Les taux des retraits totaux et partiels, la prévalence des motifs des retraits par espèce ont été calculés. Les facteurs de variation des taux et des motifs ont été étudiés (analyse univariée puis bi-variée, modèle de quasi-poisson). Sur un total de 18 000 lots, comprenant les espèces poulet, dinde, canard maigre et pintade, les taux moyens des retraits totaux sont respectivement de 1,04 %, 1,85 %, 1,23 % et 1,20 %. Les facteurs de variation identifiés sont : le sexe, la saison et l'abattoir, ce dernier semblant masquer les effets de la taille du lot et du type de production. Le premier motif des retraits rapporté varie selon les espèces, les plus fréquents étant la cachexie, la congestion généralisée et les anomalies de conformation. Une base de données similaire au niveau national s'avèrerait utile tant pour les scientifiques que pour les professionnels comme outil d'évaluation des impacts sanitaires, techniques et structurels sur la qualité et la sécurité des carcasses, la santé et le bien-être des animaux.

ABSTRACT

Scientific tools to characterize poultry carcass condemnation at slaughterhouse and its variations

The analysis of post mortem inspection data is relevant to investigate the sanitary situation of poultry production (meat safety, animal health and welfare), to monitor the main factors influencing variation and to identify emerging risks for public health, technical or structural impacts. However, studies on this topic are rare and barely comparable: variability in the epidemiological samples, in the methods to count condemnations, in the lesions' naming, in the action to be led, contradictory factors influencing variation. A harmonized methodology was developed to register condemnation data and was implemented during one year in 8 EU-licensed slaughterhouses that were representative from the different French types of production and volumes. Total and partial condemnation rates and prevalence of reasons for condemnation were calculated for each species. Factors influencing variation of rates of and reasons for condemnation were studied (uni- and bivariate analysis, ANOVA). For a total of 18,000 flocks, including broilers, turkeys, meat ducks and guinea fowl, the mean condemnation rates were 1.04%, 1.85%, 1.23% and 1.20% respectively. Several factors influencing variation of the condemnation rate were identified: animal gender, season and slaughterhouse, which may hide the effects of the flock size and the type of production. Reasons for condemnation differed with species, the most frequent ones being cachexia, generalized congestion and conformation abnormalities. A similar nationwide database may be useful both for scientists and professionals as a scientific tool to assess health, technical and structural impacts on the quality and safety of carcasses and on animal health and welfare.

INTRODUCTION

Selon la réglementation européenne (Anonyme, 2004), l'inspection sanitaire post mortem (IPM) permet, sur la base de critères macroscopiques, de détecter et de retirer de la chaîne alimentaire toute carcasse impropre à la consommation humaine, soit pour des défauts de qualité, soit pour des raisons de sécurité sanitaire des aliments. Plus récemment, le législateur a donné de nouveaux objectifs à cette IPM, notamment l'analyse de la fréquence de lésions potentiellement indicatrices de conditions de production défavorables au bien-être animal. A l'issue de l'abattage d'un lot, les résultats de cette IPM doivent être retournés à l'éleveur pour lui permettre d'améliorer la qualité de sa production future (Information sur la Chaîne Alimentaire ascendante). Outre l'intérêt économique direct pour un éleveur de connaître les résultats de l'IPM de son lot, une analyse plus globale, à l'échelle d'une espèce de volailles, d'indicateurs de réalisation de cette IPM présente un intérêt pour appréhender la situation sanitaire de la production (qualité et sécurité des viandes, santé et bien-être animal), pour suivre les principaux facteurs de variation et identifier des risques sanitaires émergents. Néanmoins, au cours des trente dernières années, les études publiées à ce sujet sont difficilement comparables : variabilité des échantillons épidémiologiques (majoritairement des échantillons de convenance, de la méthode de calcul des retraits (nombre de carcasses retirées en totalité ou poids de viande retirée, calcul à l'échelle du lot d'animaux ou de l'abattoir), de la dénomination des motifs, de la conduite tenue, des facteurs de variation contradictoires. De plus, la majorité de ces études s'intéresse aux poulets de chair et peu concernent les autres espèces de volailles. Notre travail a visé à enregistrer les taux et les motifs de retrait des carcasses de quatre espèces de volailles selon une méthode harmonisée mise en place à grande échelle.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Collecte des données

Huit abattoirs français volontaires possédant un agrément européen, dont la répartition en termes de tonnage est représentative de celles des abattoirs français, ont été intégrés dans cette étude. De septembre 2012 à septembre 2013, ces abattoirs ont mis en œuvre une méthode harmonisée de réalisation et d'enregistrement des résultats de l'IPM, sur tous les lots de poulets de chair, pintades de chair, dindes de chair, et canards maigres abattus.

1.2. Harmonisation de la méthodologie

Les opérateurs de contrôle ont été préalablement formés à détecter les lésions grâce à des référentiels

nationaux harmonisant les critères et les motifs de retrait des carcasses pour chaque espèce de volailles (De Turckheim et al., 2013, disponible : <http://www.infoma.agriculture.gouv.fr/Referentiel-des-lesions-et-motifs>). Pour chacun des lots, ils ont enregistré dans une base de donnée Excel identique pour tous les abattoirs de l'étude, plusieurs données : nombre ou poids des retraits ; jusqu'à 3 motifs majeurs choisis dans une liste pré-établie, spécifique à chaque espèce et basée sur les référentiels nationaux de lésions, qui ont été hiérarchisés par ordre d'importance sur le lot ; le type de production ; la taille du lot ; le poids et le sexe des animaux.

1.3. Analyses statistiques

Description des lots. Les lots ont été décrits par leur taille (médiane, moyenne et dispersion), le sexe et le poids des animaux à l'abattage (moyenne et dispersion). Le calcul de la médiane de la taille du lot a servi à créer une variable discrète de taille du lot pour différencier les petits des grands lots.

Taux des retraits et facteurs de variation. Le taux total des retraits a été calculé comme le pourcentage de carcasses retirées au sein de chaque lot, en divisant le nombre de carcasses retirées dans un lot par le nombre total d'oiseaux abattus dans ce lot. Le taux total des retraits tient compte à la fois du taux des retraits totaux (TRT, carcasses retirées entièrement) et du taux des retraits partiels (TRP, parties de carcasses retirées). La conversion poids – nombre de carcasses a été réalisée à l'aide de facteurs multiplicatifs, propres à chaque abattoir, et dépendant de l'espèce et de la partie retirée (cuisse, aile, etc.).

Une analyse univariée a permis de mesurer l'association entre la variable à expliquer (le taux total des retraits) et chacune des variables potentiellement explicatives (abattoir, présence ou non d'un atelier de découpe, taille du lot, type de production, sexe, saison). Toutes les variables de ce tri croisé présentant une association significative au seuil $p < 0,05$ ont été retenues pour une analyse bivariée, visant à exclure du modèle des variables corrélées entre elles. La mesure de l'association des variables explicatives deux à deux a permis, lorsque des variables étaient très corrélées entre elles, d'en éliminer une des deux, après vérification que l'élimination d'une variable ne faisait pas varier les résultats du modèle de plus de 30 %. Les variables retenues à l'issue de ces différentes étapes ont été incluses dans un modèle multivarié (ANOVA).

Motifs des retraits. La fréquence des motifs a été calculée en divisant le nombre de lots pour lesquels un motif donné avait été attribué par le nombre total de lots abattus. A ce stade, nous ne nous sommes intéressés qu'au motif de retrait principal.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Un total de 6 731 lots de poulets de chair, 3 975 lots de dindes de chair, 2 381 lots de canards maigres et 431 lots de pintades ont été inclus. Leurs caractéristiques sont représentatives de la production nationale (Jez et al., 2009) (Tableau 1).

2.1. Taux des retraits et facteurs de variation

Le taux total moyen des retraits est respectivement de 1,04 % [1,01-1,07] (TRT = 0,89, TRP = 0,15), 1,85 % [1,79-1,91] (TRT = 1,27, TRP = 0,67), 1,23 % [1,13-1,32] (pas de retraits partiels), et 1,20 % [1,04-1,37] (pas de retraits partiels) dans les espèces poulet de chair, dinde de chair, canard maigre et pintade de chair. Le taux total des retraits calculé pour l'espèce poulet de chair est cohérent avec les données rapportées dans la littérature européenne (Fries et Kobe, 1993; Bremner, 1994; Kozak et al., 2002; Haslam et al., 2008). Ce taux des retraits totaux est stable par rapport à l'étude menée en France en 2005 (Lupo et al., 2008), avec un taux des retraits totaux de 0,87 %, contre 0,89 % dans notre étude. Il n'est pas possible de comparer l'évolution du taux total des retraits car les retraits partiels n'étaient pas comptabilisés dans cette étude. Concernant la dinde de chair, le taux des retraits totaux observé est inférieur au taux des retraits totaux observé en 2006 par Lupo et al. (Lupo et al., 2010), 1,27 % et 1,8 % respectivement. Mais l'étude de Lupo et al. (2010) portait sur des lots de dindes mâles standards, tandis que notre échantillon comprend des femelles et des lots en plein air. Aucune estimation des taux des retraits dans les filières canard et pintade n'est disponible dans la littérature. Il n'y a pas eu de retraits partiels dans les abattoirs étudiés pour les espèces canard maigre et pintade, ce qui peut expliquer un taux total des retraits élevé (avec des carcasses entièrement retirées alors qu'elles auraient pu faire l'objet d'un retrait partiel).

Les facteurs de variation du taux total des retraits diffèrent selon les espèces (Tableau 2). L'abattoir et la saison ont un impact sur le taux des retraits pour toutes les espèces, les retraits étant plus nombreux en été. Ceci suggère la présence d'événements pathologiques particuliers liés à la chaleur, soit en élevage, soit pendant le transport. Ceci peut également s'expliquer par une variabilité d'autres paramètres au cours de l'année, telle que la qualité des poussins, des matières premières, etc. Le type de production influence les retraits des carcasses de dindes, le taux étant plus élevé pour les lots standards que pour les lots plein air et de réforme, mais ce résultat est à prendre avec précaution au regard du faible effectif de lots plein air. Pour les poulets, dindes et canards maigres, le taux des retraits varie avec le sexe des animaux, les carcasses des mâles étant plus fréquemment retirées que celles des femelles. Pour les dindes, ceci peut s'expliquer par le fait que les mâles, élevés plus longtemps que les femelles, peuvent connaître davantage d'épisodes

pathologiques. De plus, les mâles, plus lourds, sont davantage en contact avec la litière, avec un risque accru d'apparition de lésions cutanées. Les retraits des pintades dépendent de la taille du lot, le taux de retraits étant plus élevé pour les grands lots, ce qui peut s'expliquer par une densité d'animaux plus importante dans les bâtiments d'élevage.

2.3. Motifs des retraits

Les principaux motifs des retraits rapportés comme premier motif sont (Figure 1) :

Poulet de chair : cachexie (41,8 % des retraits), congestion généralisée (29,3 %), lésions cutanées non purulentes (14,2 %). La cachexie est davantage observée dans les lots plein air (72,1 %) que dans les lots standards (24,8 %), alors que la congestion généralisée est davantage relevée dans les lots standards (41,4 %) que dans les lots plein air (7,7 %). Les motifs des retraits observés sont similaires à ceux rapportés par Lupo et al. (2008).

Dinde de chair : congestion généralisée (36,8 %), cachexie (20,2 %), lésions cutanées non purulentes (17,7 %). Les lésions cutanées non purulentes concernant principalement les lots standards sont certainement le reflet de comportements de griffage plus fréquents. Lupo et al. (2010) rapportent comme motifs principaux cachexie, arthrites – polyarthrites et congestion mais les deux échantillons d'étude sont peu comparables (cf. supra).

Canard maigre : anomalies de conformation (58,6 %), cachexie (14,6 % uniquement en standards), accumulation liquidienne dans la cavité abdominale (14,6 % uniquement en standards). Presque la moitié des lots de canards plein air sont concernés par de la congestion généralisée (44,9 %).

Pintade de chair : cachexie (73,5 %).

Pour trois des espèces (poulet, canard, pintade) la cachexie apparaît comme l'un des deux motifs principaux de retrait. Or il peut être envisagé qu'il demeure encore une part de confusion de ce motif avec les « petites carcasses », notamment dans les lots plein air où la présentation de la carcasse a une plus grande importance commerciale. Par ailleurs, une analyse rétrospective des résultats des contrôles de la réalisation de IPM (selon la note de service DGA/SDSSA/N2008-8030 du 21 janvier 2009) dans 10 abattoirs avait montré que l'attribution des motifs congestion et cachexie était la plus grande source des erreurs par défaut signalées (Gelin, 2013). Il semble donc, malgré la mise en place des référentiels, que la bonne détermination des motifs de ces retraits doit encore être améliorée.

CONCLUSION

A notre connaissance, ce travail est la première étude utilisant une méthode harmonisée pour étudier conjointement les taux et les motifs des retraits des carcasses de volailles. L'analyse de ces indicateurs

montre un taux total moyen des retraits, quelle que soit l'espèce, compris entre 1 et 2%. Pour les espèces pour lesquelles des éléments de comparaison étaient disponibles dans la littérature, ce taux reste stable évoquant l'absence d'événement sanitaire majeur ou de variation de la prise en compte du bien-être animal au cours de la période d'étude. L'analyse des motifs des retraits rappelle l'importance de la formation des opérateurs de contrôle à la dénomination des lésions. Améliorer l'utilisation des référentiels nationaux de lésions reste donc une priorité. Si les taux de retrait peuvent être considérés comme bas pour toutes les espèces étudiées, les différences inter-espèces (taux et motifs) soulignent la nécessité de mener des études épidémiologiques par espèce. Nous suggérons de développer une base de données similaire au niveau national pour suivre l'évolution de la situation

sanitaire des filières dans le temps. Un tel outil de surveillance épidémiologique s'avèrerait utile tant pour les scientifiques que pour les professionnels de la filière (de l'élevage à l'abattoir) pour suivre la santé et le bien-être des animaux et garantir la sécurité et la qualité des viandes. A cet effet, nous avons communiqué aux abattoirs et aux services vétérinaires ayant participé à l'étude des fiches synthétisant, par espèce, les taux et les motifs de retrait ainsi que leurs facteurs de variation.

REMERCIEMENTS

Cette étude a bénéficié d'un financement du Ministère en charge de l'Agriculture. Les auteurs remercient les professionnels et établissements ayant participé à l'étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anonyme, 2004. Règlement (CE) No 854/2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine.
- Bremner A.S., 1994. Post mortem condemnation returns from poultry slaughterhouses in England and Wales. *Veterinary Record*, 135, 622-623.
- De Turckheim A., Le Bouquin S., Donguy M.P., Magras C., 2013. Conception d'un référentiel national de lésions motivant un retrait en abattoir - exemple des pintades de chair. 10^{èmes} Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, 420-423.
- Fries R., Kobe A., 1993. Ratification of broiler carcass condemnations in poultry meat inspection. *British Poultry Science*, 34, 105-109.
- Gelin G., 2013. Lésions des volailles tertiaires (faisan, perdrix, pigeon, caille) et du canard maigre : bases anatomo-pathologiques pour un référentiel national de retrait sur chaîne à l'abattoir. *Th. Med. Vet.*, 104, 121.
- Haslam S.M., Knowles T.G., Brown S.N., Wilkins L.J., Kestin S.C., Warriss P.D., Nicol C.J., 2008. Prevalence and factors associated with it, of birds dead on arrival at the slaughterhouse and other rejection conditions in broiler chickens. *British Poultry Science*, 49, 685-696.
- Jez C., Beaumont C., Magdelaine P., Paillard S., 2009. La filière avicole française à l'horizon 2025. Rapport du groupe de travail prospective avicole, INRA et ITAVI, 88 p.
- Kozak A., Vecerek V., Steinhäuserová I., Chloupek P., Pisteková V., 2002. Results of slaughterhouse carcass classification (suitable for human consumption, suitable for processing and condemned) in selected species of food animals. *Veterinarni Medicina-UZPI*, 47, 26-31.
- Lupo C., Chauvin C., Balaine L., Petetin I., Péraste J., Colin P., Le Bouquin S., 2008. Postmortem condemnations of processed broiler chickens in western France. *Veterinary Record*, 162, 709-713.
- Lupo C., Le Bouquin S., Allain V., Balaine L., Michel V., Petetin I., Colin P., Chauvin C. (2010) Risk and indicators of condemnation of male turkey broilers in western France, February-July 2006. *Prev Vet Med*, 94, 240-250.

Tableau 1 : Caractéristiques des lots analysés (nombre et taille du lot, poids de carcasse, proportion d'animaux par sexe, nombre de lots par saison) pour chacune des espèces étudiées
m : moyenne ; IC 95 = cet intervalle contient 95 % des valeurs observées, NA : donnée non disponible

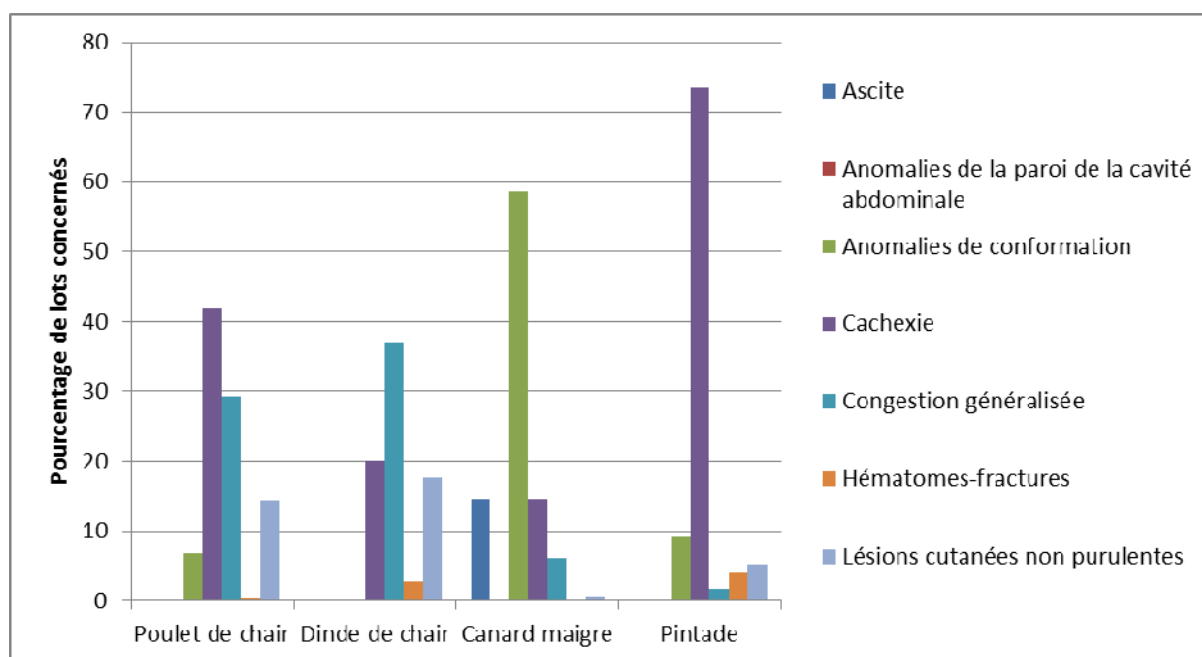
Espèce	Type de production	Nombre de lots	Taille du lot		Poids à l'abattage (kg)		Saison (nombre de lots)				Sexe (%)		
			m	IC 95	m	IC 95	Hiver	Printemps	Été	Automne	Mâles	Femelles	Non sexés
Poulet de chair	Standard	4 282	14 789	14157-15061	1,53	1,50-1,55	1583	1690	1860	1605	6,08	7,95	85,97
	Plein air	2 449	3 150	3102-3197	2,15	2,10-2,20					22,87	22,74	54,39
Dinde de chair	Standard	3 724	2 377	2341-2413	10,94	10,79-11,08	986	770	912	1307	56,15	43,13	0,72
	Plein air	16	2 212	1493-2931	2,91	2,63-					12,5	87,5	0

						3,18							
	Réforme (repro)	235	1 602	1451-1754	13,70	12,92-14,47					17,45	37,87	44,68
Canard maigre	Standard	2 265	4 025	3928-4122	2,43	2,39-2,46	544	541	666	630	58,37	41,63	0
	Plein air	116	772	546-999	3,32	3,24-3,41					93,97	6,03	0
Pintade de chair	Standard	123	5 984	5581-6387	1,72	1,68-1,76	91	95	93	152	16,26	6,50	77,24
	Plein air	308	1 325	1172-1478	1,61	1,58-1,64					51,62	0,97	47,41

Tableau 2 : Taux total moyen de retraits (exprimés en %) pour chacune des espèces de volailles, selon les modalités des variables explicatives

		Poulet de chair	Dinde de chair	Canard maigre	Pintade de chair
Type de production	Standard	1,36	1,90	1,23	0,54
	Plein air	0,49	0,13	1,10	1,47
	Réforme	-	1,10	-	-
Sexe	Mâles	0,60	2,05	1,59	1,46
	Femelles	0,25	1,66	0,68	0,66
	Non sexés	1,25	1,04	-	1,04
Taille du lot	Grand	1,79	1,83	1,31	0,74
	Petit	0,58	1,87	1,14	1,70
Saison	Automne	1,00	1,70	0,87	0,97
	Hiver	0,89	1,83	1,46	1,27
	Printemps	1,07	1,94	1,06	0,98
	Été	1,17	2,01	1,52	1,74

Figure 1 : Principaux motifs de retrait enregistré comme motif majoritaire, selon les espèces



IMPACT DES PRINCIPALES FUSARIOTOXINES EN MONO ET MULTI-CONTAMINATION SUR LES PERFORMANCES, LA SANTE ET LA QUALITE DES PRODUITS CHEZ LE POULET DE CHAIR

Metayer Jean Paul^a, Travel Angélique^b, Mika Amandine^b, Bailly Jean Denis^c, Cleva Didier^d, Boissieu Cyril^d, Le Guennec Jean^e, Froment Pascal^f, Albaric Olivier^g, Labrut Sophie^g, Le Bourhis Céleste^h, Lepivert Gurvanⁱ, Marengue Ericⁱ, Tardieu Didier^j, Guerre Philippe^j

^aARVALIS-Institut du Végétal, Station expérimentale, 91720 BOIGNEVILLE, France;

^bITAVI, Centre INRA Val de Loire, 37380 NOUZILLY, France;

^cUniversité de Toulouse, INP, ENVT, UMR Toxalim, F-31076 TOULOUSE, France;

^dChêne Vert Conseil, Z Bellevue II – 35220 CHATEAUBOURG, France;

^eFinalab, 4 bis rue Th. Botrel, BP 351, 22603 LOUDÉAC Cedex, France;

^fEquipe GCR INRA – PRC - UMR INRA - CNRS - UFR - 37380 NOUZILLY, France;

^gONIRIS, Site de la Chantrerie, BP 40706, 44307 NANTES Cédex 3, France;

^hPEAT, INRA Centre Val de Loire - 37380 NOUZILLY, France;

ⁱLABOCEA, 7 rue du Sabot, CS 30054, Zoopole, 22440 PLOUFRAGAN, France;

^jUniversité de Toulouse, INP, ENVT, UR Mycotoxicologie, F-31076 TOULOUSE, France.

travel@itavi.asso.fr

RÉSUMÉ

L'objectif était de comparer l'impact zootechnique et sanitaire du déoxynivalénol (DON), des fumonisines (FBs) et de la zéaralénone (ZEA) et d'évaluer leur niveau de persistance à l'état résiduel dans les produits comestibles, suite à une mono ou multi-contamination chez le poulet de chair lors d'une exposition chronique (J0-J35). Les mycotoxines ont été obtenues par culture de souches fongiques toxigènes et incorporées aux aliments expérimentaux pour obtenir un lot DON (5 mg/kg), un lot FBs (20 mg/kg), un lot ZEA (0,5 mg/kg) et un lot multi-contaminé (5 mg/kg DON + 20 mg/kg FBs+ 0,5 mg/kg ZEA) ; l'aliment du lot témoin ne contenait pas de mycotoxines. Ces aliments ont été individuellement distribués à 70 animaux répartis entre les 5 lots. L'exposition aux mycotoxines n'a pas significativement altéré les performances zootechniques des poulets. A J35, l'analyse de sang n'a révélé aucune différence significative entre lots sur la biochimie plasmatique de routine et différents marqueurs de stress oxydatif. Seule une élévation significative du rapport sphinganine/sphingosine chez les animaux exposés aux FBs par rapport aux animaux non exposés a été observée dans le plasma, sans différence entre poulets recevant l'aliment mono- ou multi-contaminé. La recherche de résidus a révélé des teneurs plus élevées en FB1 et ZEA (formes libres et conjuguées) dans le foie que dans les muscles, et l'absence d'effet interactif de la multi-contamination sur la persistance de ces composés.

ABSTRACT - Impact of fusariotoxins in mono and multi-contamination on performance, health and product quality in broiler

The aim of this study was to compare the zootechnical and health impact, and residues in edible tissues of deoxynivalenol (DON), fumonisins (FBs) and zearalenone (ZEN) in single and multi-contamination in broiler for a chronic exposure (0 to 35 days of age). The mycotoxins were obtained by culturing toxigenic fungal strains and incorporated into the experimental feeds to obtain a DON diet (5 mg / kg), a FBs diet (20 mg / kg), ZEN diet (0.5 mg / kg) and a multi-contaminated diet (5 mg/kg DON + 20 mg/kg FBs+ 0.5 mg/kg ZEN), whereas the control diet did not contain mycotoxins. These feeds were individually given to 70 animals allocated to the 5 groups. Exposure to mycotoxins did not significantly impact the zootechnical performance of broiler. At day 35, blood analysis revealed no significant difference among groups on routine plasma biochemistry and various markers of oxidative stress, except an elevation of sphinganine/sphingosine ratio (plasma and liver) for animals exposed to FBs compared to unexposed, without difference between single or multi-contaminated groups. The search for residues revealed higher levels of FB1 and ZEN (free and conjugated forms) in liver than in muscle, and no interactive effect of multi-contamination on the persistence of these contaminants.

INTRODUCTION

Les mycotoxines sont des métabolites toxiques produits par certaines espèces fongiques pouvant contaminer les céréales au champ ou au cours du stockage. De ce fait, les volailles peuvent être fréquemment exposées à ces toxines via leur alimentation. En France, les trichothécènes de type A et B (le déoxynivalénol (DON) étant le plus présent), les fumonisines B1 et B2 (FBs) et la zéaralénone (ZEA), toutes produites par le genre *Fusarium*, sont les principales mycotoxines présentes dans les aliments des volailles.

La réglementation européenne a fixé des maxima recommandés pour certaines mycotoxines dans les aliments pour animaux (Règlement CE 32/2002 modifié et Recommandation CE 576/2006). Ces niveaux ont été établis en considérant le pouvoir toxique de chaque mycotoxine, prise individuellement et tiennent compte des différences de sensibilité entre certaines espèces animales (porcs, ruminants, chevaux). Cependant, il n'existe pas pour les volailles, de différences de seuil en fonction de l'espèce, du stade physiologique ou du type de production. Bien que les volailles soient considérées comme appartenant aux espèces les plus résistantes à ces toxines, les effets d'une mono-contamination de l'aliment par une mycotoxine à forte dose sont bien connus (baisse des performances et altération de la santé - Afssa, 2009). Or, peu de travaux se sont intéressés aux conséquences d'une ingestion chronique et simultanée de plusieurs mycotoxines sur les volailles, cas représentatifs de contaminations naturelles.

Bien qu'un transfert de ces contaminants ou de leurs métabolites dans les produits animaux soit parfois démontré, aucun seuil réglementaire n'est fixé dans les produits d'origine animale pour ces contaminants. Il existe peu de données, mais la littérature existante suggère un niveau de transfert limité, aussi bien pour les FBs (Vudathala et al., 1994 ; Tardieu et al., 2008 et 2009), la ZEA (Mirocha et al., 1982 ; Maryamma et al., 1992 ; Danicke et al., 2002) et le DON (Prelusky et al., 1986, 1987 et 1989). 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 résidus dans les tissus animaux. Or, si les recommandations européennes sur les teneurs maximales en mycotoxines concernent les « aliments volaille » (J.O. UE, 2006), des différences importantes de sensibilité entre les différentes espèces et/ou types de production ont été mises en évidence, notamment pour les FBs (Tran et al., 2005 ; Tardieu et al., 2007) et on ignore si la multi-contamination modifie le transfert des toxines.

L'objectif du projet CAS DAR MYCOVOL était de caractériser les modalités de transfert des trois fusariotoxines les plus répandues en France (DON, FBs et ZEA) vers les produits avicoles (poulet, dinde et canard). Dans le présent article sont présentés les résultats spécifiques au poulet de chair, pour lequel nous avons comparé l'impact zootechnique et sanitaire du DON, des FBs et de la ZEA consommés individuellement ou en association, aux teneurs maximales recommandées dans les aliments pour volailles. Leurs niveaux de persistance dans les produits destinés au consommateur humain ont été caractérisés.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Exposition des poulets de chair

Les mycotoxines nécessaires à l'expérimentation ont été obtenues par culture de souches fongiques toxigènes tel que présenté dans l'article de Travel et al. (2017). Cinq aliments expérimentaux (base maïs – soja) ont été constitués pour obtenir un lot témoin, un lot DON (5 mg/kg), un lot FBs (20 mg/kg du total FB1+FB2), un lot ZEA (0,5 mg/kg) et un lot multi-contaminé (DON, FBs et ZEA respectivement à 5, 20 et 0,5 mg/kg).

Soixante-dix poulets de chair (Ross PM3 mâles) ont été élevés en cages individuelles de 0 à 35 jours d'âge. Ils ont reçu les 4 aliments expérimentaux contenant les mycotoxines et l'aliment témoin de 0 à 10 jours (protéines = 22 % et EM = 2880 kcal/kg), puis de 11 à 35 jours (protéines = 19,5 % et EM = 3050 kcal/kg).

1.2. Suivi, prélèvements et analyses

Les performances zootechniques ont été enregistrées de J0 à J10 et de J11 à J35, puis calculées de J0 à J35.

A J35, après 8h de jeûne, des prélèvements de sang ont été effectués comme décrit par Travel et al. (2017) en vue de la détermination des paramètres hématologiques, biochimiques et de marqueurs du stress oxydatif. Les animaux ont été mis à mort par élongation des cervicales puis exsanguination et autopsiés. Les principaux organes ont été pesés et lésions macroscopiques et microscopiques ont été relevées selon les modalités décrites par Travel et al. (2017). Le muscle pectoral droit (moitié) et le foie (totalité) ont été prélevés pour dosage des concentrations en sphinganine (Sa) et sphingosine (So) et la recherche de résidus de DON, FBs et ZEA (Travel et al., 2017). Plus de 1600 échantillons ont ainsi été générés pour les analyses.

2. RESULTATS

2.1. Performances zootechniques

Les résultats zootechniques (gain de poids moyen quotidien (GMQ), consommation d'aliment et indice de consommation (IC) obtenus sont

présentés Figure 1. Une différence significative ($P < 0,05$) entre lots a été observée sur la consommation d'aliment mais pas sur le gain moyen quotidien ($P = 0,06$). Cette différence n'a pas entraîné de modification significative de l'indice de consommation. Les résultats montrent que l'ingestion de DON, FBs ou ZEA seules, aux teneurs que nous avons définies et dans nos conditions d'élevage des animaux, n'ont pas significativement affecté les performances de croissance, ni l'IC des poulets. De plus, l'association des trois fusariotoxines aux teneurs maximales recommandées n'a pas significativement modifié les performances de croissance, ni l'efficacité alimentaire des poulets en comparaison du lot Témoin mais également des lots mono contaminés.

2.2. Autopsie et analyse histologique

Une différence significative ($P < 0,05$) entre lots n'a été observée que sur le poids relatif au poids vif (PR) des foies. Les foies des poulets exposés à la ZEA étaient plus lourds que les autres (Figure 2). Aucune différence significative n'a été observée sur le poids relatif des organes, pancréas, reins, rate, cœur, proventricule, duodénum, gésier, jéjunum, iléum et caecum, lors des mono ou multi contaminations. Néanmoins, une légère augmentation du poids du proventricule et gésier est constatée pour les lots DON et FBs ($P > 0,05$). Les observations des lésions macroscopiques réalisées au moment de l'autopsie ou microscopiques observées par histologie, n'ont mis en évidence aucune lésion spécifiquement corrélée à l'exposition à une ou plusieurs mycotoxines, quel que soit l'organe considéré.

2.3. Biochimie plasmatique, hématologie et marqueurs hépatiques

Une différence significative entre lots ($P < 0,05$) a été observée, sur les teneurs plasmatiques en acide urique (Figure 3), pouvant éventuellement refléter un léger dysfonctionnement rénal, notamment pour les poulets mono exposés à la ZEA. Aucun effet significatif des mono contaminations ou de la multi contamination, n'a été observé sur les autres marqueurs sanguins : protéines totales, cholestérol, activité des phosphatases alcalines totales (PAL) et de l'alanine aminotransférase (ALAT), lactate déshydrogénase (LDH) ni sur les marqueurs plasmatiques de stress oxydatif : malondialdéhyde (MDA), activité de la catalase (CAT), de la superoxyde dismutase (SOD), de la glutathion réductase et de la glutathion peroxydase et quantités de glutathion total et réduit. De même, aucun effet significatif des mono expositions n'a été observé sur les marqueurs hématologiques (érythrocytes, hémoglobine, leucocytes, hétérocytes, éosinophiles, basophiles, lymphocytes, monocytes) ; ce résultat est également observé pour le lot multi contaminé.

De façon similaire, l'ingestion individuelle ou simultanée de DON, FBs et ZEA, n'a modifié la réponse d'aucun marqueur hépatique de stress oxydatif (MDA, activité de la CAT, de la SOD, de la glutathion réductase et de la glutathion peroxydase et quantité de glutathion total et glutathion réduit).

Le niveau de sphingosine (So) hépatique était équivalent entre lots alors qu'une élévation significative du niveau de sphinganine (Sa) a conduit à une élévation significative du rapport Sa/So pour les poulets exposés aux FBs et ceux multicontaminés, sans différence d'augmentation significative entre ces deux lots (Figure 3).

2.4. Teneurs résiduelles en fusariotoxines dans les tissus

Les teneurs en DON dans le foie et le muscle se sont révélées inférieures à la limite de détection (LD = 0,2 µg/kg) quel que soit le groupe analysé. Les teneurs en FBs dans les foies et muscles d'animaux non exposés aux FBs étaient inférieures à la LD (LD FB1 = 3 µg/kg) alors que des teneurs quantifiables étaient retrouvées dans les lots FBs et multicontaminés sans différence significative entre ces deux lots (Tableau 1).

Les teneurs en ZEA dans les foies et muscles d'animaux non exposés à la ZEA étaient inférieures à la LD (LD ZEA = 0,1 µg/kg) alors que des teneurs quantifiables en ZEA et alpha-zéaralénol (LD α -ZEA = 0,1 µg/kg), libres et conjugués, étaient retrouvées dans les foies mais pas dans les muscles des lots ZEA et multicontaminés sans différence significative entre ces deux lots (Tableau 2). Les teneurs en zéaralénols et β -zéaralénone étaient inférieures à la LD dans les foies et muscles.

3. DISCUSSION ET CONCLUSION

Cet essai a révélé l'absence d'effet individuel du DON, des FBs et de la ZEA sur les performances et la santé des poulets aux doses respectives de 5, 20 et 0,5 mg/kg d'aliment. Ces résultats sont en accord avec les données bibliographiques pour cette espèce et confirment les maximas recommandés dans l'Union Européenne pour ces toxines dans l'alimentation des volailles (Bailly et al., 2015; Magnin et al., 2015).

Ce travail a montré l'absence d'effet additif, synergique et antagoniste sur les performances et la santé des poulets en croissance aux valeurs limites réglementaires pour le DON, les FBs et la ZEA, dans nos conditions standardisées d'élevage et d'exposition.

L'effet observé sur le métabolisme des sphingolipides dans les lots ingérant des FBs est en accord avec les données de Grenier et al. (2015) pour le poulet, et ceux obtenus par notre équipe pour la dinde et le canard (Travel et al., 2017 ;

Peillod et al., 2017). Ces résultats confirment la possible utilisation du rapport Sa/So en tant que biomarqueur spécifique et précoce d'exposition des volailles aux FBs, son élévation précédant l'apparition de signes toxiques dans toutes les espèces où il a été évalué (Travel et al., 2017 ; Shephard et al., 2007). La multi-contamination n'a pas modifié le rapport Sa/So, comparativement aux lots mono contaminés par des FBs.

L'absence de résidus de DON dans les foies et les muscles de poulets est en accord avec les données de la bibliographie, cette toxine étant principalement sulfo-conjuguée dans les espèces aviaires (Guerre, 2015). Pour les Fumonisines, les teneurs révélées dans notre étude sont voisines de celles observées au même niveau d'exposition chez la dinde (Travel et al., 2017 ; Tardieu et al., 2008). Les muscles se révèlent moins contaminés que les foies, ce qui va dans le sens des différents travaux réalisés à des niveaux supérieurs d'exposition (Guerre, 2015).

L'analyse des teneurs résiduelles en ZEA et ses métabolites confirme que cette toxine est principalement réduite en α -ZEA, dont les propriétés xéno-oestrogéniques sont supérieures à celles de la ZEA. Comme dans notre étude sur la dinde (Travel et al., 2017), ZEA et α -ZEA sont également retrouvés dans les tissus sous formes conjuguées, en accord avec les données de la littérature chez la volaille (Guerre, 2015, Kolf-Clauw et al., 2008). La signification toxicologique

pour l'Homme et l'animal, de ces formes conjuguées est débattue. Chez l'animal, les métabolites conjugués sont généralement considérés comme peu toxiques, mais leur hydrolyse après ingestion conduit à la libération des formes libres (Guerre, 2015).

Cette étude révèle pour la première fois, chez le poulet, que la multi contamination n'a pas eu d'impact sur les teneurs résiduelles en FBs et ZEA dans les muscles et les foies, ni sur la hiérarchie de contamination des tissus, comparativement à une mono exposition avec 20 mg /kg de FBs ou 0,5 mg ZEA/kg.

Ces résultats et ceux obtenus également sur la dinde (Travel et al., 2017) et le canard (Peillod et al., 2017) suggèrent que ces mycotoxines agissent indépendamment et qu'il serait inutile de tester les nombreuses combinaisons possibles mycotoxine (FBs, ZEA) x doses pour en évaluer les effets.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été conduit dans le cadre de l'UMT BIRD associant l'ITAVI et l'INRA sur des projets de recherche appliquée. Les partenaires du projet tiennent à remercier le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (CASDAR AAP 2012) pour son concours financier au projet MYCOVOL, ainsi que le RMT Quasaprove qui a apporté son soutien lors de la genèse et de la réalisation du projet.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Afssa, 2009. Rapport RCCP-Ra-Mycotoxines. pp308
- Bailly JD., Magnin M., Travel A., Guerre P., 2015. 11e JRA- JRFG, 25-26/03/2015, 462-475.
- Dänicke S., Ueberschär K.H., Halle I., Matthes S., Valenta H., Flachowsky G., 2002. Poult. Sc. 81(11), 1671-1680.
- Grenier B., Schwartz-Zimmermann H.E., Caha S., Moll W.D., Schatzmayr G. et Applegate T.J., 2015. Toxins, 7(4), 1253-1272.
- Guerre P., 2015. Toxins, 7(6), 2289-2305.
- Kolf-Clauw M., Ayouni F., Tardieu D., Guerre P., 2008. Food Chem. Tox., 46(5), 1467-1473.
- Magnin, M., Travel, A., Bailly, J. D., Guerre, P. 2015. 11e JRA- JRFG, 25-26/03/2015, 476-502.
- Maryamma K.I., Manomohan C.B., Nair M.G., Ismail P.K., Sreekumaran T., Rajan A., 1992. Ind. Journ. Anim. Sc., 62, 105-107.
- Mirocha C.J., Robisona T.S., Pawlosky R.J., Allen N.K., 1982. Tox. & Appl. Pharm., 66(1), 77-87.
- Peillod C., Laborde M., Travel A., Mika A., Bailly J.D., Cleva D., Boissieu C., Le Guennec J., Albaric O., Labrut S., Le Bourhis C., Lepivert G., Marengue E., Tardieu D., Guerre P., 2017. 12e JRA- JRFG, 5-6/04/2017, *in press*.
- Prelusky D.B., Hamilton R.M.G., Trenholm H.L., 1989. Poultry Science, 68 (6), 744-748.
- Prelusky DB, Hamilton R.M.G., Trenholm H.L., Miller J.D., 1986. Appl. Tox., 7, 635-645.
- Prelusky, D.B., Trenholm H.L., Hamilton R.M.G., Miller J.D., 1987. Journ. Agric. Food Chem., 35, 182-186.
- Shephard G.S., Westhuizen L., Sewram V., 2007. Food Addit. Contam., 24, 1196-1201.
- Tardieu D., Bailly J.D., Skiba F., Métayer J.P., Grosjean F., Guerre P., 2007. Poult. Sc., 86, 1887-1893.
- Tardieu D., Bailly JD., Benlashehr I., Auby A., Joulgar JY., Guerre P., 2009. Chem Biol Interact. 182(2-3):239-44.
- Tardieu D., Bailly JD., Skiba F., Grosjean F., Guerre P., 2008. Food Chem. Toxic., 46(9), 3213-3218.
- Tran S.T., Auvergne A., Benard G., Bailly Jd., Tardieu D., Babilé R., Guerre P., 2005. Poult. Sc., 84, 22-28.
- Travel A., Metayer J.P., Mika A., Bailly J.D., Cleva D., Boissieu C., Le Guennec J., Albaric O., Labrut S., Le Bourhis C., Lepivert G., Marengue E., Tardieu D., Guerre P., 2017. 12e JRA- JRFG, 5-6/04/2017, *in press*.
- Vudathala D.K., Prelusky D.B., Ayroud M., Trenholm H.L., Miller J.D., 1994. Nat Toxins. 2(2), 81-88.

Figure 1. Consommation d'aliment (g), gain de poids moyen quotidien (g/j) et indice de consommation des poulets de chair en fonction de l'aliment reçu

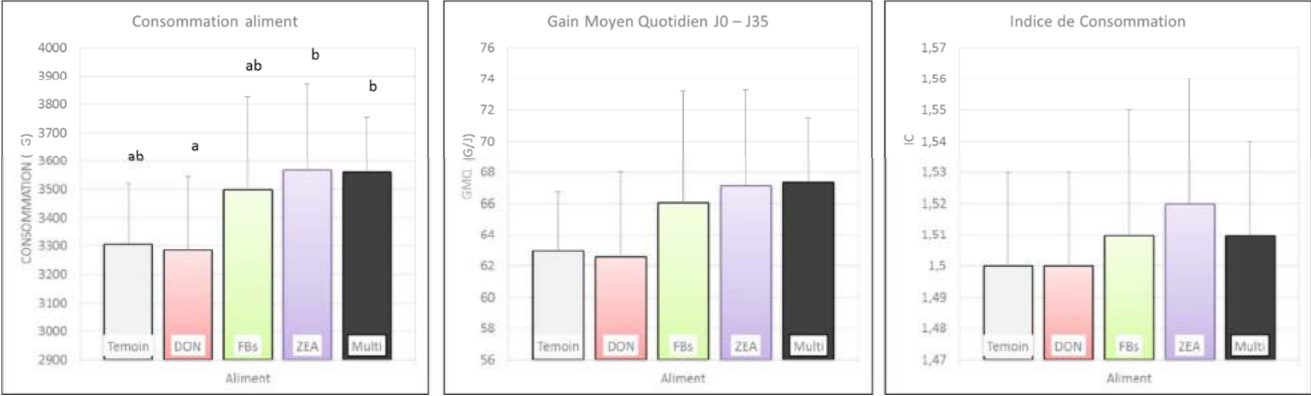


Figure 2. Poids relatif du foie et du proventricule (%) des poulets de chair en fonction de l'aliment reçu

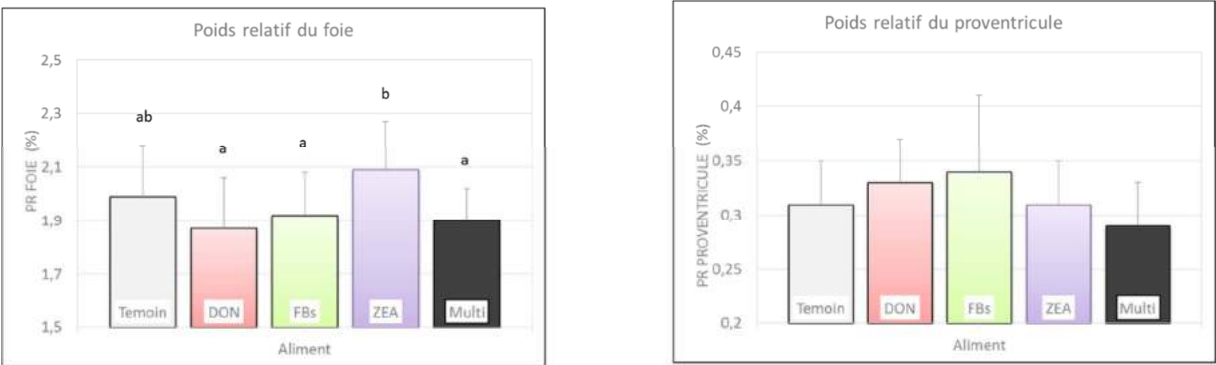


Figure 3. Concentration d'acide urique plasmatique (mg/L) et ratio sphinganine/ sphingosine hépatique des poulets de chair en fonction de l'aliment reçu

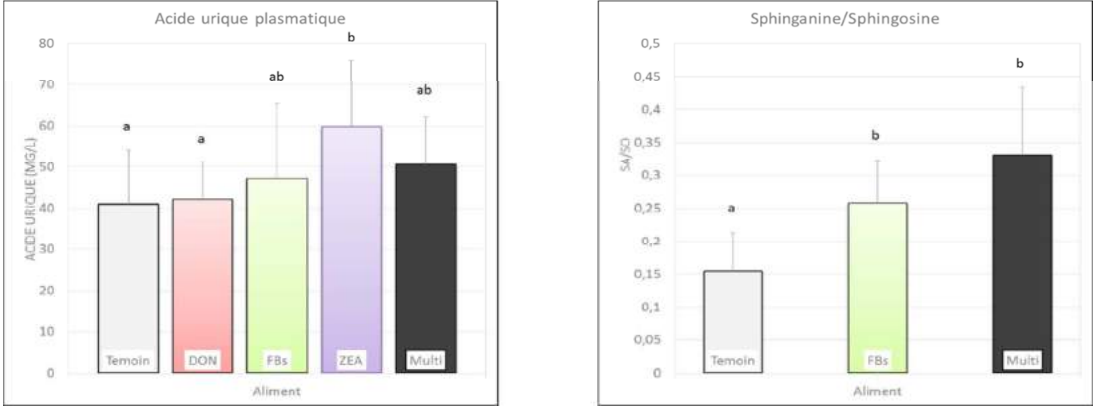


Tableau 1. Teneurs résiduelles en fumonisines (moyenne +/- écart-type, en µg FB1 /kg) dans le foie et le muscle de poulets exposés 35 j

Aliment/Matrice	Témoins	FBs	Multicontaminé
Foie	<1	50,6 +/- 14	44,7 +/- 14,2
Muscle	1,3 +/- 1,4	8,1 +/- 6,2	7,3 +/- 5,4

Tableau 2. Teneurs résiduelles en zéaralénone et α-zéaralénol (moyennes +/- écart-type, en µg/kg) dans le foie de poulets exposés 35 j

Aliment/Foie	Témoins	ZEA	Multicontaminé
ZEA libre	<0,2	0,12 +/- 0,06	0,14 +/- 0,08
α-ZEA libre	<0,2	0,33 +/- 0,24	0,86 +/- 0,53
ZEA conjuguée	<0,2	0,14 +/- 0,09	0,21 +/- 0,18
α-ZEA conjugué	<0,2	1,24 +/- 0,74	1,7 +/- 0,97

ETAT DES LIEUX DE LA CONTAMINATION DES POULETS DE CHAIR PAR DES POLLUANTS ORGANIQUES PERSISTANTS, LES RETARDATEURS DE FLAMME BROMES

Adeline Huneau-Salaün¹, Angélique Travel², Ronan Cariou³, Loïc Balaine¹, Christophe Souchet², Rodolphe Thomas¹, Anaïs Vénisseau³, Jenna Coton¹, Philippe Marchand³, Gaud Dervilly-Pinel³, Bruno Le Bizec³, Catherine Jondreville⁴, Sophie Le Bouquin¹

¹ANSES - Laboratoire de Ploufragan-Plouzané - BP 53, 22440 Ploufragan, France ;

²ITAVI, Unité de Recherches Avicoles, Centre INRA de Tours, 37380 Nouzilly, France;

³LUNAM Université, Oniris, Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), USC INRA 1329, 44307 Nantes, France;

⁴INRA, Université de Lorraine, USC340, URAFPA, Unité de Recherches Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

adeline.huneau@anses.fr

RÉSUMÉ

Les Retardateurs de Flamme Bromés (RFB) sont des substances chimiques ignifuges incorporées notamment dans les matériaux isolants de construction. Ces produits lipophiles sont susceptibles de s'accumuler dans les tissus animaux et d'être ingérés par les consommateurs. Bien que leur concentration dans les aliments ne soit pas réglementée, ces substances sont des polluants organiques persistants suspectés d'être des perturbateurs endocriniens. L'un des objectifs du projet Braviporc est de quantifier certains RFB dans les produits avicoles et porcins et d'en identifier les sources potentielles dans l'environnement d'élevage. Une étude a donc été menée en 2014 et 2015 dans 57 élevages français de poulets de chair (27 conventionnels, 22 biologiques et 8 plein-air) pour déterminer la concentration dans le muscle de deux familles de RFB (l'hexabromocyclododécane, HBCD et les polybromodiphényléthers, PBDE). Pour chaque troupeau, durant la dernière semaine d'élevage, 5 échantillons de muscle pectoral ont été prélevés et poolés. Les concentrations de 8 congénères de PBDE et 3 stéréoisomères d'HBCD dans la matière grasse du muscle ont été déterminées respectivement par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (GC-HRMS) et par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Les résultats montrent que 54% des échantillons de muscle ne présentent aucune trace d'HBCD et 28% aucune trace de PBDE. Une fréquence significativement plus élevée d'isolement de RFB est notée dans les échantillons provenant d'élevages alternatifs que de conventionnels. Il est difficile de déterminer si cet écart est lié à l'âge des animaux plus élevé en système alternatif, à une différence de génétique ou à l'accès à un parcours extérieur. La conception des poulaillers est aussi différente entre conventionnels et alternatifs mais pas pour les matériaux d'isolation qui sont les plus susceptibles de contenir des RFB. Lorsque des RFB sont détectés, ils le sont à des concentrations faibles, quel que soit le système d'élevage, et comparables aux résultats observés depuis 2011 dans les plans de surveillance français. Ce travail vient confirmer que la viande de poulet est un faible contributeur à l'exposition humaine aux RFB via l'alimentation en France.

ABSTRACT : Brominated Flame Retardants in broilers

Brominated Flame Retardants (BFR) are primarily used as additive flame retardants in insulating materials. These lipophilic compounds may bioaccumulate in animal tissues leading to human exposition via food consumption. Although their concentration in food is not yet regulated, these persistent organic pollutants are suspected to act as endocrine disruptors. The present study aimed at quantifying two families of RFB (hexabromocyclododecane, HBCDD and polybrominated diphenyl ethers, PBDE) in chicken meat and to identify potential sources of RFB in broilers' environment. In 2014 and 2015, an epidemiological study was carried out in 57 broiler farms (27 conventional, 22 organic and 8 free-range farms) in France. During the last week of rearing, 5 samples of pectoral muscle were pooled in a single sample. Eight PBDE-congeners and 3 HBCDD-stereoisomers were quantified in muscle fat using Gas Chromatography – High Resolution Mass Spectrometry (GC-HRMS) and High-Performance Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS) respectively. Respectively 54% and 28% of the muscle samples did not show a trace of HBCD and PBDE. BFR were more frequently detected in samples from free-range and organic farms than from conventional ones. The difference observed between alternative and conventional systems may be linked to the older age of free-range broilers, to a difference in the genetic strains used in the both types of farms or to the access at an open-air range. Poultry house construction was also different in alternative and conventional systems but not for insulating materials that are the most likely to contain BFR. When BFR were detected the concentration was low whatever the type of farm considered and similar as those reported in the French surveillance program. This work confirms that chicken meat is a low contributor to the food-born exposition of human to BFR in France.

INTRODUCTION

Les retardateurs de flamme bromés (RFB) sont des substances chimiques incorporées dans certains matériaux de construction pour leur conférer une propriété ignifuge. Certains sont listés parmi les Polluants Organiques Persistants (POP) (Convention de Stockholm, 2014) en raison de leur persistance dans l'environnement, leur bioaccumulation dans les tissus lipidiques des organismes vivants et leur toxicité pour l'homme et la faune. A faible dose, ces composés sont considérés comme des neurotoxiques et des perturbateurs endocriniens. La consommation d'aliments contaminés serait la principale voie d'exposition humaine à ces produits, avec l'ingestion de poussières dans l'environnement intérieur (EFSA 2011a, b). De ce fait, la présence de plusieurs RFB (hexabromocyclododécane, HBCD ; polybromodiphényléthers PBDE et polybromobiphényles, PBB) est recherchée dans les produits animaux depuis 2008 dans le cadre de plans de surveillance européens. Les plans français en 2008 et 2009 ont révélé l'existence, très rare, d'œufs et de viandes de volailles contaminés par les HBCD à des niveaux plus de 1000 fois supérieurs au bruit de fond habituel. Bien qu'il n'y ait actuellement aucune valeur maximale réglementaire pour les RFB dans les aliments, l'existence de produits avec d'assez fortes concentrations pose un problème réel pour la sécurité sanitaire des consommateurs (Anses, 2011 et 2012). Le projet BrAviPorc a été développé afin de mieux comprendre les modalités de transfert des RFB de l'environnement vers les produits animaux pour prévenir les contaminations. Dans ce cadre, une étude a été menée en 2014 et 2015 en élevages de poules, de poulets de chair et de porcs afin de mesurer les concentrations en HBCD et PBDE dans les œufs et les muscles. Cet article présente les résultats obtenus pour les troupeaux de poulets de chair.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Elevages enquêtés

L'étude a porté sur 57 élevages de poulets de chair (27 conventionnels, 22 biologiques et 8 plein-air) situés dans toute la France. L'échantillon d'élevages a été stratifié sur le mode de production (50% conventionnel, 50% alternatif). Au niveau géographique, cinq zones de production ont été définies (Bretagne, Pays de la Loire, Rhône-Alpes, Aquitaine et le reste de la France) puis le nombre d'élevages à enquêter par zone a été déterminé proportionnellement à la part de chaque région dans les productions de poulet conventionnel et alternatif en France (Figure 1). Les élevages ont été

sélectionnés aléatoirement parmi les adhérents des différents groupements de production ayant accepté de participer à ce projet. Les élevages ont été enquêtés durant la dernière semaine d'élevage, à raison d'un lot par exploitation.

1.2. Prélèvements et collecte des informations

Chaque élevage a été visité par un enquêteur de l'ITAVI ou de l'Anses entre septembre 2014 et avril 2015. Un questionnaire a été complété avec l'éleveur sur le poulailler (âge, type de matériaux, état et entretien) et la conduite d'élevage des animaux. Cinq poulets ont été euthanasiés pour prélever un échantillon d'un moins 25 g de muscle pectoral et un échantillon d'au moins 10 g de graisse viscérale. De plus, des échantillons d'aliment et de poussières (2 chiffonnettes sur les parois du poulailler) ont été récoltés. Les cinq échantillons de muscle ont été rassemblés en un seul échantillon conservé au froid négatif avant analyse. Les échantillons de graisse, d'aliment et de poussières ont été stockés pour être analysés en seconde intention en cas de détection d'une concentration élevée de RFB dans les muscles correspondants.

1.3. Méthodes d'analyse

Conformément aux recommandations de l'Anses (2012), deux familles de RFB ont été recherchées dans la matière grasse (MG) du muscle : les PBDE et l'HBCD. Après lyophilisation, la matière grasse contenant les composés d'intérêt a été extraite par un mélange de solvants organiques (toluène/acétone 70:30, v/v) sous pression (100 bars) et à chaud (120 °C). L'extrait a ensuite été purifié suivant une succession de colonnes d'extraction sur phase solide contenant de la silice acide et du Florisil®, aboutissant à la collecte de deux fractions (PBDE et HBCD). Une purification supplémentaire a eu lieu, sur colonne de charbon pour la fraction PBDE ou par partage liquide/liquide entre hexane et soude 1 N pour la fraction HBCD. Les concentrations de 8 congénères de PBDE (BDE-28, 47, 99, 100, 153, 154, 183, 209) et de 3 stéréoisomères d'HBCD (α , β et γ) ont été déterminées respectivement par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (GC-HRMS) et par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), selon des méthodes validées et accréditées (norme ISO 17025) ; la quantification des molécules repose sur le principe de dilution isotopique. Le seuil de quantification (statistiquement significatif) a été déterminé en tenant compte du niveau de contamination analytique rencontré pour ce type de molécule (blancs d'analyses systématiquement contaminés), une attention particulière et drastique ayant été portée à la maîtrise de ce phénomène (limites reportées dans le Tableau).

1.4. Méthodes statistiques

Les concentrations de RFB dans les muscles ont été croisées avec les données descriptives des poulaillers pour identifier d'éventuels facteurs structurels des élevages associés à la présence de polluants. Les variables descriptives ont été testées une à une pour leur association ($p < 0,10$) avec la présence et la concentration des 3 HBCD, des 8 PBDE et des sommes de ces composés aux moyens du test du χ^2 , des tests non paramétriques de Wilcoxon et de Kruskal-Wallis et du coefficient de régression sur les rangs de Spearman. Les variables significativement associées à l'un des indicateurs de RFB ont ensuite été introduites dans une Analyse Factorielle Mixte Discriminante (AFMD) complétée d'une Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) afin de constituer des classes d'élevages homogènes dans leur structure et leurs pratiques. Les variables décrivant la présence et la teneur de RFB dans les muscles ont été introduites en variables supplémentaires dans ces analyses, afin de mettre en évidence une éventuelle association entre les classes d'élevages et la contamination en RFB du muscle.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les poulaillers visités avaient en moyenne 15 ans sur l'ensemble de l'échantillon, sans différence entre type de productions. L'âge moyen des poulets prélevé était de 36 jours $\pm$ 1,1 en système conventionnel contre 85 jours $\pm$ 1,5 en système alternatif. La teneur en matière grasse (MG) des filets de poulet variait de 1,1% à 2,9% de la matière fraîche (moyenne 1,6 $\pm$ 0,4%). Au moins un congénère de PBDE a été isolé à un niveau supérieur au bruit de fond dans 41 pools de muscles sur 57 (72%), avec jusqu'à trois congénères détectés dans sept échantillons. Le congénère le plus fréquent était le BDE-209 suivi du BDE-47 et du BDE-99 ; les cinq autres congénères recherchés n'ont jamais été détectés (Tableau). La teneur maximale observée pour la somme des huit PBDE analysés était de 2,52 ng/g MG. La valeur moyenne de 1,1 ng/g MG pour ces huit polluants est comparable à celles des derniers plans de surveillance français entre 2012 et 2014, où cette teneur variait de 1,05 à 1,73 ng/g MG (Direction Générale de l'Alimentation, 2013, 2014 et 2015). La concentration moyenne de BDE-209, lorsqu'il était détecté, était plus élevée que celles des autres congénères faisant de cette molécule la plus abondante des PBDE isolés. Les concentrations observées de PBDE étaient comparables à celles obtenues dans l'étude EAT 2 (Anses, 2011) ; ceci tend donc à prouver que la viande de volaille participerait pour moins de 7% à l'exposition alimentaire d'un adulte français aux PBDE, contribution de référence attribuée par l'étude EAT 2 aux viandes de volaille.

La présence d'au moins un stéréoisomère d'HBCD a été détectée dans 26 filets (45%), le stéréoisomère α étant le plus fréquent. Les concentrations les plus élevées ont été obtenues pour la forme α avec trois échantillons supérieurs à 1,5 ng/g MG. La concentration moyenne des 3 HBCD était comparable à celles reportées dans les plans de surveillance de 2012 et 2014 ; la comparaison avec les résultats de 2013 est difficile à cause de la détection d'un échantillon contenant 13,3 ng/g MG d'HBCD, venant modifier fortement la contamination moyenne. De nouveau, la contamination moyenne observée dans notre étude était inférieure à l'estimation retenue dans l'étude EAT 2, laissant donc supposer que les viandes de volailles contribueraient à moins de 7% de l'exposition alimentaire d'un français aux HBCD.

L'analyse des résultats par système d'élevage montre que la fréquence de détection d'HBCD (au moins un stéréoisomère) était plus élevée dans les élevages alternatifs (19 élevages sur 30, 63%) que dans les conventionnels (7 sur 27, 26%, test χ^2 $p < 0,01$). De même, les filets contenant des PBDE provenaient plus souvent de troupeaux alternatifs (25 sur 30, 80%) que de conventionnels (16 sur 27, 59%, $p = 0,04$). Cependant, en ne considérant que les échantillons pour lesquels les HBCD étaient quantifiables, les teneurs moyennes étaient comparables entre types d'élevage : pour les 3 HBCD, il est alors observé une contamination moyenne de 0,47 ng/g MG IC_{95%} [0,32-0,63] en conventionnel contre 0,65 ng/g MG IC_{95%} [0,34-0,97] en alternatif ($p = 0,97$) et pour les 8 PBDE, 1,12 ng/g MG IC_{95%} [0,75-1,49] en conventionnel contre 1,08 ng/g MG IC_{95%} [0,83-1,33] en alternatif ($p = 0,96$).

L'AFMD et la CAH ont permis de distinguer deux classes d'élevages, les élevages conventionnels et les élevages alternatifs, qui se caractérisent par des différences de pratiques (âge à l'abattage, souche génétique employée, accès à un parcours, etc.), de qualité de produit (teneurs en matières sèches et grasses dans les muscles) mais aussi par des caractéristiques de construction du poulailler (Figure 2). Ainsi les poulaillers des élevages alternatifs sont-ils plus fréquemment construits avec du bois ou des parpaings pour les murs et soubassements. Néanmoins, les mêmes matériaux d'isolation sont utilisés dans les deux classes d'élevages ; une analyse des matériaux de construction des poulaillers a précédemment montré que seuls les isolants étaient susceptibles de contenir des RFB (Cariou et al., 2015). Deux paramètres de contamination, la présence d' α -HBCD et la somme des 3 HBCD supérieure au seuil de quantification, apparaissent significativement associés à la classe des élevages alternatifs. Selon Jondreville et al. (2017), les filets de poulets à croissance rapide et lente soumis à la même concentration alimentaire d' α -HBCD présentent des concentrations d' α -HBCD similaires. En revanche, les muscles des cuisses et

pilons, de même que le gras abdominal sont plus concentrés chez les poulets à croissance lente que chez les poulets à croissance rapide (+20%).

CONCLUSION

Les résultats obtenus pour 57 élevages de poulets de chair montrent que 54% des échantillons de muscle ne présentent aucune trace d'HBCD, et 28% aucune trace de PBDE. La fréquence de détection de RFB est significativement plus élevée dans les échantillons provenant d'élevages alternatifs que de conventionnels. Il est actuellement difficile de déterminer si cet écart est lié à l'âge des animaux plus élevé en système alternatif, à une différence de génétique ou à l'accès à un parcours extérieur, le sol pouvant être une source possible d'exposition des volailles aux RFB (Covaci et al., 2009). Des différences de conception apparaissent également dans les poulaillers conventionnels et alternatifs mais elles ne portent pas sur les matériaux d'isolation, qui sont les plus susceptibles de contenir des RFB. Lorsque des RFB sont détectés, ils le sont à des concentrations faibles, quel que soit le système d'élevage, et comparables aux résultats observés depuis 2011 dans les plans de surveillance français.

Aucune contamination atypique n'a été détectée, limitant la possibilité d'investiguer les sources potentielles de ces composés dans l'environnement des poulets. Afin de mieux comprendre l'origine possible des fortes contaminations, un essai expérimental a été mis en œuvre en 2016 pour vérifier si l'exposition directe de volailles à un matériau contenant de l' α -HBCD pouvait entraîner une contamination des denrées produites. Les résultats sont actuellement en cours d'analyse.

Ce travail vient confirmer que la viande de poulet est un faible contributeur à l'exposition humaine aux RFB via l'alimentation en France.

Cette étude a été réalisée avec le soutien financier du Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (CAS DAR AAP n°1256). Les auteurs remercient les structures de production et les éleveurs qui ont accepté de participer à l'enquête. Ces travaux ont été menés dans le cadre de l'Unité Mixte Technologique Sanivolt.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anses, 2011. Rapport d'expertise Etude de l'alimentation totale française 2. <https://www.anses.fr/fr/documents/PASER2006sa0361Ra1.pdf>
- Anses, 2012. Avis Saisine n°2010-SA-0225. <https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/RCCP2010sa0225.pdf>
- Cariou R., et al., 2015. In : Onzièmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Tours.
- Covaci A., et al., 2009. Sci. Total Environ., 407, 4387-4396.
- Direction Générale de l'Alimentation, 2013. http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/PSPC_Bilan_2012_20131023_cle8dd8bf.pdf
- Direction Générale de l'Alimentation, 2014. http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Bilan_PSPC_2013_cle0e1631.pdf
- Direction Générale de l'Alimentation, 2015 http://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/bilan_pspc_2014.pdf
- EFSA, 2011a. EFSA Journal, 9 (7), 2296. www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/doc/2296.pdf
- EFSA, 2011b. EFSA Journal, 9 (5), 2156. www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/doc/2156.pdf
- Jondreville C., Travel A., Méda B., Dominguez-Romero E., Cariou R., Dervilly-Pinel G., Le Bizec B., Travel A., 2017. In : Douzièmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Tours.
- Stockholm convention, 2014. <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/ListingofPOPs/tabid/2509/Default.aspx>

Tableau. Concentration de polybromodiphényléthères (PBDE) et d'hexabromocyclododécane (HBCD) dans les matières grasses de muscle de poulet (57 élevages, 2014-2015, France). Les moyennes et médianes sont calculées sur les échantillons où la molécule considérée a été détectée.

	N ¹ détecté	% ND ²	Concentration ng/g matière grasse			
			médiane	moyenne	maximum	Seuil ³
PBDE						
BDE- 28	0	100				0.010
BDE- 47	19	67	0.066	0.073	0.164	0.050
BDE- 99	18	68	0.040	0.043	0.074	0.030
BDE- 100	0	100				0.020
BDE- 153	0	100				0.025
BDE- 154	0	100				0.015
BDE- 183	0	100				0.050
BDE-209	31	46	1.010	1.199	2.446	0.400
Σ 8 PBDE	41	28	0.799	1.096	2.519	/
HBCD						
α-HBCD	25	56	0.155	0.390	2.510	0.100
β-HBCD	1	98	0.250	0.250	0.250	0.100
γ-HBCD	2	96	0.569	0.569	0.603	0.400
Σ 3 HBCD	26	54	0.392	0.604	2.569	/

¹Nombre d'élevage où la molécule est détectée

²Non détecté

³Seuil de quantification pour la molécule

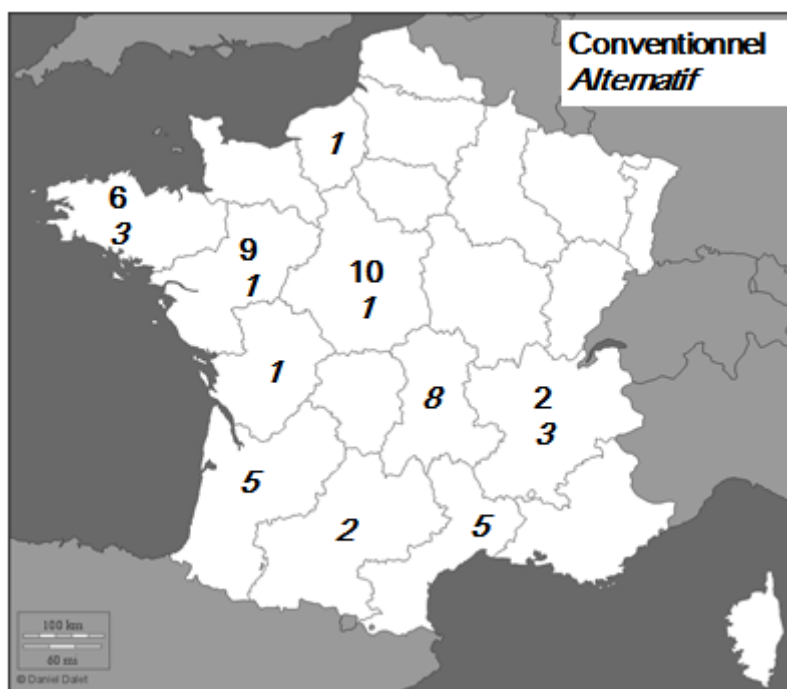


Figure 1. Répartition géographique par système de production des élevages de poulets de chair enquêtés (57 élevages, 2014-2015, France).

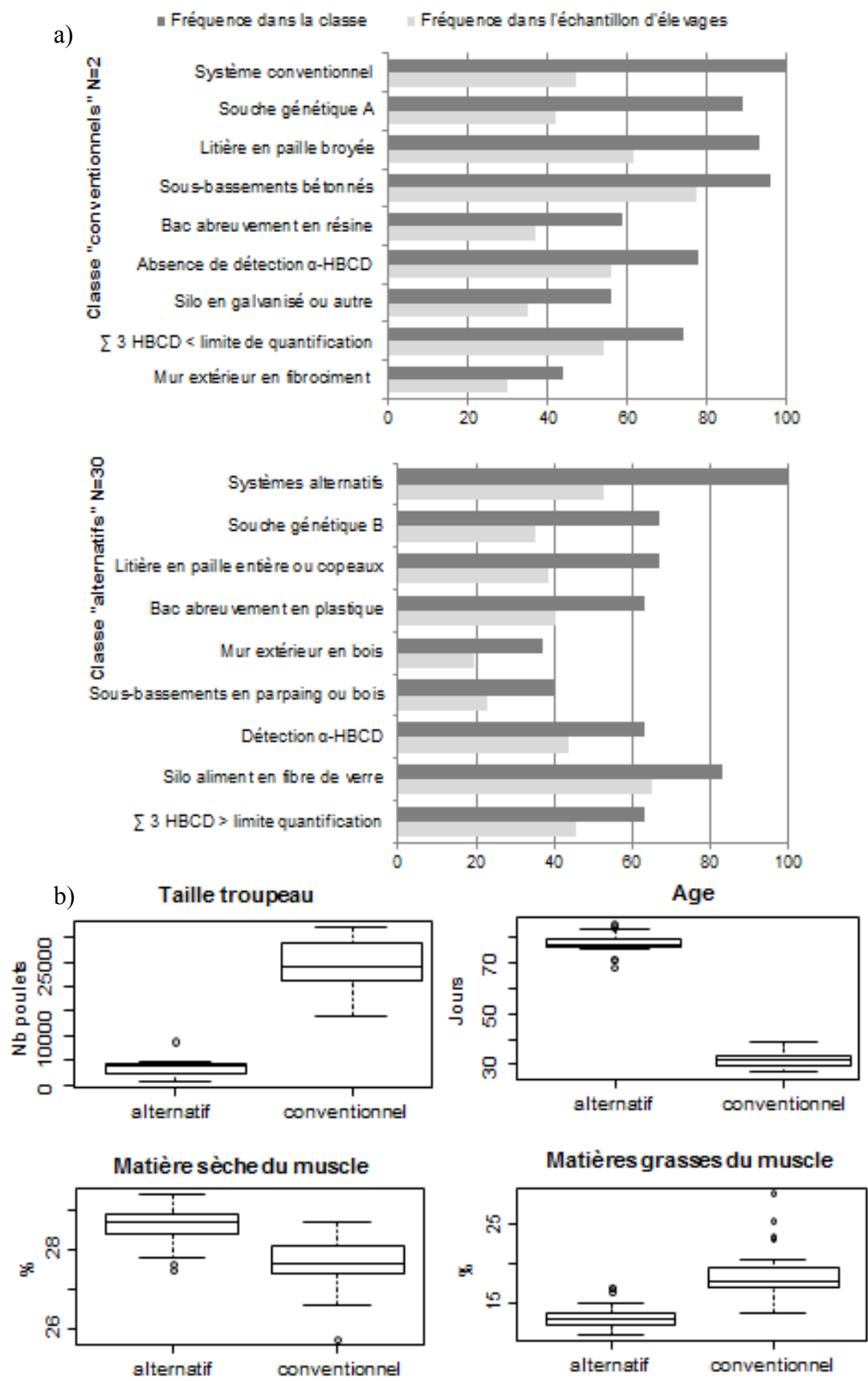


Figure 2. Caractéristiques significativement discriminantes des deux classes d'élevages constituées par AFCM et CAH, a) Fréquences des caractéristiques qualitatives, b) Distributions des caractéristiques quantifiées (57 élevages de poulets de chair, 2014-2015, France).

APOPTOSE ET STEATOSE HEPATIQUE

Rémignon Hervé, Ben Haj Yahia Rim et Marty-Gasset Nathalie.

*GenPhySE, Université de Toulouse, 24 Chemin de Borde Rouge, Auzeville Tolosane, CS 52627, 31326
Castanet-Tolosan Cedex, France*

remignon@ensat.fr

RÉSUMÉ

Au cours d'une cinétique de gavage de canards mulards, des mesures de perte par fonte à la cuisson de foies gras ont été évaluées ainsi que des paramètres de leur composition chimique (matières sèches et minérales, lipides) et les activités des caspases initiateurs (-8 et -9) ou effectrices (-3 + -7). L'étude montre que l'activité des caspases est faiblement détectable en début et en milieu de gavage mais s'accroît fortement à partir de J10. Cela semble signer la mise en place de phénomènes apoptotiques en fin de gavage, probablement en réponse à la forte sollicitation métabolique du tissu hépatique induite par la suralimentation.

En sus du pouvoir prédictif du poids du foie et de sa teneur en lipides, le niveau d'activités des caspases étudiées permet de prédire de façon fiable environ 75% de la variabilité de la fonte au cours de la cuisson. Le lien entre l'activité des caspases et la fonte à la cuisson pourrait s'établir à travers le pouvoir protéolytique de ces enzymes qui participeraient à la fragilisation des structures cellulaires des hépatocytes. D'autres études vont être menées, avec un spectre de protéases plus large, pour confirmer cette hypothèse.

ABSTRACT

Apoptosis and Hepatic Steatosis.

Along a full period of force-feeding of mule ducks, measurements of cooking yields of fatty livers (foie gras) have been performed in association with the determination of the chemical composition (dry matter, ashes, lipids contents) and activities of initiator (-8 and -9) and executioner (-3 + -7) caspases. Results indicate that activities of caspases are low from the beginning to the middle of the force-feeding period but increase significantly after 10 days. This indicates that apoptosis is present at the end of the studied period, probably in response to the high metabolic solicitation of the hepatic tissue induced by the force-feeding.

In addition to the liver weight and its lipids content, the value of activities of caspases allow to reliably estimate 75% of the variability of cooking losses of the fatty liver. The relationship between the activity of caspases and cooking losses could be explained by proteolytic activities of those enzymes which could weaken cellular structures of hepatocytes. Other studies are actually on going, with a larger set of proteases, to confirm that hypothesis.

INTRODUCTION

La mort cellulaire est un phénomène permanent et indispensable de l'organisme. Elle est représentée par trois mécanismes (apoptose, nécrose, mort autophagique) qui sont indispensables au maintien de l'homéostasie cellulaire. L'apoptose représente la mort cellulaire programmée avec la plus forte occurrence (Lockshin et al., 2004) et participe ainsi à maintenir le bon fonctionnement des tissus et organes en éliminant les cellules endommagées ou non indispensables. Par exemple, l'absence de régulation de l'apoptose est présente dans de nombreux types de cancer (Evan et al., 2001).

La stéatose hépatique provoquée par la suralimentation forcée des palmipèdes induit une activation forte du métabolisme qui se trouve alors principalement tournée vers la synthèse et le stockage des lipides au niveau du tissu adipeux mais aussi dans les hépatocytes eux-mêmes. Au cours de la cuisson du foie gras, une part de ces lipides va être exsudée de ces hépatocytes à cause de la rupture des membranes cellulaires induites par la chaleur. Il s'en suit une fonte, essentiellement lipidique, qui si elle est trop importante peut nuire notablement aux qualités de présentation du produit, et à ses propriétés sensorielles, mais qui entraîne également des pertes économiques pour les transformateurs. Si certains facteurs ont été préalablement identifiés comme pouvant être associés à une fonte importante (origine génétique, poids du foie, teneur en lipides, moment de l'éviscération, barèmes de cuisson, etc...), il n'en reste pas moins vrai qu'une certaine part de la variabilité de cette fonte reste inexplicée (Theron et al., 2012).

L'apoptose étant un phénomène médié par l'activation de certaines protéases (les caspases), nous avons émis l'hypothèse qu'une protéolyse renforcée dans des hépatocytes en apoptose pourrait fragiliser leur cytosquelette et ainsi favoriser la fonte à la cuisson de certains foies gras. Dans cette expérience, nous avons donc tout d'abord cherché à savoir si l'activité des caspases variait au cours du gavage et si ces activités pouvaient être associées à des niveaux de fonte variables.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et échantillons

Un lot de 210 canards mulards a été élevé à la Ferme Expérimentale de l'Oie et du Canard (FEOC, Dordogne) selon un protocole standard. A l'âge de 12 semaines (poids vif moyen = 4,140 kg), les animaux ont été répartis aléatoirement en deux lots afin d'être gavés selon deux modalités différentes. Le premier lot dit « témoin ou T » a été gavé pendant 12 jours (23 repas) avec une intensité normale de gavage (quantité moyenne d'aliment consommé en gavage = 9435 g).

Le deuxième lot dit « intensif ou I » a été gavé pendant la même période mais avec une intensité de gavage légèrement plus forte (quantité moyenne d'aliment consommé en gavage = 9835 g). Dans les deux lots, l'aliment distribué en gavage était identique (38% de grains pour 62% de farine et 3% de premix).

A J0, J2, J4, J6, J8, J10 et J12, 15 animaux de chaque lot ont été abattus. Les foies ont été immédiatement éviscérés et pesés, et des échantillons ont été congelés dans de l'azote liquide pour les futures analyses. Quand les foies présentaient un poids supérieur à 300g, ils ont été refroidis pendant 6 h sur un lit de glace puis conditionnés en verrine de 180g et pasteurisés au LEGTA de Périgueux (VP = 70 min à 80°C). Après deux mois de conservation en chambre froide, le rendement technologique à la cuisson (fonte) a été déterminé.

1.2. Echantillonnage et dosages.

A J0, 10 échantillons de foie congelés ont été sélectionnés afin de conserver la variabilité du poids de foie. Pour les autres dates, 6 échantillons ont été choisis par type de gavage, 3 avec une fonte faible et 3 avec une fonte élevée, tout en respectant la variabilité de poids de foie. Sur l'ensemble de ces échantillons, les mesures suivantes ont été réalisées :

- Mesure de la teneur en lipides.

Elle a été estimée sur le foie entier frais à l'aide d'un spectrophotomètre proche infrarouge (NIRS) selon le protocole décrit par Marie-Etancelin et al., (2014).

- Mesure de la teneur en matières sèches (MS) et minérales (MM).

Après broyage dans l'azote liquide, les échantillons sont séchés en étuve à 103°C puis minéralisés par passage au four à 550°C afin de déterminer les teneurs respectives en MS et MM.

- Mesures des activités des caspases.

Après extraction des protéines dans une solution adaptée, les activités des caspases 3+7, 8 et 9 ont été mesurées par chémoluminescence à l'aide du kit Caspase-Glo® Assay (Promega France, 69260 Charbonnières-les-Bains).

- Statistiques.

L'ensemble des calculs statistiques ont été effectués avec le logiciel SAS (2012) en utilisant le modèle linéaire généralisé (Proc GLM) pour les analyses de variance et les comparaisons de moyennes (test de Student-Newman-Keuls). Les corrélations entre les différentes variables sont celles de Pearson (Proc Corr) et les régressions linéaires ont été faites pas à pas (Proc Stepwise forward).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Quelle que soit la variable considérée, les effets du mode de gavage et de l'interaction mode de gavage*jour ne sont jamais significatifs ce qui nous a finalement amené à ne considérer que la modalité « Jour de Gavage (ou Jour) » dans la suite des analyses statistiques. Les résultats pour les principales

variables caractéristiques des foies sont reportés dans le tableau 1. Le poids du foie, sa teneur en lipides et en matière sèche augmentent régulièrement tout au long du développement de la stéatose. Au contraire, le rendement à la cuisson est statistiquement stable de J6 à J10 puis décroît fortement à J12 pour atteindre une valeur de 56,80%. Quelle que soit la caspase considérée, l'effet de la durée du gavage sur leur activité est toujours hautement significatif ($p < 0,0001$, tableau 2). On note que l'activité des caspases initiatrices (-8, -9) est relativement stable entre J0 et J6, puis diminue à J8 pour ensuite augmenter fortement. L'activité des caspases effectrices (-3 + -7) est stable et basse de J0 à J8, puis augmente fortement à J10 et J12. Les variations similaires des activités des caspases -8 et -9 ne permettent pas de privilégier l'implication plus spécifique de la voie d'activation intrinsèque (liée à l'activité de la caspase-9) ou extrinsèque (liée à l'activité de la caspase 8). On peut donc simplement en déduire que le phénomène d'initiation de l'apoptose est contenu jusqu'à J6 et décroît à J8, ce qui pourrait traduire une certaine capacité d'adaptation du foie, puis s'installe de manière prononcée et irréversible à partir de J10. Il y a donc bien, en fin de gavage, des phénomènes apoptotiques dans le foie stéatosé des canards gavés.

Les corrélations simples entre le rendement et l'activité des caspases, le taux de lipides ou de matière sèche sont négatives et voisines ($-0,7 < r < -0,6$, $p < 0,001$) alors que celle avec le poids du foie est légèrement plus élevée ($r = -0,82$, $p < 0,001$). On en déduit donc que plus le foie est lourd, avec une humidité réduite, un engraissement et des activités de caspases élevées, plus il aura tendance à fondre au moment de la cuisson.

Pour essayer de préciser la valeur de prédiction du rendement du foie, nous avons utilisé la procédure de régression linéaire ascendante pas à pas de SAS (proc stepwise forward) qui permet de combiner linéairement l'ensemble des variables prédictrices en les introduisant progressivement dans le modèle en fonction de leurs poids prédictifs respectifs. Si une nouvelle variable à introduire ne permet pas une amélioration satisfaisante de la prédiction, la procédure s'arrête sur le dernier modèle le plus prédictif obtenu. En utilisant cette procédure sur l'ensemble de la période gavage, le modèle le plus

prédictif combine le poids du foie, sa teneur en lipides et les activités des trois caspases avec un r^2 de 0,77 et un C(p) de Mallows de 6 ce qui indique que le modèle est précis et non biaisé (figure 1). Avec le poids de foie comme seule variable prédictrice, le r^2 est de 0,67 et le C(p) de Mallows de 1,13. Pour travailler sur une gamme de poids, et des pratiques, plus proches de la réalité de terrain, nous avons reconduit le même type d'approche en ne considérant que les foies des canards gavés pendant 10 ou 12 jours (figure 1). Dans ces conditions, les variables prédictives restent les mêmes mais avec un r^2 de 0,75 et un C(p) de Mallows de 5,19 pour un optimum de 6. En sus de l'information apportée par le poids du foie lui-même et sa teneur en lipides, la connaissance de l'activité des caspases au moment de l'abattage permet donc de prédire avec une bonne certitude le rendement des foies à la cuisson que ce soit sur une gamme de poids large ou plus resserrée.

CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons démontré que des signes probants de la présence du phénomène d'apoptose pouvaient être détectés lors de la mise en place de la stéatose hépatique et plus particulièrement en fin de période de gavage quand le métabolisme du foie est fortement sollicité. L'augmentation brutale de ce niveau d'activité des caspases en fin de gavage peut être interprétée comme le signe d'une certaine adaptation tissulaire à une forte surcharge métabolique. L'activité des caspases ayant pour but de dégrader certaines protéines, cela doit possiblement fragiliser la structure cellulaire hépatocytaire et pourrait donc expliquer pourquoi les foies avec les plus hauts niveaux d'activités des caspases sont ceux qui présentent également les plus faibles rendements à la cuisson. Les caspases n'étant pas les seules protéases susceptibles de fragiliser la structure des hépatocytes, notamment en fin de gavage, d'autres études sont en cours pour caractériser le niveau global de protéolyse dans les foies gras et ainsi mieux définir le lien pouvant exister entre protéolyse et fonte du foie gras à la cuisson.

SAS, 2012. The analysis for this paper was generated using SAS software. Copyright © 2012 SAS Institute Inc. SAS and all other SAS Institute Inc. product or service names are registered trademarks or trademarks of SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Theron L., Cullere M., Bouillier-Oudot M., Manse H., Dalle Zotte A., Molette C., Fernandez X., and Z. G. Vitezica, 2012, J. Anim. Sci., 90, 3312-3317

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Evan, G.I. and K.H. Vousden, 2001. Nature, 411(6835), 342-348.
 Lockshin, R.A. and Z. Zakeri, 2004, Int. J. Bio. Cell Bio, 36, 2405-2419.
 Marie-Etancelin C., Vitezica Z.G., Bonnal B., Fernandez X. and D. Bastianelli, 2014. Gen. Sel. Evol., 46(38), 1-7.

Tableau 1 : Evolution au cours du gavage du poids (Pdf), du rendement à la cuisson (%Rdt) et des teneurs en lipides (%L) et en matières sèches (%MS) et minérales (%MM) du foie.

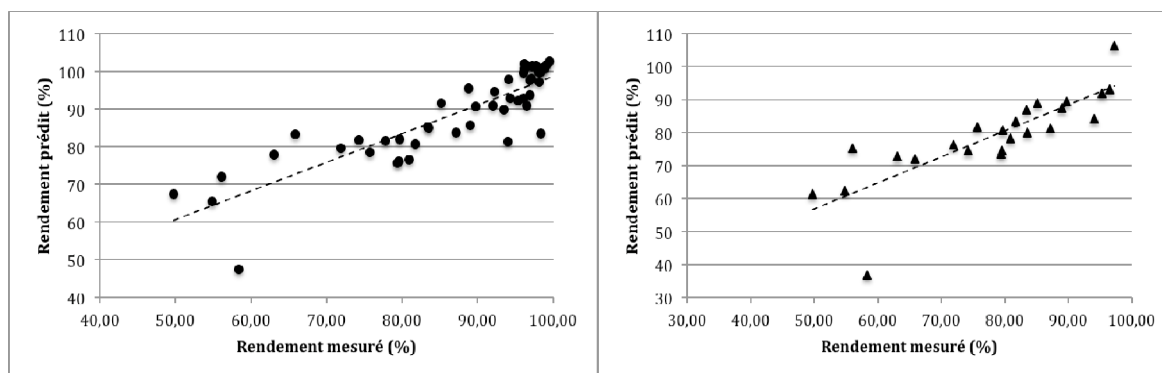
	J0	J2	J4	J6	J8	J10	J12	p
Pdf (g)	85,04 ^f	220,77 ^c	254,65 ^c	355,98 ^d	478,07 ^c	617,19 ^b	784,06 ^a	<0,0001
%Rdt	-	-	-	97,54 ^a	93,79 ^a	86,64 ^a	56,80 ^b	<0,0001
%L	4,14 ^f	14,44 ^c	31,30 ^d	42,72 ^c	49,48 ^b	52,07 ^b	68,32 ^a	<0,0001
%MS	30,09 ^f	38,43 ^c	48,30 ^d	57,07 ^c	62,29 ^b	64,42 ^b	68,32 ^a	<0,0001
%MM	1,08 ^f	0,76 ^f	0,73 ^d	0,39 ^c	0,30 ^{bc}	0,22 ^b	0,25 ^a	<0,0001

Les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas différentes (p<0,05)

Tableau 2 : Evolution au cours du gavage de l'activité des caspases initiatrices (8 et 9) et effectrices (3 + 7).

	J0	J2	J4	J6	J8	J10	J12	p
Caspase 8	1,33 ^b	1,00 ^{bc}	1,15 ^{bc}	1,08 ^{bc}	0,76 ^c	1,28 ^b	1,68 ^a	<0,0001
Caspase 9	1,19 ^{bc}	0,97 ^{bc}	0,92 ^{bc}	1,16 ^{bc}	0,77 ^c	1,35 ^b	1,86 ^a	<0,0001
Caspases 3+7	0,99 ^c	0,67 ^c	0,81 ^c	1,03 ^c	1,07 ^c	3,01 ^b	4,24 ^a	<0,0001

Les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas différentes (p<0,05)

**Figure 1 :** Représentation de la valeur de la fonte du foie prédite en fonction de la valeur mesuré pour l'ensemble des animaux concernés (à gauche) et ceux des stades J10 + J12 (à droite).

CARACTERISATION DES CLOSTRIDIIES PSYCHROTROPES RESPONSABLES DE L'ALTERATION DES FOIES GRAS PASTEURISÉS

Stella Planchon, Barbara Nibouche, François Zuber, Stéphane André

Unité EMAIRIT'S, CTCPA, Avenue Clément Ader, 84911 Avignon cedex 9
splanchon@ctcpa.org

RÉSUMÉ

Des clostridies psychrotrophes ont été identifiées dans l'altération des foies gras pasteurisés (FG de canard). Des conditions optimales pour leur croissance (milieu de culture, temps et température) ont été déterminées afin de mieux les isoler en laboratoire et les caractériser par la suite. La caractérisation de ces espèces permettrait de mieux comprendre leur comportement dans les produits depuis leur entrée sur la ligne de transformation jusqu'à la fin de la durée de vie (entre 6 et 36 mois à 4°C). Le deuxième objectif est de déterminer les niches écologiques de ces espèces et la présence éventuelle de points critiques sur une ligne de fabrication.

L'espèce *Clostridium algidicarnis* est aujourd'hui la plus fréquemment rencontrée dans les FG altérés provenant de 7 entreprises depuis 8 années consécutives. La modélisation de la croissance d'une souche de *C. algidicarnis* a permis de déterminer le taux de croissance à 12°C dans la matrice foie gras à l'aide du logiciel Symprevius®.

Ce taux extrapolé à des températures plus basses a montré que sur 36 mois de conservation, aucune croissance n'est constatée à 4°C (pour une concentration initiale de 100 spores/unité de vente) tandis que la croissance démarrerait après 19 et 4,5 mois à 5°C et 6°C, respectivement. La sporulation, laborieuse et non reproductible pour ces espèces, a été obtenue pour quelques souches sur une trentaine étudiée. Un facteur de 5 à 15 a été obtenu entre la thermorésistance en milieu de laboratoire et celle en matrice foie gras pour plusieurs souches de *C. algidicarnis*. Un outil PCR de détection/quantification a été développé pour la mise en évidence du genre *Clostridium* d'une part (amorces décrites dans la littérature), et secondairement de l'espèce *C. algidicarnis* (amorces dessinées à partir de séquences de génomes obtenues dans notre laboratoire). L'étude a été réalisée en milieu de laboratoire, la validation en matrice foie gras sera effectuée prochainement en cours de process et sur les produits finis altérés.

La température est un paramètre important dans la maîtrise de ces flores psychrotrophes. Les résultats de thermorésistance montrent que le traitement de pasteurisation n'est pas suffisant pour éliminer les spores de *C. algidicarnis*. Compte tenu de la fragilité du foie gras, le traitement de pasteurisation ne peut pas être augmenté. Il est donc important de connaître l'origine de la contamination des foies gras par ces espèces et d'identifier les points critiques de développement/sporulation sur les lignes de fabrication.

ABSTRACT

Spoilage of pasteurized foie gras by psychrotrophic clostridia

Psychrotrophic clostridia were identified in spoiled pasteurized Foie Gras (fatty duck liver). Optimal conditions for growth (temperature, medium, time) were selected to allow further study of isolates. Characterization of those species should lead to better understanding of their behavior in food products, from raw material, on transformation lines, up to the end of refrigerated shelf life (3 to 36 months at 4°C). In addition, identification of entry points and growing locations on lines would allow a better control of Critical Points. *Clostridium algidicarnis* is most frequently found in spoiled Foie Gras collected from 7 manufacturers, on 8 years study. Growth modelling with Symprevius® model of one *C. algidicarnis* strain in Foie Gras, provided growing rate at 12°C. Simulation showed that no development occurs at 4°C up to 36 months. However growth starts after 19 and 4.5 months at 5° and 6°C respectively. Difficult and poorly reproducible sporulation was obtained for only several strains among 30. Heat resistance of spores from different *C. algidicarnis* strains was measured 5 to 15 higher in Foie Gras than in laboratory medium.

An Identification / Quantification tool was developed to detect *Clostridium* spp genera (from PCR sequences previously described), then specifically *C. algidicarnis* (from the sequencing of strains isolated in our lab.). Study was performed in laboratory media, and will be extended to Foie Gras during complete process and refrigerated storage up to spoiled products. Temperature is key parameter for the control of psychrotrophic clostridia. Heat resistance data show that usual pasteurization is insufficient to eliminate *C. algidicarnis* spores. Due to Foie Gras heat sensitivity, thermal treatment cannot be increased. Therefore, better understanding of the origin of contamination of Foie Gras with those species, and identification of critical points of growth and sporulation on processing lines, are required.

INTRODUCTION

Le foie gras est un produit fragile qui est pasteurisé dans son emballage étanche entre 60°C et 85°C afin de préserver ses propriétés organoleptiques. Ce produit est ensuite stocké à des températures $\leq 4^\circ\text{C}$ et présente une longue durée de vie microbiologique entre 6 et 36 mois.

Les microorganismes pathogènes n'ont jamais été rencontrés dans ce produit tandis que les bactéries d'altération telles que les bactéries lactiques (Matamoros et al., 2010) et les **clostridies psychrotrophes** ont été identifiées (Prévost et al., 2013). Les bactéries lactiques peuvent être éliminées en maîtrisant les barèmes de pasteurisation appliqués. Les Clostridies peuvent en revanche former des spores qui leur permettraient de résister à ces traitements. Elles sont également souvent impliquées dans l'altération d'autres produits carnés sous vide.

Le but de l'étude est d'améliorer nos connaissances concernant les propriétés phénotypiques et génétiques de ces espèces. De nombreux articles portent sur la détection de 2 espèces principalement retrouvées dans les viandes sous vide : *Clostridium estherteticum* et *Clostridium gasigenes*. La diversité d'espèces ainsi que l'occurrence de ces clostridies psychrotrophes dans les foies gras n'a jamais été étudiée. Concernant leur thermorésistance, quelques articles mentionnent des valeurs pour des clostridies psychrotrophes en milieu de laboratoire mais pas en matrices alimentaires, notamment pas dans le foie gras. Peu de données sont disponibles au niveau génétique, un seul génome de *C. algidicarnis* a été récemment séquencé (2014). Nous avons donc également procédé à du séquençage du génome de 6 souches de clostridies psychrotrophes isolées de foies gras pasteurisés altérés. **Une meilleure connaissance de ces espèces permettrait un meilleur contrôle tout au long de la ligne de fabrication de foies gras pasteurisés (depuis l'éviscération jusqu'à la fin de durée de vie du produit).**

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Analyses de foies gras altérés

Un total de 99 échantillons de foies gras pasteurisés altérés, de différents types (blocs de foie gras sans morceaux, avec morceaux 30% et 50%, foie gras entier), et provenant de 7 entreprises françaises différentes, a été recueilli entre 2007 et 2015. Les foies gras ont été analysés comme suit : une quantité de 10 g de foie gras pasteurisé a été prélevée aseptiquement au centre et aux extrémités de chaque foie gras altéré, suivie d'une dilution au dixième dans de l'eau peptonée tamponnée et homogénéisation 1 min au Stomacher. Des dilutions sérielles de la suspension mère ont été préparées et étalées sur milieu gélosé Viande Foie Sulfite-Réducteur (VFSR). Les boîtes ensemencées ont été incubées à 25°C, en anaérobiose, pendant 5 j pour la mise en évidence des

clostridies psychrotrophes et 12°C pendant 10 j pour les clostridies psychrophiles.

Des colonies noires et blanches ont été prélevées sur les géloses afin de réaliser l'extraction d'ADN avec la méthode Instagen® selon les recommandations du fournisseur (Biorad). Des amorces universelles complémentaires de la région codant l'ARN ribosomal 16S des bactéries ont été utilisées pour réaliser l'amplification (Weisburg W.G. et al., 1991).

L'amplification a été réalisée avec le programme suivant : 3 min à 94 °C et 35 cycles de [40 sec à 94 °C, 40 sec à 55 °C, 1 min à 72°C] suivi d'une étape à 72°C pendant 10 min. La région 16S de l'ADN amplifié a été partiellement séquencée par la société Eurofins. Les séquences d'ADN disponibles en format FASTA ont été insérées dans les bases de données (NCBI Blast et Ribosomal Database Project, RDP) pour identifier les espèces bactériennes.

1.2. Modélisation de la croissance dans le foie gras

Une souche de *C. algidicarnis*, isolée précédemment de foie gras altéré et conservé en cryobilles à -80°C, a été utilisée. Une revivification suivie d'une culture ont été préalablement effectuée en milieu liquide (Rosenow AMC) à 30°C pendant 5 jours et 48h, respectivement. Une inoculation à 10² UFC/g d'une souche de *C. algidicarnis* a été réalisée dans la masse de foie gras cuit. Les échantillons inoculés (réplicats techniques pour chaque temps) ont été incubés à 12°C sous vide et prélevés à différents temps pendant 1 mois. La croissance a été mesurée par dénombrement sur VFSR incubé à 30°C pendant 5j. Une modélisation a été réalisée à l'aide du modèle de Rosso disponible dans le logiciel Symprevius®. Le taux de croissance maximal (μ_{max}) ainsi que le taux de latence (lag) ont été déterminés à partir de cette courbe de croissance.

1.3. Production de spores et mesure de la thermorésistance

Quatre souches de *C. algidicarnis* (N° 3227 013, 3227 034, 3227 038, 3227 043), isolées de foies gras altérés, ont été revivifiées puis cultivées en milieu Rosenow supplémenté avec amidon, marbre, cervelle. Un volume de 0,5 ml de culture a été déposé sur milieu VFSR pour réaliser la sporulation pendant 3 semaines à 30°C. Les spores obtenues ont ensuite été lavées à l'eau stérile avec plusieurs cycles de centrifugations, conservées par lyophilisation, puis remises en suspension dans de l'eau stérile froide juste avant utilisation.

La thermorésistance des spores de différents isolats a été mesurée en tampon phosphate et en mûlée crue pour bloc de foie gras, ionisée (86.2% foie gras tout venant frais, 1,3% sel nitrité, 0.3% poivre, 0.2% sucre et 12% eau). Détermination par la méthode en capillaires de 200 μL immergés des durées précises en bain d'huile à température prédéfinie et contrôlée. La durée de réduction décimale D, définie comme le temps nécessaire pour réduire la population d'un log,

ainsi que la valeur de δ , ont été calculées à partir du modèle de Weibull modifié.

1.4. Développement d'outils moléculaire de détection des clostridies psychrotrophes

Les souches de *Clostridium* spp., de bactéries lactiques, d'entérobactéries et d'autres bactéries pathogènes ou d'altération retrouvées dans le foie gras (*Thermoanaerobacterium*, *Bacillus*...) ont été cultivées en milieu Brain Heart Infusion (BHI). L'ADN a été extrait par la méthode Instagen® selon les recommandations du fournisseur (Biorad). Des amorces ont été conçues à partir de portions spécifiques du gène codant une enzyme de *C. algidicarnis*. La séquence du gène a été obtenue à partir de 3 souches de *C. algidicarnis* séquencées récemment (Planchon et al., données non publiées). L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur CFX96 Real time system (Biorad) avec le programme suivant : 2 min à 98 °C et 40 cycles de [30 sec. à 95 °C, 1 min à 55 °C]. Les données de température de fusion (Melting Temperature), le nombre de cycles nécessaire pour la détection de l'amplification : Ct (cycle threshold) et l'intensité de l'amplification ont été recueillis sous format Excel.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Un total de 99 échantillons de foies gras altérés provenant de 7 entreprises différentes a été recueilli entre 2007 et 2015 (Tableau 1).

Tableau 1 : Les différentes espèces de *Clostridium* spp. isolées de foie gras pasteurisés altérés

Nom des espèces identifiées	Nombre d'échantillons
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	1
<i>Clostridium algidicarnis</i>	26
<i>Clostridium algidicarnis</i> / <i>putrefaciens</i>	28
<i>Clostridium algidixylanolyticum</i>	3
<i>Clostridium aminovalerium</i>	1
<i>Clostridium bifermentans</i>	3
<i>Clostridium bowmanii</i>	3
<i>Clostridium bowmanii</i> / <i>esthereticum</i>	18
<i>Clostridium butyricum</i>	4
<i>Clostridium cochlearium</i>	3
<i>Clostridium frigidicarnis</i>	2
<i>Clostridium intestinale</i>	1
<i>Clostridium manganotii</i>	1
<i>Clostridium sartagoforme</i>	1
<i>Clostridium sp.</i>	
<i>Clostridium sporogenes</i>	1
<i>Clostridium thiosulfatireducens</i>	1
<i>Clostridium xylanolyticum</i>	1
TOTAL	98

Sur les 98 isolats, 26 isolats ont été identifiés comme appartenant à l'espèce *C. algidicarnis*, 28 appartenant à la double espèce *C. algidicarnis/Clostridium putrefaciens*, 3 appartenant à l'espèce *Clostridium bowmanii* et 18 appartenant à la double espèce *Clostridium bowmanii/Clostridium esthereticum*.

La présence de *Clostridium* spp dans des produits pasteurisés peut être liée à une contamination des matières premières puisque que les spores de ces bactéries peuvent survivre à la pasteurisation. Les altérations se décrivent par de fortes odeurs, avec ou sans changement de structure du produit (liquéfaction), avec ou sans noircissement des produits selon l'espèce altérante.

Les 4 espèces *C. algidicarnis/Clostridium putrefaciens* et *Clostridium bowmanii/Clostridium esthereticum* ne sont pas différenciables sur la base de l'ARNr 16S sur les portions séquencées. Nous avons opté pour une différenciation biochimique moins couteuse que le séquençage complet de la séquence codant l'ARNr 16S, et réalisable dans tous laboratoires de microbiologie car cette technique est facile et rapide à mettre en œuvre : Les espèces *C. algidicarnis* et *C. putrefaciens* se différencient par l'absence de croissance à 37°C pour cette dernière. Les espèces *C. bowmanii* et *C. esthereticum* se différencient par l'hydrolyse de l'amidon pour la première espèce.

La différenciation a été réalisée sur les 28 isolats de *C. algidicarnis/C. putrefaciens* et sur 3 isolats de *C. bowmanii/C. esthereticum*.

Tous les isolats appartiennent à l'espèce *C. algidicarnis*, excepté un. Concernant les isolats de *C. bowmanii/C. esthereticum*, tous appartiennent à l'espèce *C. bowmanii*. Les espèces *C. algidicarnis* et *C. putrefaciens* sont considérées comme psychrotrophes car elles se développent jusqu'à 37°C et 30°C, respectivement. Tandis que les espèces *C. bowmanii* et *C. esthereticum* sont psychrophiles car elles ne se développent pas au-delà de 20°C.

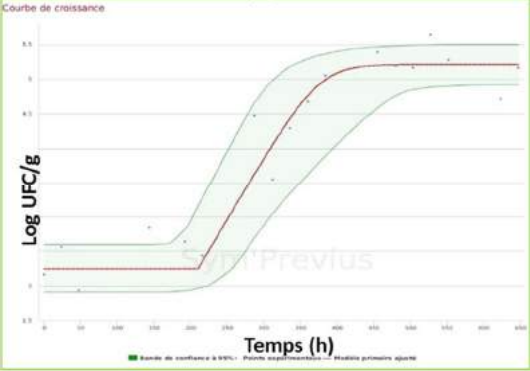
Ces espèces sont plutôt anaérobies strictes avec des tolérances à l'oxygène variables (avec *C. bowmanii* retenue comme la plus sensible à des manipulations en aérobiose). Toutes ces espèces sont donc manipulées en l'absence d'oxygène dans une station anaérobie (DonWhitley). L'espèce *C. bowmanii* est la plus difficile à cultiver et à isoler, la plupart du temps elle a été identifiée à partir d'ADN directement extrait de la matrice alimentaire altérée. Pour cette raison, nous ne disposons que de 3 isolats actuellement.

Cette étude menée sur 8 années, avec la collaboration des entreprises françaises, a permis de déterminer l'espèce majoritairement retrouvée dans l'altération de foies gras pasteurisés.

La croissance d'une souche de *C. algidicarnis* isolée de foie gras altéré a été réalisée sur du foie gras cuit et a permis de déterminer un taux de croissance à 12°C : la phase de latence Lag = 212 heures (8.9 jours) et le taux de croissance maximal $\mu_{max} = 0.04$ logs/heure

(Figure 1). Le taux de croissance détermine la vitesse de croissance du microorganisme. Cela signifie que la croissance de cellules végétatives de *C. algidicarnis* serait de 4 logs en 100 heures à 12°C (4.2 jours) dans du foie gras cuit. Une croissance d'un log (0.96) pourrait se produire sur une journée (24h) à 12°C.

Figure 1. Croissance dans du foie gras pasteurisé de la souche *Clostridium algidicarnis* 3227 009 à 12°C, en absence d'oxygène (sous vide)



Ces données permettent d'estimer le μ_{opt} (taux de croissance optimal à 37°C) grâce au logiciel de microbiologie prévisionnelle Symprevius®, sachant que la température de croissance est comprise entre 4°C et 40°C avec 37°C comme température optimale pour *C. algidicarnis* d'après la littérature. Ce résultat a permis d'extrapoler un taux de croissance optimal à 37°C qui serait de 0.518 logs par heure. La croissance débiterait après un temps de latence de 14.9 h. En 16 h (une nuit), la souche atteindrait une population maximale de 8.3 logs. L'ensemble des données a ensuite été utilisé pour simuler la croissance de cette souche à basse température : 4, 5 et 6°C. La simulation montre une absence de développement sur 900 jours de conservation à 4°C en partant d'une population de 0.1 spore/g (1 spore/10g) et en considérant qu'elle germe très rapidement. Avec la même population initiale, le taux de 100 ufc/g est légèrement dépassé en 900 j de conservation à 5°C. A la température de 6°C, le taux de 100 ufc/g est atteint en 220 j (7.5 mois) et la population serait de 100 000 ufc/g en 350 jours (11.6 mois). Ces résultats permettent de mieux expliquer le comportement des clostridies psychrotrophes au stockage réfrigéré dans du foie gras pasteurisé : avec une population de 1 spore/10g, c'est-à-dire 100 spores/kg (pour un échantillon industriel), le dénombrement peut révéler une absence de cellules à T0 c'est-à-dire inférieur au seuil de dénombrement soit 3.3 sp/g (méthode interne CTCPA). Lors de la simulation, le taux de 1000 ufc/g, correspondant au seuil au-dessus duquel on a constaté une altération, est atteint en 8 mois. D'après nos connaissances, ce résultat est souvent observé dans la réalité : les foies gras se révèlent altérés après 8 mois de stockage.

Ces résultats montrent que la température est un facteur très impactant dans le développement de ces flores psychrotrophes.

De nombreux essais de sporulations ont été réalisés sur différents milieux de culture, à différentes températures, en réalisant des combinaisons de conditions entre la préculture et la culture, avec ou sans chocs thermiques, avec ou sans choc oxygène. Cette étude nous a permis d'obtenir des spores pour 4 espèces de *C. algidicarnis*, 1 espèce de *C. estherteticum*, 1 espèce de *C. gasigenes*, et de nombreuses autres espèces de clostridies psychrotrophes (*Clostridium frigidicarnis*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium tertium*...) retrouvées sur des lignes de fabrication de foie gras mais jamais dans les produits pasteurisés altérés. Cependant, une précédente étude a montré que ces 3 espèces citées étaient capables de se développer dans les foies gras ; les industriels doivent donc rester prudents lorsque ces espèces sont identifiées sur leur ligne. La résistance thermique des lots de spores obtenues pour les différentes espèces a été mesurée par la méthode en capillaires (Tableau 2).

Tableau 2 : Valeurs de thermorésistance D (min) pour 4 souches de *Clostridium algidicarnis* (spores)

Valeurs de D (min)			
Souche	Température	Tampon	
		Phosphate	Foie gras
3 227-038	95°C	4,3	8,2
	90°C	32,8	No destruction
3 227-034	95°C	5,5	21,4
	100°C	< 0,28 (17 sec)	0,9
3 227-013	85°C	12,1	Pas de destruction
	90°C	2,1	30,8
	92,5°C	0,85	17,6
	95°C	< 0,28 (17 sec)	6,6
3227-043	80°C	4,9	Pas de destruction
	85°C	0,99	17,6
	90°C	< 0,28 (17 sec)	2,4
	92,5°C	ND	1,9

Pour la souche de *C. algidicarnis* 3227 013, la valeur de D dans le tampon phosphate se situe entre 12,11 et 0,85 min pour des températures de 85°C à 92,5°C. Dans le foie gras, la valeur de D se situe entre 30,8 et 0,48 min pour des températures de 90°C à 102,5°C. Un facteur 15 est présent entre les valeurs de D à 90°C et 92,5°C et un facteur 32 pour le paramètre δ (du modèle cinétique de Weibull), entre la destruction en tampon phosphate et en matrice foie gras. D'après les différentes valeurs obtenues de D, les valeurs de Z pour le foie gras et tampon phosphate sont équivalentes et sont de l'ordre de 6,4°C et 6,6°C, respectivement.

Pour la souche *C. algidicarnis* 3227 043, le paramètre D déterminé dans le milieu tampon phosphate se situe entre 27,23 min (données non montrées) et 0,99 min pour des températures de 75°C à 85°C. Dans le foie gras, la valeur de D se situe entre 45,57 et 1,91 min pour des températures de 82,5°C min (données non montrées) à 92,5°C. Un facteur 15 existe entre la thermorésistance en matrice et en tampon phosphate à 85 °C et un facteur de 28 pour le paramètre δ . D'après les différentes valeurs obtenues, les valeurs de Z sont proches et sont de 6,9°C en matrice foie gras et 7,1°C en tampon phosphate.

Pour la souche *C. algidicarnis* 3227 034, le paramètre D déterminé dans le milieu tampon phosphate se situe entre 32,8 min et < 17 sec pour des températures de 90°C à 100°C. Dans le foie gras, la valeur de D se situe entre 21,4 min et 0,9 min pour des températures de 95°C à 100°C. Un facteur compris entre 3 et 4 existe entre la thermorésistance en matrice et en tampon phosphate à 85 °C.

Pour la souche *C. algidicarnis* 3227 038, le paramètre D déterminé dans le milieu tampon phosphate est de 4,3 min et 8,2 min dans la matrice foie gras à 95°C. Les résultats de thermorésistance obtenus pour les spores de 4 souches de *C. algidicarnis* ont montrés des valeurs de D assez proches en matrice foie gras à 95°C (entre 6 et 21 min), excepté pour la souche 3227 043 qui présente une valeur de D plus faible (< 1,9 min).

Les résultats de thermorésistance montrent que le traitement industriel usuel de pasteurisation n'est pas suffisant pour éliminer les spores de *C. algidicarnis* dans la matrice foie gras.

Le traitement de pasteurisation ne peut pas être augmenté compte tenu de la fragilité de la matrice foie gras. Il convient donc de pouvoir identifier l'origine de la contamination par les clostridies psychrotrophes sur la ligne de fabrication de foies gras pasteurisés. Une étude est en cours dans notre laboratoire concernant l'écologie de lignes de fabrication de foies gras pasteurisés. Cette étude est réalisée par la méthode de métagénomique en collaboration avec l'université de Liège. Elle sera réalisée dans 3 entreprises françaises.

En parallèle, un outil de détection des clostridies psychrotrophes retrouvées dans le foie gras (Cluster 2) et un autre outil spécifique de *C. algidicarnis* sont en cours de développement au laboratoire.

L'outil permettant la détection/quantification du genre *Clostridium* et utilisant des amorces décrites dans la littérature a été adapté à l'amplification de nos isolats de *Clostridium* spp. psychrotrophes. Les amorces ont été validées avec 6 espèces de *Clostridium* (*C. algidicarnis*, *C. putrefaciens*, *C. bowmanii*, *C. estherteticum*, *C. gasigenes* et *C. frigidicarnis*).

La spécificité a été vérifiée avec 12 genres et 23 espèces différentes, soit un total de 52 souches

susceptibles d'être retrouvés dans les foies gras (entérobactéries, bactéries lactiques et autres). La sensibilité était faible car le seuil de quantification se situait autour de 10³ CFU/mL et une variabilité de l'efficacité des amorces a été mise en évidence entre les espèces.

La spécificité des amorces utilisées pour la détection/quantification spécifique de *C. algidicarnis* a été validée sur 45 isolats de cette espèce. Elle a également montré l'absence d'amplification vis à vis d'autres clostridies (15 espèces ont été testées) et de 32 souches d'autres bactéries susceptibles d'être retrouvées dans le foie gras. Les essais ont également montré une faible sensibilité des amorces avec un seuil de quantification assez élevé (10³ CFU/mL).

CONCLUSION

Clostridium algidicarnis est l'espèce la plus fréquemment retrouvée à ce jour dans l'altération des foies gras pasteurisés à longue durée de vie réfrigérée. Les analyses de foies gras altérés continueront à être réalisées afin de suivre l'évolution des espèces de clostridies psychrotrophes dans cette matrice. L'espèce *C. algidicarnis* semble bien adaptée au foie gras car elle se développe relativement facilement (même en présence de sel nitrité).

C. algidicarnis ne peut pas être détruite par traitement de pasteurisation à cause de la thermorésistance élevée des spores. Il est donc nécessaire de contrôler le développement et la sporulation de cette espèce avant le traitement thermique. L'écologie de ligne nous apportera des éléments importants concernant le développement de ces espèces au cours de la transformation de foie gras pasteurisé. Elle nous permettra également d'identifier si des points critiques, favorables à la présence ou au développement ou à l'accumulation de ces espèces, sont présents sur les lignes de fabrication.

Le problème majeur actuel reste le seuil de détection des méthodes d'analyses microbiologiques : la présence d'une seule spore (non détectable à Jo) suffit pour entraîner l'altération d'un foie gras pasteurisé au cours de sa longue durée de vie. Le problème de seuil de détection est aussi valable pour l'outil de détection par biologie moléculaire.

En effet, compte tenu des seuils obtenus dans cette étude, la quantification de *C. algidicarnis* dans les échantillons provenant de l'environnement (les surfaces) et également dans les ingrédients (entrant dans la composition des foies gras comme les épices) dont la concentration en cellules de la cible est généralement faible (autour de 10 CFU/mL), ne pourra pas être déterminée. Une détection pourra seulement être envisagée après enrichissement des échantillons dans un milieu de laboratoire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Matamoros S.**, S. André, I. Hue, H. Prévost and M. Pilet (2010). Identification of lactic acid bacteria involved in the spoilage of pasteurized “foie gras” products. *Meat science* 85(3): 467-471.
- Prevost S.**, Cayol JL, Zuber F, Tholozan JL, 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.
- Weisburg WG**, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991 Jan; 173(2): 697-703.

THERMORESISTANCE APPARENTE DES BACTERIES LACTIQUES DANS LE FOIE GRAS PASTEURISÉ

André Stéphane¹, Tejedor Gaël¹, Budziszewski Benoit¹,
Zuber François¹, Planchon Stella¹, Membré Jeanne-Marie^{2,3},

¹ CTCPA, Unité de microbiologie EMaiRIT'S, 449 Avenue Clément Ader, 84911 AVIGNON,

² INRA, UMR1014 Secalim, 44307 NANTES,

³ LUNAM Université, Oniris, 44307 NANTES

sandre@ctcpa.org

RÉSUMÉ

Dans les produits pasteurisés réfrigérés, le développement de bactéries lactiques limite souvent la DLC du produit, par dégradation organoleptique. Une meilleure connaissance de cette flore est primordiale pour limiter cette dégradation et optimiser les traitements de pasteurisation thermique. Des protocoles d'analyses microbiologiques et des milieux de culture spécifiques ont été mis au point, pour être au plus proche des conditions industrielles de pasteurisation du foie gras, et ainsi pouvoir expliquer la variabilité de la thermorésistance de flores lactiques d'intérêt vis-à-vis de certains paramètres de composition des matrices et de conditions de process. Les premiers résultats, obtenus à partir d'un plan d'expérience fractionné pour 7 facteurs à 2 niveaux, ont montré l'influence très forte de la matrice foie gras au cours et après le traitement thermique sur la thermorésistance apparente de deux espèces bactériennes. Puis il a été étudié l'influence des 3 facteurs les plus importants sur la thermorésistance (température de traitement, milieux de traitement et de recouvrement). La thermorésistance augmente quand la concentration en foie gras dans les milieux de traitement et de recouvrement augmente. Cette étude montre que les données de thermorésistance issues de la littérature conduisent à surestimer fortement la destruction des bactéries dans le foie gras pasteurisé. En effet, ces valeurs D ou δ sont pour la plupart obtenues avec des milieux de laboratoire, alors que des thermorésistances jusqu'à 145 fois plus élevées sont observées en expérimentant dans la matrice foie gras.

ABSTRACT

Apparent Heat Resistance of Lactic Bacteria in Foie Gras Products

Growth of lactic bacteria is usually observed as limiting factor of pasteurized then chilled product, along with sensory defect. Better knowledge of this flora is therefore useful to limit the degradation and optimize pasteurization treatments. Specific analysis methodology and growing media were designed to investigate as close as possible to industrial conditions for Foie Gras pasteurization, allowing to explain variability in heat resistance of several lactic bacteria with changes in matrix composition and process conditions. First results were obtained through factorial experimental design with 7 factors on 2 levels, display strong influence of foie Gras matrix on the apparent heat resistance of two species. Additional study was performed with the 3 most influencing factors (heat treatment temperature, destruction and recovery media). Apparent heat resistance increase with the concentration of Foie Gras in destruction and recovery media. This study shows that using published heat resistance data leads to strongly overestimates efficiency of thermal destruction of bacteria in pasteurized foie Gras. Indeed, published D or δ values are usually obtained in laboratory media, whereas heat resistance up to 145 fold higher are observed in Foie Gras matrix

INTRODUCTION

Dans les produits pasteurisés réfrigérés, les bactéries lactiques représentent souvent la flore dont le développement limite la Durée de Vie Microbiologique du produit, par dégradation organoleptique de celui-ci. Cette flore, qui correspond à 12 genres bactériens, combine de nombreuses caractéristiques lui permettant de se développer rapidement à faible température.

Une meilleure connaissance des bactéries lactiques et en particulier de leur thermorésistance, est ainsi primordiale pour l'optimisation des procédés et la maîtrise qualitative notamment des produits à base de foie gras. Parmi les bactéries lactiques, c'est *Weissella viridescens* qui présente la thermorésistance la plus élevée (Borch et al., 1988 ; Santos et al., 2005, données internes). Et cette espèce est retrouvée dans plusieurs échantillons de foies gras pasteurisés, au cours du stockage réfrigéré. Or, au regard des traitements thermiques appliqués par les industriels (au minimum 50 minutes à 70°C), une thermorésistance maximale mesurée de $D = 15$ min à 60°C, ne devrait pas conduire à la survie de cette espèce. L'étude de différents paramètres environnementaux devrait donc permettre de démontrer l'existence de thermorésistance extrême dans certaines conditions environnementales.

Afin de valider ce type de phénomène dans le foie gras, il paraît nécessaire de déterminer plus précisément la thermorésistance d'isolats sauvages représentatifs des contaminations observées dans ces produits. Ces données devraient permettre d'avancer dans la compréhension des mécanismes d'acquisition de cette thermorésistance, afin de mieux définir les traitements, et/ou de limiter cette thermorésistance avant le traitement.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Matériel biologique

L'espèce *W. viridescens* (souche 1103 037) a été sélectionnée pour sa thermorésistance élevée dans le groupe des bactéries lactiques. *Enterococcus faecium* (3003 002) a été retenu car fréquemment utilisé comme germe de substitution d'espèces pathogènes non sporulantes.

1.2. Milieux à base de foie gras (cru ou cuit)

Afin de pouvoir cultiver des souches bactériennes puis de les récupérer sur une matrice se rapprochant le plus possible d'un foie gras, il a été nécessaire de créer un milieu à base de foie gras utilisable au laboratoire. Le pourcentage maximal de foie gras, additionné à de la gélose blanche a été de 60% de foie gras que celui-ci soit cru ou cuit. Pour la gélose au foie gras cru (FGu),

la base a été une mûlée crue préparée par le CTCPA puis congelée et décontaminée par ionisation.

Pour la gélose au foie gras cuit (FGi), plusieurs blocs de foie gras appertisés sans morceaux et provenant d'un seul et même lot industriel ont été utilisés.

1.3. Production des suspensions bactériennes

Les souches ont été mises en culture sur les différentes géloses et selon différentes conditions (cf. plan d'expérience). Suite à l'incubation des géloses (MRS ou FGu), les tapis bactériens ont été récupérés par raclage et du Tryptone Sel (TS), puis centrifugés (5 min à 9000G à 4°C). Le culot a été repris dans un bouillon TS jusqu'à son utilisation.

1.4. Dénombrement

Les dénombrements ont été effectués soit en profondeur en gélose MRS soit en surface de gélose FGi. Les flores ont été incubées 5 jours à 25°C quelle que soit la gélose utilisée.

1.5. Thermorésistance

Les paramètres de thermorésistance ont été obtenus à l'aide de capillaires en verre plongés dans un bain d'huile pendant différentes durées et différents facteurs: la température, le milieu de traitement (TS ou FGu) ou le milieu de recouvrement (= milieu de dénombrement des flores survivantes, MRS ou FGi). La destruction des bactéries a été modélisée selon le modèle de Weibull permettant de déterminer le paramètre δ . La thermorésistance ainsi mesurée en intégrant l'impact de l'environnement, notamment de recouvrement, est appelée thermorésistance apparente.

1.6. Plan d'expériences

- Plan d'expérience fractionné

Un plan d'expérience a été conçu avec 7 facteurs à 2 niveaux afin d'évaluer le poids de chaque facteur sur la thermorésistance apparente. Les facteurs et niveaux de facteur sont les suivants : l'espèce bactérienne (facteur A : *Enterococcus faecium* / *Weissella viridescens*), le milieu de croissance (facteur B : MRS/FGu), la température de croissance (facteur C : 8°C/25°C), l'âge des cellules bactériennes (facteur D : début de phase exponentielle/14 jours de stockage), le milieu de traitement (facteur E : Tampon Phosphate/FGu), la température de traitement (facteur F : température inférieure/supérieure ; 60 ou 65°C pour *E. faecium* et 65 ou 70°C pour *W. viridescens*), le milieu de recouvrement (facteur G : milieu MRS/Foie Gras cuit (FGi)). L'ordre des essais a été fixé à l'aide d'un tirage aléatoire.

Une analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée dans le but de déterminer les facteurs qui avaient un impact prépondérant sur la thermorésistance apparente. Afin de traiter correctement les résultats, le test a été réalisé en prenant en compte tous les facteurs

et toutes les interactions (sauf celles « retirées » intervenant dans les interactions cachées).

- Carré latin

Les essais ont été réalisés sur une seule espèce bactérienne, *W. viridescens*, flore déterminée précédemment comme la plus thermorésistante, avec 3 facteurs avec 5 niveaux chacun : le milieu de traitement thermique contenant « 0, 25, 50, 75 ou 100% » de foie gras cru, la température de traitement (de 57 à 65°C), le milieu de recouvrement gélosés contenant 0, 25, 50, 75 ou 100% » de foie gras cuit.

Les niveaux moyens en termes de milieu de croissance, de température de croissance et d'âge des cellules bactériennes ont été fixés respectivement à : milieu MRS ; incubation à 25°C ; début de phase exponentielle.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Poids des facteurs

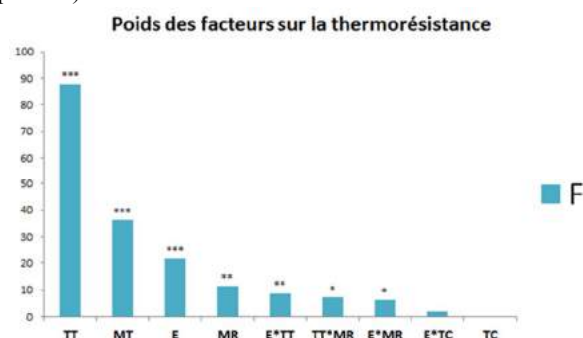
L'exploitation des résultats du plan d'expérience fractionné à 7 facteurs variants a permis de mettre en évidence que l'espèce bactérienne, le milieu de traitement, la température de traitement et le milieu de recouvrement avaient chacun un impact significatif sur la thermorésistance ($Pr > F < 0.05$, Figure 1). Le milieu de croissance, la température de croissance et l'âge des cellules bactériennes n'avaient pas d'effet, tout comme la majorité des interactions.

La température (TT) a été sans surprise le facteur ayant le plus d'effet sur la thermorésistance qui est aussi dépendante de l'espèce bactérienne (E).

Plus intéressant, le milieu de traitement (MT) et le milieu de recouvrement (MR) ont eu chacun un effet significatif. Certaines interactions présentent un effet significatif sur la thermorésistance, comme : « Espèce * Température de traitement » ($E*TT$), « Température de traitement * Milieu de recouvrement » ($TT*MR$), « Espèce * Milieu de recouvrement » ($E*MR$). Ces interactions sont néanmoins difficiles à comprendre et à interpréter.

Il a pu en être conclu que la matrice, dans notre cas du foie gras, joue un rôle important dans la résistance extrême des bactéries d'altération, observée dans les produits industriels.

Figure 1. Poids des différents facteurs sur la thermorésistance. TT : température de traitement ; MT : milieu de traitement ; E : espèce ; MR : milieu de recouvrement ; TC : température de croissance
F : Réponse du test (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

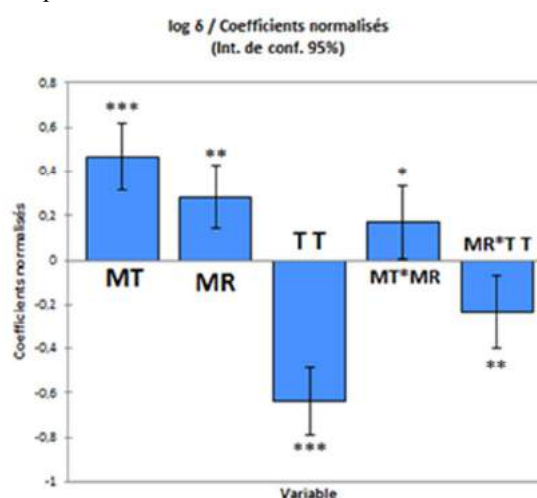


2.2. Modèle prédictif

Suite à cette première conclusion ayant mis en évidence des tendances, une nouvelle série d'expériences a été menée dans le cadre d'un carré latin uniquement sur la souche de *Weissella*. De plus, les facteurs liés à la croissance des bactéries ont été fixés, vu qu'ils n'avaient pas d'influence sur la thermorésistance, au cours de la première série d'essais. Comme déjà observé précédemment, la présence de foie gras dans les milieux, aussi bien de traitement que de recouvrement, impacte fortement sur la thermorésistance apparente. Entre des conditions extrêmes, il est observé un écart d'un facteur 20 sur la thermorésistance mesurée (exemple : 6,5 min < D 57°C < 142 min).

L'exploitation des résultats de thermorésistance, par régression linéaire, a permis de confirmer que le milieu de traitement, la température de traitement et le milieu de recouvrement avaient un impact significatif sur la thermorésistance ($Pr > |t| < 0.05$, figure 2).

Figure 2. Effet des facteurs et interactions sur la thermorésistance (valeur δ). (MT : milieu de traitement ; MR : milieu de recouvrement ; TT : température de traitement) *** : $p < 0.001$; ** : $p < 0.01$; * : $p < 0.05$



De même, les interactions « Milieu de traitement * Milieu de recouvrement » et « Milieu de recouvrement * Température de traitement » ont un effet significatif sur la thermorésistance apparente.

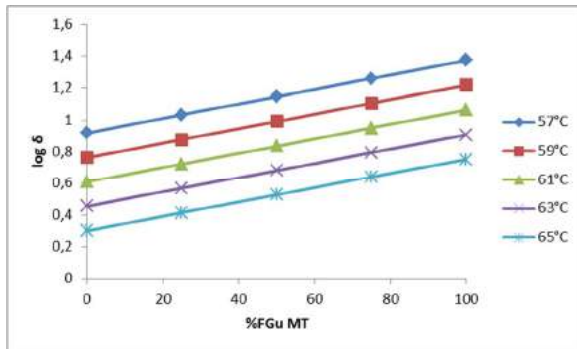
Les facteurs qui ont le plus d'impact sur la thermorésistance sont le milieu de traitement et la température de traitement. En effet, leur impact est hautement significatif ($p < 0.001$) comparé au reste des facteurs et interactions. Le milieu de traitement, le milieu de recouvrement et l'interaction MT * MR ont un effet « positif » sur la thermorésistance (coefficient normalisé > 0), c'est-à-dire qu'une augmentation du niveau de ces facteurs et de leur interactions augmente la thermorésistance apparente.

À l'inverse, la température de croissance et l'interaction MR*TT ont un effet « négatif » sur la thermorésistance. L'interaction MT*TT n'est pas représentée sur la représentation graphique car elle n'avait pas d'impact significatif sur la thermorésistance.

Les représentations graphiques ont été réalisées à l'aide de l'équation du modèle de la régression linéaire, ce sont donc des prédictions selon le modèle suivant :

$\log \delta = 1,12 + 9,38 \text{ E-}03 * A + 5,67 \text{ E-}03 * B - 0,161 * C + 9,69 \text{ E-}05 * AB - 1,65 \text{ E-}03 * BC$; avec : A = Pourcentage de foie gras cru dans le milieu de traitement ; B = Pourcentage de foie gras cuit dans le milieu de recouvrement ; C = Température de traitement. Ce modèle peut ensuite être utilisé pour représenter graphiquement l'impact prédictif de chacun des facteurs.

Figure 3. Évolution de la thermorésistance prédite ($\log \delta$) en fonction du pourcentage de foie gras cru dans le milieu de traitement (%FGu MT)



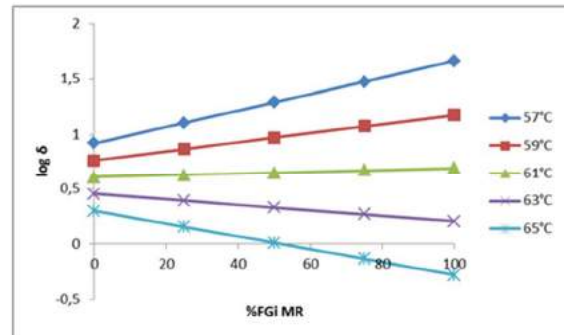
La Figure 3 représente l'évolution de la thermorésistance à différentes températures en fonction du pourcentage de foie gras dans le milieu de traitement, sans tenir compte de l'influence de la concentration en foie gras du milieu de recouvrement MR : 0% FGi (= milieu MRS). Il peut être observé que plus le pourcentage de foie gras dans le milieu de traitement augmente, plus la thermorésistance apparente augmente.

Ainsi, la souche de *W. viridescens* testée présente une thermorésistance 3 fois plus élevée (écart de 0.45 log) dans un milieu de traitement composé de foie gras (100%, condition «industrielle»), qu'en condition de laboratoire (TP), et cela sans tenir compte du milieu de recouvrement.

De plus, cet effet du milieu de traitement n'est pas dépendant de la température de traitement, l'évolution étant la même quelle que soit la température. Enfin, le modèle prédit une évolution de la thermorésistance quasi linéaire avec ce facteur : la thermorésistance modélisée est directement proportionnelle à la concentration de foie gras dans le milieu de traitement. La Figure 4 représente l'évolution prédite par le modèle, de la thermorésistance en fonction du pourcentage de foie gras cuit dans le milieu de recouvrement (milieu où sont revivifiées les bactéries

ayant survécu au traitement thermique). Dans ce cas, sans tenir compte de l'effet du pourcentage de foie gras dans le milieu de traitement (MT : 0% FGu (= destruction en milieu Tampon Phosphate).

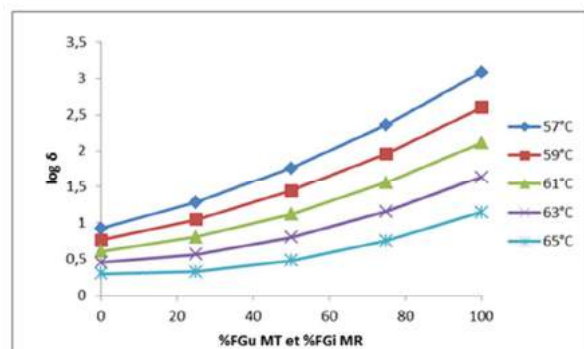
Figure 4. Évolution de la thermorésistance prédite ($\log \delta$) en fonction du pourcentage de foie gras cuit dans le milieu de recouvrement (%FGi MR)



Le pourcentage de foie gras dans le milieu de recouvrement a un effet sur la thermorésistance prédite ($\log \delta$), mais cet effet est dépendant de la température. En effet, aux températures les plus faibles (57°C, 59°C), l'addition de foie gras dans le milieu de recouvrement augmente la thermorésistance. La thermorésistance est jusqu'à 5 fois plus élevée à 57°C dans un milieu de recouvrement composé de foie gras.

À l'inverse, à des températures plus élevées, une augmentation de la concentration en foie gras dans le milieu de recouvrement diminue la thermorésistance apparente. La souche est donc 4 fois moins résistante dans un milieu de recouvrement composé de foie gras qu'en milieu de laboratoire à 65°C. Il faut noter qu'il est connu que lorsque la température augmente, tous les autres facteurs perdent de leur influence sur la thermorésistance. De même, il faut tenir compte de l'interaction «Milieu de recouvrement * Température de traitement» qui a un fort impact négatif sur la thermorésistance. Les résultats montrent également que l'évolution de la thermorésistance était quasi linéaire. La thermorésistance apparente était donc directement proportionnelle à la concentration en foie gras dans le milieu de recouvrement.

Figure 5. Évolution de la thermorésistance prédite ($\log \delta$) en fonction du pourcentage de foie gras à la fois dans le milieu de traitement (%FGu MT) et dans le milieu de recouvrement (%FGi MR)



La Figure 5 présente l'évolution de la thermorésistance en fonction du milieu de traitement et du milieu de recouvrement. Les valeurs de pourcentage de foie gras cru ou cuit sont les mêmes, c'est-à-dire qu'au point d'abscisse 25, le $\log \delta$ correspond à la valeur obtenue avec 25% de foie gras cru dans le milieu de traitement et 25% de foie gras cuit dans le milieu de recouvrement. Elle permet de visualiser l'effet combiné du milieu de traitement et du milieu de recouvrement lorsque la composition du milieu est identique dans les deux milieux (ce qui reflète les conditions réelles).

La thermorésistance apparente prédite augmente quand le pourcentage de foie gras dans le milieu de traitement et le milieu de recouvrement augmente. En effet, la thermorésistance à 65°C a été augmentée de $0.30 \log \delta$ (0% FG) à $1.14 \log \delta$ (100% FG), soit une thermorésistance multipliée par 7. L'augmentation est nettement plus importante aux plus basses températures, par exemple à 57°C avec une thermorésistance multipliée par un facteur 145.

Ainsi, l'évolution de la thermorésistance globale prédite est dépendante de la température. En effet, plus la température est basse, plus l'écart de thermorésistance entre des milieux de traitement et de recouvrement à 0% à 100% de foie gras est important. L'écart à 65°C entre les milieux à 0% et 100% était de $0.84 \log \delta$ alors que l'écart à 57°C était de $2.16 \log \delta$. Il y avait donc une différence d'un facteur 20 ($1.32 \log \delta$) entre l'évolution de la thermorésistance entre les deux températures extrêmes du plan d'expérience.

L'évolution de la thermorésistance globale n'étant pas linéaire, elle n'est donc pas directement proportionnelle au pourcentage de foie gras dans le milieu de traitement et de recouvrement.

CONCLUSION

Nos expérimentations ont permis de déterminer quels facteurs avaient un effet significatif sur la thermorésistance de bactéries dans le foie gras et quel était le poids de ces facteurs par rapport aux autres.

En contradiction avec la bibliographie, les facteurs en relation avec la croissance n'ont eu aucun impact sur la thermorésistance. Par exemple, le milieu gras de croissance n'a pas induit une augmentation de la thermorésistance comme rapporté pour *Listeria monocytogenes* dans le beurre et la crème (De Matos et al., 1998). De même des cellules plus âgées n'ont pas présentées une thermorésistance plus élevée

qu'une culture fraîche, plus jeune (Christiansen et al., 2006, Martinez et al 2003).

En revanche, l'impact des milieux de traitement et de recouvrement, qui ont présenté un effet significatif sur l'augmentation de la thermorésistance des bactéries lactiques dans le foie gras, est en accord avec les travaux d'Osaili et al. (2009) pour qui plus un milieu de traitement était gras, plus la thermorésistance était élevée, tout comme le milieu de recouvrement pour Peck et al. (1992).

La nouveauté de nos résultats concerne la mise en évidence d'interactions («Espèce * Température de traitement», «Espèce * Milieu de recouvrement», et «Température de traitement * Milieu de recouvrement»), interactions qui montrent un effet significatif sur la thermorésistance.

Le deuxième plan d'expérience a confirmé que le milieu de traitement et de recouvrement avait un effet significatif sur la thermorésistance : les 2 milieux ont un effet protecteur des bactéries. À 57°C et 59°C, le milieu riche en foie gras semble avoir un effet protecteur alors qu'à 63°C et 65°C, l'addition de foie gras dans le milieu de recouvrement semble avoir un effet négatif sur la thermorésistance apparente. Cet effet n'était pas attendu, mais peut aisément s'expliquer par l'existence de l'interaction «Milieu de recouvrement * Température de traitement» qui a un fort impact négatif sur la thermorésistance.

Le foie gras va donc avoir globalement un effet plutôt protecteur sur les bactéries lactiques contre la destruction thermique, effet qui pourrait être dû aux acides gras disponibles dans cette matrice pour le métabolisme et la physiologie des bactéries lactiques.

Une étude a montré que les acides gras intervenaient dans la fluidité de la membrane cellulaire, et notamment lors de l'adaptation au froid (Chintalapati et al., 2004). On pourrait se demander si un mécanisme similaire n'est pas à l'origine de l'augmentation de la thermorésistance observée lors de notre étude. Enfin notre étude a montré que les données de thermorésistance issues de la littérature obtenues en conditions de laboratoire conduisent à surestimer fortement la destruction des bactéries lactiques dans le foie gras au cours de la pasteurisation. Nous avons observé pour une même souche une thermorésistance apparente à 57°C jusqu'à 145 fois plus élevée lorsqu'elle mesurée dans la matrice foie gras, comparé à celle observée dans du milieu Tryptone Sel, avec dénombrement sur MRS.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Borch E., 1988. Int. J. Food. Microbiol. (7), 317-330
- Chintalapati S., 2004. Cell. Mol. Biol. (50) 631-642
- Christiansen P., 2006. Int. Dairy J. (16) 1196-1204
- De Matos R. E., 1998. J. Appl. Microbiol. (84) 234-239
- Martinez S., 2003. L. Appl. Microbiol. (37) 475-481
- Osaili T., 2009. J. Appl. Microbiol. (107) 928-935
- Peck M., 1992. L. Appl. Microbiol. (15) 146-151
- Santos E. M., 2005. Int. J. Food. Microbiol. (97) 285-296

INTERET NUTRITIONNEL D'ŒUFS ENRICHIS EN IODE ET EN ACIDES GRAS OMEGA-3 CHEZ LES SUJETS HYPERCHOLESTEROLEMIQUES

Schmitt Bernard^{1,2} et Ferry Constance²

¹Centre d'Enseignement et de Recherche en Nutrition Humaine, CERNh/CHBS, BP 12233, F-56322 LORIENT (France),

²Association Bleu-Blanc-Cœur©, BP 60138, F-63530 FOUGERES Cedex (France)

schmitt.lorient@yahoo.fr

RÉSUMÉ

L'efficacité des acides gras oméga-3 dans la prévention des maladies cardiovasculaires serait renforcée par un apport en iode organique qui favoriserait une baisse significative des taux de cholestérol plasmatique. Afin de tester cette hypothèse, des œufs riches en acides gras oméga-3 et en iode, obtenus à partir d'une supplémentation de l'alimentation de poules pondeuses en graines de lin extrudées et en algues, ont servi de vecteur alimentaire pour cette étude randomisée, en double aveugle, portant sur 57 volontaires répartis en trois groupes parallèles. L'objectif était de comparer d'une part l'efficacité respective de 3 types d'œufs : standards, enrichi en acides gras oméga-3 ($\omega 3$), et enrichis en Iode+ $\omega 3$ (I/ $\omega 3$), sur le profil lipidique de personnes présentant une hypercholestérolémie et de s'assurer d'autre part de l'absence d'effets délétères sur le métabolisme thyroïdien d'un apport significatif en iode. Les résultats confirment l'absence d'augmentation du cholestérol total malgré une surconsommation d'œufs, une augmentation significative des taux de HDL-C dans le groupe I/ $\omega 3$ ainsi qu'une baisse des triglycérides et du rapport Cholestérol total/HDL-C. Cet effet est vraisemblablement dû à l'action agoniste de l'iode sur les PPAR α et son rôle de co-activateur de la lipoprotéine lipase, en synergie avec des capacités antioxydantes accrues. L'apport journalier de 350 μ g d'iode est bien toléré (absence de modification des taux de TSH et du rapport iodurie/créatinine). Au total, la consommation d'œufs riches en acides gras oméga-3 et en iode s'avère apporter une contribution efficace dans la prévention des maladies cardiovasculaires et ne présente pas de risque pour le consommateur.

ABSTRACT

Nutritional interest of eggs enriched in iodine and omega-3 fatty acids to the subjects with hypercholesterolemia.

The efficiency of fatty acids omega 3 in the prevention of the cardiovascular diseases would be strengthened by a contribution in organic iodine which would reinforce a significant reduction in the level of plasmatic cholesterol. To test this hypothesis, eggs rich in fatty acids omega 3 and in iodine, obtained from a supplementation of the feed of laying hens in extruded linseeds and seaweeds, served as food vector for this randomized, double-blind study, concerning 57 volunteers distributed in three parallel groups. The objective was to compare, on one hand, the respective efficiency of 3 types of eggs: standard, enriched in fatty acids omega 3 ($\omega 3$), and enriched in Iodine+ $\omega 3$ (I/ $\omega 3$) on the lipid profile of people presenting a hypercholesterolemia and on the other hand, to make sure of the absence of noxious effects on the thyroid metabolism, in relation with a significant contribution in iodine. The results confirm the absence of increase of the total cholesterol in spite of an overconsumption of eggs, a significant increase of the HDL-C in the group I / $\omega 3$, as well as a decrease of triglycerides and of the ratio of cholesterol total / HDL-C. This effect is due to the agonist action of the iodine on the PPAR α and its role as co-activator of the lipoprotein lipase, in synergy with increased antioxidizing capacity. The daily contribution of iodine of 350 μ g is well tolerated (absence of variation of the rate of TSH and of the iodine / creatinine ratio). In conclusion, the consumption of eggs enriched in omega 3 and in iodine, effectively contributes to the prevention of cardiovascular diseases and does not present risk for the consumer.

INTRODUCTION

Au-delà d'une efficacité reconnue des AGPI n-3 (oméga-3) dans la prévention des maladies cardiovasculaires (Legrand, 2010 ; Bradberry, 2013), quelques rares publications font état d'un renforcement de cette propriété grâce à un apport complémentaire en iode organique qui favoriserait une baisse significative des taux de cholestérol plasmatique (Garber, 1993). L'œuf constitue potentiellement un vecteur particulièrement intéressant pour enrichir nos apports alimentaires à la fois en oméga 3 et en iode (Surai, 2000). Cette étude, menée dans le cadre du programme de recherche ANR-AGRALID, a pour but d'évaluer d'une part l'efficacité d'un modèle d'enrichissement des œufs en iode et acides gras oméga-3 par une supplémentation de l'alimentation des poules pondeuses en graines de lin extrudées et en algues laminaires (*Laminaria digitata*, CEVA, 2015), et de mesurer d'autre part la balance risque/bénéfice de la consommation de ces œufs concernant le profil lipidique et le métabolisme thyroïdien de personnes présentant une dyslipidémie.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Le protocole

Il s'agit d'une étude en double aveugle, randomisée, en trois bras parallèles comparant un régime témoins « œufs standards » à un régime « œufs oméga-3 » d'une part et « œufs oméga 3/iode » d'autre part. 57 volontaires présentant une dyslipidémie mixte sont inclus. Leur régime est strictement contrôlé et homogénéisé dans tous les groupes. Les œufs sont fournis en fonction des groupes définis par le protocole. Tout traitement hypocholestérolémiant est arrêté à J-7 lors de la randomisation. Les volontaires consomment un œuf/jour en plus de leur alimentation standard équilibrée. La durée totale de l'étude est de 9 semaines.

1.2. La population étudiée

Les 57 volontaires (32 hommes et 25 femmes), présentent à l'inclusion les caractéristiques suivantes : âge moyen $57,8 \pm 10,0$ ans ; Cholestérol total (CT) : $2,52 \pm 0,39$ g/l ; Triglycérides (TG) : $1,60 \pm 0,81$ g/l ; LDL-Cholestérol (LDL-C) : $1,67 \pm 0,45$ g/l ; HDL-Cholestérol (HDL-C) : $0,57 \pm 0,15$ g/l ; CT/HDL-C : $4,72 \pm 1,45$; Iodurie : $552,68 \pm 216,30$ µg/24h ; I/Créat. = $534,57 \pm 166,43$.

1.3. Les produits à l'essai

Les œufs « standards » sont issus d'un élevage classique, non supplémentés en oméga 3 ni en iode.

Les œufs « ω3 » proviennent de poules dont l'alimentation est supplémentée avec des graines de lin extrudées selon le cahier des charges Bleu-Blanc-Cœur® (Schmitt, 2003).

Les œufs « I/ω3 » sont obtenus à partir de poules pondeuses supplémentées à la fois en graines de lin extrudées et en additif à base de laminaires riches en iode et en oméga-3 à longues chaînes. Cette supplémentation est également naturellement riche en vitamine A et en vitamine E. La composition respective en acides gras des trois lots d'œufs est donnée dans le **tableau 1**.

Les AGPI ω3 totaux, EPA et DHA sont 3x plus élevés dans les œufs ω3 et I/ω3 que dans les œufs standards et contiennent moins d'acides gras saturés. Ceci confirme le rôle essentiel de l'œuf comme vecteur privilégié des longues chaînes, l'iode semblant encore renforcer cette propriété.

Le rapport ω6/ω3 est trois fois moins élevé dans les œufs I/ω3 et ω3 que dans les œufs standards et sont conformes aux ANC pour les Acides gras (Anses, 2011). Il n'y a pas de différence significative de la teneur en cholestérol entre œufs standards et œufs ω3. Par contre, les taux sont significativement plus bas dans les œufs I/ω3 (- 52%).

Les œufs I/ω3 contiennent respectivement deux fois plus de vitamine E et à trois fois plus de vitamine A et sont dix fois plus riches en iode que des œufs standards ou ω3.

1.4 Analyses statistiques

L'évaluation intergroupe de l'efficacité des produits est réalisée par une ANOVA (ou analyse de variance) à un facteur avec mesures répétées sur les 3 périodes (J0, J21, J42). Le test non paramétrique de Kruskal et Wallis est prévu dans le cas où les données récoltées ne suivent pas une distribution normale. L'évaluation des paramètres en intra-groupe utilise le test t de Student ou le test de rang de Wilcoxon. Le test du chi 2 est utilisé pour mesurer la comparabilité des groupes pour les données qualitatives (sex-ratio) et le test t de Student pour les autres critères (âge, taux de cholestérol et de triglycérides).

1.5 Critères d'évaluation :

Mesure de l'efficacité déterminée par la comparaison intergroupe 2 à 2 des variations relatives des paramètres lipidiques (CT, HDL-C, LDL-C, TG) en valeur et en pourcentage.

Critères secondaires : Chromatographie des acides gras du sérum et de la membrane érythrocytaire.

Critères de tolérance de la surcharge iodée sur le fonctionnement thyroïdien : iodurie/24h et clairance de la créatinine, rapport iodurie/créatininurie) et dosage de la TSH plasmatique.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Evolution des Paramètres lipidiques

2.1.1. La comparaison au groupe témoin, après ajustement sur la valeur J0, des paramètres lipidiques des groupes I/ω3 et ω3 à J21 et J42 est donnée dans le **tableau 2** :

- Dans le groupe « I/ω3 », on note une baisse significative des triglycérides (-23,96% ; $p=0,05$) et une augmentation significative du HDL-C (+3,38% ; $p=0,03$).

- Dans le groupe « ω3 », on ne constate aucune évolution significative des paramètres lipidiques.

2.1.2. La comparaison intergroupe I/ω3 vs ω3 est également donnée dans le **tableau 2**. Le groupe I/ω3 se caractérise par :

- Une baisse significative du CT à J42 (-15,6% ; $p<0,05$).

- Une baisse significative du LDL-C à J21 et J42, respectivement -4,9%, $p<0,05$ et -18,2%, $p<0,05$).

- Une baisse significative du rapport CT/HDL-C, tant à J21 qu'à J42, respectivement -7,5%, $p<0,05$ et -16,9%, $p<0,05$.

Au total, le HDL-C est significativement augmenté dans le groupe I/ω3 par rapport au groupe témoin et les taux de CT, LDL-C et le ratio CT/HDL-C baissent de façon significative chez les volontaires bénéficiant d'une supplémentation en iode, par rapport à ceux n'ayant bénéficié que d'une simple supplémentation en ω3.

2.2 Evolution des acides gras

Le profil des acides gras par chromatographie en phase gazeuse a été réalisé dans le cadre d'une étude ancillaire portant sur un échantillon restreint de 15 volontaires répartis dans les trois groupes, mais ne permettant pas une analyse statistique des résultats. La composition des acides gras membranaires, plus représentative de l'efficacité dans le temps de l'apport en oméga 3, est donnée dans le **tableau 3**.

Compte tenu du faible effectif, ces résultats n'ont qu'une valeur indicative. Ils témoignent cependant d'une évolution globalement favorable dans les deux groupes ω3 et I/ω3 : baisse de LA et des AGPI n-6, en particulier de l'Acide Arachidonique ; Augmentation de ALA et des AGPI n-3 à longue chaîne ; baisse du rapport ω6/ω3 et stabilité des AGS. Ces modifications sont rapides, dès J21 et confirment les résultats de travaux antérieurs (Legrand 2010).

2.3. ORAC, Tocophérol et β-carotène

Les propriétés antioxydantes des différents régimes ont été évaluées, dans le cadre de l'étude ancillaire, par le test ORAC, mesurant l'activité antioxydante

du sérum. Avec les réserves nécessaires liées au petit nombre de sujets étudiés, on constate que l'ORAC est stable dans les groupes «témoin» (J21: 52,5 ; J42: 54,4) et «ω3» (J21: 45,3 ; J42: 44,2). Par contre, il augmente dans le groupe «I/ω3» (J21: 41,7 ; J42: 59,4 soit +42,44%).

2.4 Evolution du métabolisme iodé

Compte tenu du risque potentiel d'un excès d'iode sur le métabolisme thyroïdien, l'objectif était de s'assurer de l'absence d'effets délétères consécutifs à la surcharge iodée liée à la consommation de ces œufs enrichis.

Le groupe I/ω3 est caractérisée par un doublement de l'iodurie au bout de 3 semaines (J0=532,94 mcg/24h ; J21=1224,4 mcg/24h, soit + 229,74 %) suivi d'une diminution en deuxième période (J42=1034,3 mcg/24h, soit -15,52 %). Cela confirme d'une part une bonne assimilation de l'iode à travers la consommation de ces œufs, et d'autre part l'efficacité des mécanismes régulateurs, confirmée par le rapport Iodurie/créatinine qui augmente de façon significative à J21 ($917,2 \pm 162,4$; $p=0,05$, soit + 67,7%), suivi d'une diminution à J42, ($761,6 \pm 133,8$; $p=0,05$, soit -17%), imputable à un effet Wolff-Chaikoff. Parallèlement, les valeurs de la TSH restent stables et dans la fourchette de la normalité à tous les temps, tant en comparaison intergroupe qu'en évolution intragroupe ($1,91 < TSH < 2,55$ pour une valeur de référence de 0,4 à 4 mUI/l). La surcharge iodée n'a donc pas entraîné de modification du métabolisme thyroïdien malgré un apport important d'iode.

DISCUSSION

Quel que soit le type d'œuf, on ne constate aucune augmentation du cholestérol total, ce qui ne justifie a priori pas de restriction de sa consommation chez les sujets hypercholestérolémiques.

Ces résultats soulèvent la question des mécanismes permettant d'expliquer cette amélioration du profil lipidique et de la responsabilité respective de l'iode et de la forte concentration en Vitamines E et A des œufs I/ω3.

1) La vitamine E est un puissant désactivateur (Quencher) de l'oxygène singulet (Cilliard, 2006) et s'oppose d'une part à la peroxydation lipidique de l'alimentation des poules afin de préserver la qualité nutritionnelle des produits et notamment leur richesse en ω3 et d'autre part au stress oxydant, responsable de la peroxydation des LDL circulants et des phospholipides membranaires, tant chez les animaux que chez le consommateur, (Gobert, 2010).

2) Les mécanismes impliquant l'iode (en dehors de la synthèse des hormones thyroïdiennes) ont fait l'objet de nombreux travaux au Japon, (Kaji, 1984 ; Katamine, 1987), pays où les algues sont très

largement consommées. Ces auteurs ont montré que l'iode agit par un mécanisme comparable à celui des fibrates en activant les récepteurs nucléaires PPAR α dont les ligands sont les acides gras et leurs dérivés éicosanoïdes. Liés aux récepteurs des rétinoïdes (vitamine A) RXR sous forme d'un hétérodimère, ils initient la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines HDL, activent la lipoprotéine lipase dont l'iode est un cofacteur aussi bien dans le muscle que dans le tissu adipeux et induisent par ailleurs l'expression d'enzymes antioxydantes telle que la superoxyde dismutase ou la glutathion peroxydase (Berger, 2005). Ainsi, par des mécanismes complémentaires, il existe une synergie Iode/vitamine A et vitamine E, directement en lien avec l'apport d'algues de type laminaire dans l'alimentation des poules. Si l'apport d'antioxydant sous forme de vitamine E est essentiel dans la préservation du capital lipidique, il ne peut à lui seul expliquer l'augmentation du HDL-C. Par contre, l'action agoniste de l'iode sur les PPAR α apparaît déterminante dans la diminution des LDL-C et l'augmentation des HDL-C tout en renforçant la fonction antiradicalaire.

CONCLUSION

La consommation d'œuf par des personnes présentant une dyslipidémie n'entraîne pas d'augmentation des taux plasmatique de cholestérol. Ce résultat conforte d'autres études qui mettent à mal la mauvaise réputation des œufs en raison de leur richesse en cholestérol et en acides gras saturés. *A contrario*, la consommation journalière d'œufs enrichis en acides gras oméga 3 se traduit par une augmentation des taux de HDL-C, et cet effet est nettement renforcé par un enrichissement en iode associée aux vitamines A et E, se traduisant au final par une amélioration du profil lipidique chez le consommateur. L'iode contenu dans ces œufs est bien métabolisé et son élimination efficace est associée à la normalité dans le temps des paramètres de surveillance de la thyroïde, permettent ainsi de garantir la sécurité nutritionnelle de cet aliment. En outre, cet apport en iode peut, le cas échéant, venir compenser une éventuelle carence, notamment chez les personnes âgées ou contraintes de manger sans sel. Au total, la consommation régulière d'œufs enrichis en iode et en Oméga 3 chez des sujets hypercholestérolémiques constitue un aliment de choix à prendre en compte dans l'éventail des mesures préventives du risque cardiovasculaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Anses ; Édition scientifique. www.anses.fr
2. Berger J.P., Akiyama T.E. et al. 2005. Trends Pharmacol Sci., 26, 244-51
3. Bradberry J.C., Hilleman D.E. 2013. Pharm Therap., 38 (11), 681-691.
4. CEVA. www.ceva.fr/fre/media/file/laminaria-digitata
5. Cilliard J., Cilliard P. 2006. OCL, 13 (1), 24-28
6. Garber D.W., Henkin Y. et al. 1993. Food Chem Toxicol., 31 (4), 247-51.
7. Gobert M., Gruffat D. et al. 2010. Meat Sci., 85 (4), 676-683
8. Katamine S., Tanaami S. et al. 1987. Drugs Exp Clin Res., 13 (1), 1-4
9. Kaji K., Miyashita M. et al. 1984. Folia pharmacol Japonica, 83 (5) 451-457.
10. Legrand P., Schmitt B. et al. 2010. Lipids, 45, 11-19
11. Surai P.F. 2000. Brit Poultry Sci., 41 (2), 235-243
12. Schmitt B., Weill P. et al. 2003. Diabetes Metab Research 19 (2), S1-S14

Tableau 1. Composition en AG (en %), Vitamines et Iode des œufs pour chacun des trois groupes (* : p<0,05 ; ** : p<0,01)

Acides Gras (en %)	Œufs standards	Œufs I/ω3	Œufs ω3
Acide palmitique	24.7	21.6	22.7
Acide oléique	43.2	42.3	40.7
Acide linoléique	16.25	16.9	15.2
Acide α-linolénique	0.7	2.8	3.8
Acide arachidonique	1.7	1.2 *	1.3 *
EPA + DHA	0.7	2.1 *	1.2 *
Σ AG oméga-3	1.5	5.2 **	5.8 **
Σ AG Oméga-6	18.15	18.4	19.6
Rapport ω6/ω3	12.1	3.53**	3.38**
Acide gras saturés	35.1	30.3	31.5
Acides gras mono insaturés	45.25	46.1	45.5
Acides gras poly insaturés	19.65	23.6	25.4
Cholestérols(%)	0.48	0.25 **	0.48
Vitamine E (mg)	23.1	50.55**	24.0
Vitamine A (UI/kg)	4.70	13.10**	4.75
Iode (μg/œuf)	30.0	350.0**	30.0

Tableau 2. Paramètres lipidiques : Comparaison intergroupes vs témoin et I/ω3 vs ω3 (%) (* : p<0,05)

	groupe « I/ω3 »	←p→	Groupe «témoin»	←p→	groupe « ω3 »	I/ω3 vs ω3 (%)
Cholestérol (g/l)						
J0	2,53 ± 0,39		2,68±0,58		2,68±0,51	
J21	2,61 ± 0,11	0,84	2,63 ± 0,09	0,40	2,71 ± 0,15	-3,7 %
J42	2,32 ± 0,15	0,26	2,47 ± 0,12	0,11	2,75 ± 0,13	-15,6 % (*)
J21 →J42 (%)	-7,95 % ± 4,75	0,32	-3,61% ± 3,94	0,24	+ 4,22 ± 4,13	
Triglycérides (g/l)						
J0	1,53±1,02		1,20±0,72		1,66±1,01	
J21	1,24 ± 0,12	0,85	1,22 ± 0,11	0,42	1,44 ± 0,15	-13,9% (*)
J42	0,95 ± 0,12	0,67	0,99 ± 0,10	0,40	1,39 ± 0,17	-31,6% (*)
J21 →J42 (%)	-23,96 % ± 8,35 (*)	0,05	-13,39 % ± 6,72	0,11	- 9,62± 8,43	
HDL-C (g/l)						
J0	0,54±0,15		0,62±0,12		0,52 ± 0,18	
J21	0,59 ± 0,02	0,96	0,57 ± 0,02	0,50	0,58 ± 0,02	+1,7 %
J42	0,61 ± 0,02	0,14	0,56 ± 0,02	0,04	0,60 ± 0,02	+1,7 %
J21 →J42 (%)	+ 3,38% ± 3,25 (*)	0,03	- 1,69 %± 2,63	0,45	+ 3,44± 3,57	
LDL-C (g/l)						
J0	1,68 ± 0,39		1,82±0,46		1,83 ± 0,44	
J21	1,76 ± 0,10	0,83	1,73 ± 0,09	0,27	1,85 ± 0,14	-4,9 % (*)
J42	1,57 ± 0,13	0,32	1,70 ± 0,11	0,09	1,92 ± 0,12	-18,2% (*)
J21 →J42 (%)	-4,73 %± 9,48	0,25	- 5,18 %± 7,73	0,92	+ 5,55 ± 9,42	
CT/HDL-C(g/l)						
J0	5,01 ± 1,48		4,42±1,10		4,81 ± 0,33	
J21	4,69 ± 0,21	0,91	4,72 ± 0,20	0,23	5,07 ± 0,34	-7,5 % (*)
J42	4,08 ± 0,29	0,29	4,36 ± 0,24	0,36	4,91 ± 0,33	-16,9% (*)
J21 →J42 (%)	-14,51 %± 5,29	0,13	-7,17 % ± 4,38	0,36	- 3,83 ± 4,74	

Tableau 3 : Chromatographie des acides gras membranaires (en % des AG totaux)

AG en % des AG totaux	Témoin		Groupe ω3 (Evolution vs Témoin en %)		Groupe I/ω3 (Evolution vs Témoin en %)	
	J21	J42	J21	J42	J21	J42
C18 ;2 (LA)	10,06	11,98	9,57 (-4,87%)	9,3 (-22,36%)	9,0 (-24,87%)	9,8 (-18,19%)
C 18:3 (ALA)	0,13	0,13	0,15 (+15,38%)	0,17 (+30,76%)	0,14 (+7,69)	0,15 (+15,38%)
C 20:4 (AA)	12,95	11,7	13,04 (+0,69%)	13,44 (+14,87%)	12,47 (-3,70%)	12,73 (+8,80%)
C 20:5 (EPA)	0,64	0,69	0,73 (+14,06%)	0,91 (+31,88%)	0,73 (+14,06%)	0,75 (+8,69%)
C 22:6 (DHA)	5,24	4,14	6,06 (+15,64%)	6,05 (+46,13%)	5,29 (+0,95%)	5 (+20,77%)
Σω3	8,44	7,11	9,28 (+9,95%)	9,03 (+27,0%)	8,6 (+1,89%)	7,57 (+6,46%)
Σω6	27,93	27,83	27,08 (-9,24%)	26,45 (-4,95%)	26,05 (-6,73%)	26,98 (-3,05%)
ω6/ω3	3,35	4,15	2,94 (-12,23%)	2,96 (-28,67%)	3,15 (-5,97%)	3,9 (-6,02%)
AGS	44,38	44,51	44,09 (-0,65%)	45,12 (+1,37%)	44,76 (+0,85%)	44,39 (-0,26%)
AGMI	19,04	20,2	19,26 +1,15%	19,06 (-5,64%)	20,12 (+5,67%)	20,68 (+2,37%)
AGPI	36,61	35,29	36,64 +0,08%	35,82 (+1,50%)	36,91 (+0,82%)	36,93 (+4,64%)

ÉVALUATION DE PRATIQUES SUSCEPTIBLES DE RÉDUIRE LA CONTAMINATION DES ŒUFS À COUVER APRÈS LA PONTE

Puterflam Julie¹, Cormier Jennifer², Huneau-Salaün Adeline³

¹ ITAVI, Zoopôle Beaucemaine, 22440 PLOUFRAGAN

² HUBBARD SAS, Mauguérand, 22800 LE FOEIL

³ ANSES, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, BP 53, 22440 PLOUFRAGAN

RESUME

Au cours du refroidissement qui suit la ponte des œufs, leur coquille est perméable, ce qui les rend vulnérables à la pénétration de micro-organismes potentiellement pathogènes susceptibles de menacer le développement embryonnaire et plus tard la santé des poussins. Ce risque est conditionné par la présence de microorganismes sur la coquille, elle-même liée au temps écoulé entre la ponte et le ramassage, ainsi que par les conditions de stockage des œufs. Pour le maillon multiplication-accoupage, la désinfection des œufs à couver (OAC), qui permet d'éliminer les microorganismes de surface, constitue un moyen de prévention efficace pour limiter le risque de contamination. Toutefois, il est à noter que sa réalisation intervient plusieurs heures après la ponte, pendant lesquelles le risque de prolifération bactérienne de coquille reste possible. C'est pourquoi il est important de réduire la pression de contamination ambiante des OAC après la ponte et avant introduction dans le process d'accoupage, de façon sécuriser le produit fini. Dans ce contexte, l'Unité Mixte de Technologique (UMT) Sanivol, en partenariat avec la société Hubbard, a mis en place une série d'essais visant à évaluer différentes pratiques pour réduire la contamination des OAC avant désinfection, tels que l'hygiénisation de l'ambiance de ponte ou l'écartement des œufs de la salle d'élevage après la ponte. Les résultats ont montré que cet écartement permettait de diminuer de façon significative les contaminations bactériennes extra- et intra-coquillières des OAC.

ABSTRACT

Alternatives to formaldehyde compounds for hygiene of Gallus gallus hatching eggs

During cooling of freshly laid eggs, the porosity of the eggshell might favor environmental microorganisms to penetrate the egg. It may cause a degradation of chicks' health. This risk is conditioned by the presence of microorganisms on the shell, bound to the elapsed time between the laying and the collection, as well as by the storage conditions of eggs. For hatching process, disinfection of hatching eggs is an effectiveness way of prevention, but it is realized several hours after the laying, during which the risk of bacterial proliferation remains possible. For this reason it is important to reduce the pressure of eggs ambient contamination after the laying and before their introduction in the hatching process, in way to ensure the sanitary quality of finished product. UMT Sanivol, in collaboration with Hubbard carried out several assays to test alternative practices to reduce bacterial contamination of hatching eggs before disinfection. The use of an air disinfection system in the egg conveyor didn't lead to decrease bacterial contamination on egg surface. Quick isolation of freshly laid eggs from the rearing area led to a significant decrease of outer- and inner-shell bacterial contaminations.

INTRODUCTION

Les œufs à couver (OAC) sont stériles après la ponte (Mallet *et al.*, 2005). De plus, la cuticule, la coquille et les membranes coquillères constituent des barrières s'opposant à la pénétration de micro-organismes de la surface vers le contenu de l'œuf (Baron *et al.*, 2010). Toutefois, le passage des micro-organismes reste possible, du fait des pores de la coquille, et de l'altération de la cuticule dans le temps. Ainsi, certains micro-organismes issus de l'environnement d'élevage sont susceptibles de migrer dans l'œuf, la pénétration de la coquille étant essentiellement influencée par le niveau de contamination de l'œuf en surface (Messens *et al.*, 2007), lui-même lié au temps écoulé entre la ponte et le ramassage. Les conséquences peuvent être une augmentation de la mortalité embryonnaire, ou une libération au moment de l'éclosion de micro-organismes potentiellement pathogènes emprisonnés dans la cuticule lors du refroidissement (Guérin *et al.*, 2011). Pour limiter ce risque, les Arrêtés de lutte contre les infections à salmonelle dans les troupeaux de reproducteurs *Gallus gallus* et dindes (Arrêtés interministériels du 26 février 2008 modifiés) préconisent la désinfection des OAC. Toutefois, celle-ci étant réalisée plusieurs heures après la ponte, il est nécessaire de prévenir tout risque de contamination préalable en réduisant au possible la charge en micro-organisme des œufs.

De ce fait, l'UMT Sanivol, en partenariat avec la société Hubbard, a mis en place une série de tests visant à valider des pratiques susceptibles de réduire la contamination des œufs après la ponte. Il s'agit de la mise en place de méthodes ou de procédés permettant à l'œuf de refroidir dans un milieu sain afin de limiter la quantité de micro-organismes susceptibles de pénétrer à travers la coquille.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1 Origine des œufs

L'étude s'est déroulée de mai à décembre 2015 au sein d'un élevage de poules reproductrices de la filière chair logées en

bâtiment séparé en 2 parquets (40m*13m, 100m² de litière et 60m² de caillebotis) et équipé de pondeurs. Les œufs étaient collectés plusieurs fois par jour, triés (élimination des œufs sales, cassés, fêlés, déformés, poreux) et placés sur plateaux d'incubation.

1.2 Procédés testés

Deux procédés ont été étudiés : **l'hygiénisation du milieu de ponte et l'écartement des œufs de l'ambiance d'élevage après la ponte**. En ce qui concerne **l'hygiénisation du milieu de ponte**, trois modalités ont été testées.

La première est **l'utilisation de tapis de ponte perforés**, comportant des orifices permettant une meilleure ventilation, une surface de contact réduite avec les œufs, ainsi qu'un nettoyage et désinfection optimisés. Dans le bâtiment, la moitié des pondeurs était équipée de tapis non perforés et l'autre moitié de tapis perforés. De 30 à 58 semaines, 30 OAC par type de tapis ont été prélevés toutes les deux semaines. Les OAC étaient prélevés directement sur le convoyeur sans le faire tourner afin de pouvoir identifier le type de tapis sur lesquels ils avaient été pondus. Les œufs étaient placés sur des alvéoles cartons neuves.

La seconde modalité est **l'utilisation d'un nid à isolation optimisée** par rapport aux nids standards. Ce nid est conçu de façon à limiter les espaces permettant la pénétration des bio aérosols dans le convoyeur à œufs. Pour l'étude de cette modalité, 30 OAC ont été prélevés toutes les deux semaines pendant 28 semaines dans le bâtiment équipé des nids innovants, ainsi que 30 OAC dans un bâtiment similaire équipé de nids standards et pondus par des poules reproductrices d'une souche comparable et du même âge.

La troisième modalité est **l'hygiénisation de l'air ambiant dans le convoyeur à œufs**. Ce système fonctionne par aspiration et désinfection de l'air par traitement UV couplé à un système d'ionisation (traitement de 300m³ d'air en 1h). L'air est ensuite réintroduit dans le convoyeur. Ce système était mis en fonctionnement pendant deux semaines puis coupé pendant 2 semaines. Ce cycle a été répété pendant toute la durée de

production du lot d'animaux. Pour chaque journée de test, 60 OAC ont été prélevés sur la table de tri dans l'heure suivant la ponte. Au total, 17 répétitions ont été analysées.

Concernant l'écartement des œufs de l'ambiance d'élevage après la ponte : lors de chaque journée de test (7 au total), 21 OAC étaient stockés dans : le convoyeur à œufs sans système de désinfection (Témoin), la salle d'élevage, le convoyeur à œufs avec système de rampe de désinfection UV/ionisation, la salle de stockage du bâtiment, le sas sanitaire de l'élevage et le réfrigérateur. Les œufs y étaient stockés pendant 24 heures avant analyse.

1.3. Analyses au laboratoire

L'efficacité des procédés testés est mesurée par dénombrement de la flore aérobique mésophile totale (FAMT) de coquille à partir d'œufs poolés par 3. Chaque œuf a été frotté pendant 20 secondes dans une solution d'eau peptonée afin de décoller les bactéries présentes sur la coquille. Des dilutions successives ont été réalisées puis 1 ml de chaque solution a été déposé dans une boîte de Pétri et mélangé avec du PCA (Plate Count Agar) en surfusion à 45°C permettant un ensemencement dans la masse.

Une fois les dilutions réalisées, les OAC ont été placés dans un caisson hermétique équipé d'une lampe UV. Après 1h, les œufs ont été cassés puis les coquilles broyées et introduites par pool de 3 dans une solution d'eau peptonée. Chaque pool de coquilles a été secoué pendant 1 minute afin de récupérer toutes les bactéries présentes sur la surface interne de la coquille et sur les membranes coquillières. Un microlitre de cette solution mère a été introduit dans une boîte de Petri puis mélangé avec du PCA en surfusion à 45°C.

Après refroidissement les boîtes ont été placées pendant 72h à 30°C puis les colonies dénombrées. Les résultats sont exprimés en log d'Unité Formant Colonie par œuf (log UFC/œuf).

1.4. Prélèvements de poussières

Des prélèvements de poussières inhalables (diamètre inférieur à 10µm) ont été réalisés à

l'aide de capteurs individuels de poussières (CIP, ARELCO) dans la salle d'élevage et dans le tunnel de convoyage avec et sans activation du système de désinfection.

1.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été faites à l'aide du logiciel R (The R Project for Computing).

Afin de comparer les différentes modalités testées, le modèle linéaire suivant a été utilisé :

$$X = \mu + \alpha + \varepsilon$$

X = Variable analysée

μ = moyenne de X

α = effet fixe du type de tapis / du type de nid / du système de désinfection du convoyeur / du lieu de refroidissement

ε = résidus

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Hygiénisation du milieu de ponte

2.1. 1. Utilisation de tapis perforés

La contamination extra-coquillière moyenne des OAC est de $8,85 \pm 0,37$ log UFC/œuf sur tapis non perforés et de $8,98 \pm 0,36$ log UFC/œuf sur tapis perforés. En ce qui concerne la contamination intra-coquillière, elle est en moyenne de $2,26 \pm 0,65$ log UFC/œuf sur tapis non perforés et de $2,46 \pm 0,41$ log UFC/œuf sur tapis perforés. Il apparaît ainsi que l'utilisation de tapis perforés dans les nids n'a pas d'impact sur la contamination extra-coquillière ($p=0,73$) ni sur la contamination intra-coquillière ($p=0,49$). Guinebretière *et al.* (2011) avaient pourtant montré que l'utilisation de tapis perforés dans les cages de poules pondeuses permettait de réduire la contamination bactérienne des œufs. Il est à noter que la contamination des œufs produits en cages est moins importante que celle des œufs produits en systèmes au sol dont l'empoussièrement est plus important (Samiullah & Chousalkar, 2014). Par conséquent, l'hypothèse peut être faite qu'au-delà d'un certain seuil de contamination ambiant, l'effet potentiellement bénéfique du revêtement (ici les tapis perforés) se trouve limité.

2.1. 2. Utilisation de nids isolés

Dans les nids traditionnels, la contamination est de $9,31 \pm 0,22$ logUFC/œuf en extra-coquillière et de $2,55 \pm 0,65$ logUFC/œuf en intra-coquillière. Dans le nid isolé elles sont respectivement de $9,33 \pm 0,35$ et $2,50 \pm 0,61$ logUFC/œuf. Le nid isolé ne permet donc pas de réduire les contaminations bactériennes sur et dans la coquille des OAC ($p = 0,99$). Toutefois les tests ayant été réalisés dans deux bâtiments différents pour des raisons méthodologiques, on peut émettre l'hypothèse que le niveau d'empoussièrement ainsi que le microbisme des lots y étaient différents, générant ainsi une charge bactérienne des œufs variable d'un bâtiment à l'autre (Mallet *et al.*, 2005) et limitant ainsi la possibilité de comparaison des deux bâtiments et par là-même l'évaluation du nid isolé.

2.1. 3 Utilisation d'un système de désinfection de l'air du convoyeur

La mise en fonctionnement du système de désinfection de l'air du convoyeur permet de réduire la contamination extra-coquillière des OAC de $8,5 \pm 0,6$ à $8,3 \pm 0,7$ log UFC/œuf ($p=0,03$), ce qui laisse à penser à un effet décontaminant, toutefois relatif car inférieur à 1 log UFC/œuf. Cependant, elle entraîne une augmentation de la contamination intra-coquillière : $2,1 \pm 0,6$ à $2,3 \pm 0,7$ log UFC/œuf ($p=0,01$). Dans le même sens, les prélèvements de poussières réalisés dans le convoyeur ont permis de montrer que la quantité de poussières inhalables est plus importante lorsque le système de désinfection est en fonctionnement : $3,1 \text{ mg/m}^3$ d'air vs $1,8 \text{ mg/m}^3$ d'air sans système de désinfection ($p = 0,04$). On peut ainsi penser que la mise en fonctionnement du système de désinfection a entraîné la création d'un flux d'air vertical dans le convoyeur, avec un effet de concentration des poussières sur la coquille des œufs. Le fait que la contamination intra-coquillière s'en trouve augmentée indique que les poussières inhalables ont pu pénétrer d'une part les pores de la coquille (passage compatible avec leur diamètre inférieur à $10 \mu\text{m}$), mais également la cuticule et les membranes coquillères, qui constituent pourtant des filtres antibactériens efficaces (Baron *et al.*, 2010). On peut donc émettre les

hypothèses d'une part que les barrières physiques constituées par la cuticule et les membres coquillères ont été altérées, et d'autre part que le niveau de contamination élevé de l'œuf en surface a favorisé la pénétration des bactéries dans l'œuf.

2.4. Isolement des œufs pendant leur refroidissement

Les OAC refroidissant dans la salle d'élevage présentent la contamination extra-coquillière la plus élevée (Tableau 1). Les OAC ayant la plus faible contamination extra-coquillière sont ceux qui ont refroidi dans la salle de stockage du bâtiment, le sas sanitaire de l'élevage ou au réfrigérateur. Pour ces œufs, la contamination extra-coquillière est significativement inférieure à celle des œufs refroidis en salle d'élevage. Concernant la contamination intra-coquillière, l'impact du lieu de refroidissement n'est visible que pour les œufs ayant refroidi dans le sas sanitaire ou au réfrigérateur. Notons par ailleurs que 21,4% des œufs ayant refroidi au réfrigérateur et 17,8% des œufs ayant refroidi dans le sas sanitaire sont stériles en intra-coquillière, ce qui est significativement supérieur au pourcentage obtenu dans la salle d'élevage ou dans le convoyeur avec système de désinfection en fonctionnement ($p = 0,04$) (Tableau 2). Ces résultats indiquent que le fait d'isoler les OAC de l'ambiance d'élevage rapidement après la ponte, par un stockage dans un local dédié moins chargé en bio aérosols, et préférentiellement à température contrôlée, permet de réduire la pression bactérienne environnante et de fait le risque de pénétration des micro-organismes dans les œufs.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude indiquent que l'isolement rapide des OAC hors de l'ambiance d'élevage après la ponte permet de réduire significativement les contaminations bactériennes extra- et intra-coquillières en permettant un refroidissement dans une ambiance moins chargée en micro-organismes. Ainsi, on peut penser qu'un ramassage plus régulier des œufs permettrait d'optimiser leur hygiène et ainsi de sécuriser le processus d'accoupage. Notons que l'utilisation de robots à cet effet est actuellement en cours

d'étude et pourrait être utilisé sur le terrain si les résultats permettent d'en valider l'efficacité. Par ailleurs, afin de compléter l'étude de l'impact du lieu de refroidissement sur les contaminations bactériennes des OAC, un relevé des performances d'éclosion permettrait de s'assurer que le réfrigérateur, qui limite le risque de contamination des OAC, ne génère néanmoins pas d'impact négatif sur le développement embryonnaire. De plus, il serait intéressant de compléter les résultats avec des analyses microbiologiques permettant de caractériser les micro-organismes présents en intra et en

extra-coquillère. En effet, notons que certains micro-organismes non pathogènes peuvent contribuer à la protection de l'œuf comme flore de barrière limitant l'implantation d'une population de micro-organismes pathogènes. Concernant ce dernier type, il serait intéressant d'évaluer leur implication dans les mortalités embryonnaires et les pertes d'éclosabilité en suivant les œufs jusqu'à l'éclosion. L'amélioration de ces connaissances pourrait contribuer à orienter plus précisément les stratégies de maîtrise de la qualité sanitaire des œufs à couvrir.

Remerciements

L'UMT Sanivol tient à remercier la société Hubbard ainsi que le laboratoire d'analyses vétérinaires Trégobio pour leur collaboration à cette étude.

Références bibliographiques

- Baron, F., Jan, S. (2010). Microbiologie de l'œuf et des ovoproduits. *Inra production Animales*, 2.
- Durmus, I. (2012). Determining effects of use of various disinfecting materials on hatching results and total bacterial count. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7(8), 739-744
- Guérin, J-L., Balloy, D., & Villate, D. (2011). Maladies bactériennes. *Maladies des volailles*, 311-367
- Guinebretière, M., Guillaume, G., Bignon, L0, Conan, S., Audebet, G., Huonnic, D., Huneau-Salaün, A., & Michel, V. (2011). Aménagement des cages pour poules pondeuses impacts économiques, sanitaires, zootechniques et sur le bien-être animal. *Innovations Agronomiques*, 17, 199-211
- Mallet, S., Guesdon, V., Ahmed, M. & Nys, Y. (2005). Hygiène des oeufs pondus dans deux modèles des cages aménagées. *Journées de la Recherche Avicole*, 6, 487-491.
- Messens, W., Grijspeerdt, K., De Reu, K., de Ketelaere, B., Mertens., K. Eggshell penetration of various types of ehns'eggs by salmonella enterica serovar Enteritidis. *J. Food. Prot.*, 70, 623-628.
- Samiullah, J., & Chousalkar, K. (2014). Effect of production system and flock age on egg quality and total bacteriel load in commercial laying hens. *The Journal of Applied Poultry Research*, 23 (1), 59-70

Tableau 1 : Impact du lieu de refroidissement sur les FAMT extra- et intra-coquillières des OAC

	Contamination bactérienne (logUFC/œuf)		P	
	Extra-coquillière	Intra-coquillière	Extra-coquillière	Intra-coquillière
Salle d'élevage	11,4 ± 0,3 ^a	2,9 ± 0,4 ^a	<0,001***	0,02*
Convoyeur VMC OFF	9,3 ± 0,4 ^b	2,5 ± 0,6 ^b	TEMOIN	TEMOIN
Convoyeur VMC ON	9,4 ± 0,3 ^b	2,4 ± 0,6 ^b	0,73	0,42
Salle de stockage	8,9 ± 0,4 ^c	2,5 ± 0,5 ^b	<0,001***	0,82
sas sanitaire	8,8 ± 0,2 ^c	2,0 ± 0,5 ^c	<0,001***	0,003**
Réfrigérateur	8,7 ± 0,4 ^c	1,9 ± 0,5 ^c	<0,001***	0,002**

Tableau 2 : Impact du lieu de refroidissement des OAC sur leur stérilité intra-coquillière

	Stérilité intra-coquillière (%)	P
Salle d'élevage	0 ± 0 ^a	0,48
Convoyeur VMC OFF	4,8 ± 8,2 ^{ab}	TEMOIN
Convoyeur VMC ON	0 ± 0 ^a	0,48
Salle de stockage	2,4 ± 5,8 ^a	0,68
SAS sanitaire	17,8 ± 13,7 ^{ab}	0,05*
Réfrigérateur	21,4 ± 5,8 ^b	0,04*

EVOLUTION DU METABOLISME HEPATIQUE AU COURS DU GAVAGE ET IMPACT SUR LA FONTE LIPIDIQUE

**Lo Bara¹, Marty-Gasset Nathalie¹, Canlet Cécile², Tremblay-Franco Marie², Arroyo
Julien³, Molette Caroline¹, Viala Didier⁴, Chambon Christophe⁴, Bouillier-Oudot
Michel¹, Bonnefont Cécile MD¹**

¹ GenPhyse, Université de Toulouse, INRA, INPT, ENVT, 31326 CASTANET-TOLOSAN,

² Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-
Purpan, UPS, Toulouse, France

³ ASSELDOR, La Tour de Glane, 24420 COULAURES,

⁴ PFEM, Composante Protéomique, INRA de Theix, 63122 Saint Genès Champanelle
(France)

cecile.bonnefont@ensat.fr

RÉSUMÉ

Comprendre et maîtriser la variabilité du rendement technologique est un objectif important pour améliorer la qualité technologique du foie gras et assurer une meilleure valorisation du produit final. Dans cette optique, ce projet vise à étudier les mécanismes biologiques mis en place lors du développement de la stéatose hépatique au cours du gavage et leur variabilité en relation avec le rendement technologique des foies à la cuisson. Pour cela, 210 canards ont été gavés, 15 ont été abattus avant la mise en gavage (à J0), puis 30 tous les deux jours de J2 à J12. La teneur en lipides a été déterminée. Les métabolites polaires ont été analysés par RMN du proton, et les protéines par spectrométrie de masse. Cette étude a mis en évidence la transition entre la glycogénogenèse et la lipogenèse en début de gavage. Le rendement technologique est maximal après 11 repas de gavage (98% pour un poids de foie de 343 g), puis celui-ci diminue et sa variabilité augmente en parallèle du développement de la stéatose hépatique pour atteindre 72% pour des foies de 758 g après 23 repas de gavage. A partir du milieu du gavage, on observe une mise en place progressive de réponse au stress oxydatif dans le foie qui semble expliquer la diminution du rendement technologique.

ABSTRACT

Hepatic metabolism evolution during force-feeding and impact on the melting rate

The improvement of fatty liver quality, and then the best valorization of the product is a great objective of “foie gras” production. The aim of this study was to improve the knowledge on the variability of the melting rate to better manage it. Here, the biological mechanisms that occur during hepatic steatosis development and their variability linked to the melting rate were studied during the kinetic of the force-feeding period. 210 ducks were overfed. 15 were slaughtered before the force-feeding period (D0), then 30 ducks were slaughtered every 2 days from D2 to D12. The lipid content was determined. The hydrophilic metabolites were analyzed by ¹H-NMR and the proteins by mass spectrometry. This study showed the transition between the neoglycogenesis process and the lipogenetic process at the beginning of the force-feeding period. The technological yield was maximum after 11 meals of force-feeding (98% for liver weighing 343 g), then it decreased and its variability increased during the development of hepatic steatosis to achieve 72% for livers weighing 758 g after 23 meals of overfeeding. At mid overfeeding period, an oxidative stress response began that might explain the technological yield decrease.

INTRODUCTION

Le taux de fonte du foie gras à la cuisson ayant des répercussions à la fois sur les qualités organoleptiques des foies gras et sur les performances des unités de production, celui-ci a déjà été largement étudié (Théron et al., 2013). Des facteurs zootechniques et les conditions pré ou post mortem ainsi que des caractéristiques des foies ont été analysés pour mieux maîtriser la fonte, mais une variabilité persiste (Théron et al., 2012). L'objectif de l'essai présenté ici est de mieux comprendre la relation entre la variabilité de la fonte des foies à la cuisson et les caractéristiques des foies, en recherchant le moment où s'installe cette variabilité. Pour ce faire, les caractéristiques du foie ont été étudiées au cours de la cinétique de gavage.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Elevage et gavage des animaux

210 canards mulards mâles ont été élevés pendant 12 semaines à la Ferme Expérimentale de l'Oie et du Canard (FEOC, Coulaures, Dordogne) dans des conditions standards. Puis, ils ont été gavés deux fois par jour pour arriver à un total de 23 repas, avec une ration constituée de 38% de grains de maïs et de 62% de farine de maïs, additionnée de 3% du premix Provigav (Sanders).

1.2. Mesures, prélèvements et analyses

Avant la mise en gavage (à J0), quinze canards ont été abattus. Puis tous les deux jours de J2 à J12, 30 animaux ont été abattus, après 11 h de jeûne en moyenne.

Tous les animaux ont été pesés à la mise en gavage et avant leur abattage. Après l'éviscération des foies à chaud, des spectres ont été acquis dans le proche infra-rouge (SPIR, ASD Labspec Pro spectrometer). Leur couleur (L^* , a^* , b^*) a été déterminée avec le chromamètre CR 300 Minolta. Des prélèvements hépatiques ont été réalisés sur le milieu de la face externe du petit lobe et congelés dans de l'azote liquide, puis conservés à -80° . La teneur en lipides totaux (Folch et al., 1957) a été mesurée sur 65 échantillons, puis prédite sur l'ensemble des échantillons à partir des équations réalisées sur les spectres SPIR avec le logiciel Winisi (FOSS Analytical A/S). Les métabolites hydrophiles ont été extraits sur 166 échantillons (Beckonert et al., 2007) puis mesurés par RMN du proton (Bruker Avance III HD 600 MHz) à la plateforme MetaToul (Toulouse). Les protéines ont été extraites sur 140 échantillons puis mesurées par LC MS/MS (QTOF, IMPACTII, Bruker) à la plateforme PFEM (Clermont-Ferrand-Theix). Les foies dont le poids était supérieur à 300 g (seuil réglementaire pour la définition du foie gras de canard) ont été congelés à -20°C à la FEOC puis

transformés au LEGTA de Périgueux (Dordogne) afin de déterminer le rendement technologique.

A 6 h post mortem après refroidissement des carcasses, un muscle pectoral et une cuisse ont été disséqués et leurs poids ont été relevés.

Des tests de comparaison de moyenne (ANOVA avec la date d'abattage comme effet fixe) et des tests de comparaison de variance (Fisher) ont été réalisés et des corrélations de Pearson ont été calculées avec le logiciel R (version 3.2.3).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

La consommation totale d'aliment en gavage a été de 9,64 kg ce qui est équivalent à la consommation moyenne d'aliment en gavage (Litt et Pé, 2015). Les performances zootechniques sont synthétisées dans le tableau 1. Le poids à la mise en gavage est de 4,1 kg. Il est équivalent entre tous les lots. Le poids vif des canards augmente régulièrement au cours du gavage ($P < 0,001$). Il est multiplié par 1,6 après 23 repas de gavage. Ainsi, le gain de poids moyen sur la période est de $2\,357 \pm 336$ g. Les poids des organes de réserves (peau du muscle pectoral, gras abdominal et foie) augmentent fortement (respectivement multipliés par 2,5, 4,5 et 9,0) alors que ceux des muscles pectoraux sont stables jusqu'à J10 ($P > 0,05$).

L'évolution des caractéristiques des foies et les corrélations entre les paramètres sont présentées dans les tableaux 2 et 3. La croissance pondérale du foie correspond principalement à une augmentation de la teneur en lipides (corrélation de 0,86). Elle est fortement corrélée positivement à la luminance (L^* ; 0,84) et à l'indice de jaune (b^* ; 0,69). Le rendement technologique des foies à la cuisson est maximal à J6 avec 97,5 %, puis il diminue pour atteindre 87,9 % à J10 et 72,1 % à J12. Il est corrélé négativement avec la plupart des paramètres mesurés : -0,62 avec le poids de foie et la teneur en lipides.

L'étude par RMN du proton a permis de déterminer 112 buckets significatifs au cours du temps, les buckets qui ont pu être identifiés et associés à des métabolites sont présentés dans le tableau 4.

Les analyses protéomiques ont permis d'identifier 599 protéines présentes dans les échantillons de foie avec au moins 2 peptides. 312 de ces protéines ont un niveau d'expression qui varie significativement au cours du temps ($P < 0,01$).

Une analyse plus fine des résultats montre une augmentation conséquente du poids de foie entre J0 et J2 (+ 66 g/j ; 216 g en moyenne à J2) avec une augmentation maximale du taux de lipides (fois 3,1 ; 14,1% en moyenne à J2 ; Tableau 2) et une accumulation de glycogène (Tableau 4). La glycogénogenèse est la première voie de stockage de l'excès de glucose hépatique généré par une alimentation riche en amidon au cours du gavage (Baudonnet-Lenfant, 1993).

Ensuite entre J2 et J4, on observe un ralentissement de la croissance pondérale du foie (+ 20 g/j ; 256 g en

moyenne ; Tableau 2), une forte augmentation du taux de lipides (fois 2,1 ; Tableau 2) ainsi qu'une augmentation du glucose et une diminution du glycérol (Tableau 4). Cette réduction de la croissance hépatique correspond à une phase d'adaptation avec le fort développement des voies de synthèse lipidiques aux dépens des voies de la glycogénèse (Baudonnet-Lenfant, 1993). Puis la croissance pondérale du foie s'amplifie progressivement (+ 43,5 g/j entre J4 et J6, jusqu'à + 79,5 g/j entre J10 et J12 ; Tableau 2) avec une accumulation de lipides dans le foie qui représentent jusqu'à 56,2% de la matière sèche du foie (Tableau 2).

La comparaison de J0 et J12 en protéomique montre une amplification du métabolisme des acides gras avec 35 protéines impliquées (résultats IPA®, non montrés). L'évolution, au cours de la cinétique de gavage, du niveau d'expression de nombreux acides aminés met en évidence que le métabolisme cellulaire est exacerbé (Tableau 4). L'augmentation de la phosphocholine et de la glycérophosphocholine (Tableau 4) signe l'activation de la synthèse des membranes.

En ce qui concerne le rendement technologique des foies à la cuisson, il est maximal à J6 et sa variabilité augmente au cours du temps (Tableau 2 ; tests de Fisher $p < 0,05$; non montrés). En deçà de 550 g, la majorité des foies présente un rendement supérieur à 90% et le coefficient de variation est inférieur à 3% (Figure 1A). Au-delà, par contre, on observe rapidement des valeurs de rendement technologique inférieures à 80% et le coefficient de variation augmente fortement ; il dépasse les 17% pour des foies de poids supérieur à 700 g. Par ailleurs, il ne semble pas que le taux de lipides soit déterminant, car au-delà de 50% de lipides, il n'y a plus de relation entre le rendement technologique et le taux de lipides, le coefficient de variation pouvant atteindre 15,7 % (Figure 1B).

La diminution de la quantité du glutathion réduit jusqu'à J6 suivi de son augmentation jusqu'à la fin de la cinétique de gavage (J12 ; Tableau 4) marque

l'activation de la réponse au stress oxydatif à partir du milieu du gavage, en effet celui-ci joue un rôle dans le contrôle de la quantité d'espèces oxygénées activées et donc dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Les analyses protéomiques entre J0 et J12 montrent la modification entre le début et la fin du gavage de l'expression de 9 protéines impliquées dans le métabolisme du glutathion (G6PD, GSTK1, CTH, SOD1, GSTZ1, IDH1, GSTT1, GSTA1 et GSTA5) et de 7 protéines impliquées dans le stress oxydatif (SOD1, PDHA1, BPRDX4, HSD17B10, QDPR, GSTZ1 et RGN) (résultats IPA® non montrés). Ces résultats appuient nos études précédentes avec l'apparition de stress cellulaire et de phénomènes apoptotiques associés à une dégradation de la qualité technologique des foies (Théron et al., 2011 ; Awde et al., 2014 ; Bonnefont et al., 2014).

CONCLUSION

Après le 11^{ème} repas (J6), les foies dépassent le seuil réglementaire de 300 g pour être considéré comme un foie gras, leur teneur en lipides est de 42% et leur rendement technologique est maximal (98%). Jusqu'au 15^{ème} repas (J8), ce dernier reste très élevé (95%). Mais la prolongation du gavage se manifeste par une détérioration de ce paramètre associée à une augmentation du poids de foie ainsi qu'à l'apparition de stress oxydatif.

Il nous importe alors d'approfondir ces résultats pour savoir si certaines de ces modulations dans l'évolution de la croissance du foie ne correspondent pas à des étapes clés du métabolisme hépatique susceptibles d'amorcer chez certains animaux une saturation plus précoce des voies de la lipogénèse et conduisant en fin de gavage à un profil métabolique de stress cellulaire associé à une amplification des phénomènes apoptotiques sources de dégradation de la qualité technologique des foies et donc de leurs qualités organoleptiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Awde S., Marty-Gasset N., Prahkarnkao K., Rémignon H., 2014. JAFC, (62), 3262–3268.
- Baudonnet-Lenfant C., 1993. Thèse de doctorat INP Toulouse, pp170.
- Beckonert O., Keun HC., Ebbels TMD., Bundy J., Holmes E., Lindon JC., Nicholson JK., 2007. Nat. Protoc., (2), 2692-703.
- Bonnefont CMD., Guerra A., Théron L., Molette C., Canlet C., Fernandez X., 2014. Poult. Sci., (93), 1542-52.
- Folch J., Lees M., Sloane Stanley GH., 1957. J. Biol. Chem., (226), 497–509.
- Litt J. et Pé MP., 11^e JRA-JRFG, 25-26 mars 2015, Tours, 147-152.
- Marie-Etancelin C., Basso B., Davail S., Gontier K., Fernandez X., Vitezica ZG., Bastianelli D., Baéza E., Bernadet-MD., Guy G., Brun JM., Legarra A., 2011. J Anim Sci., (89), 669-679.
- Théron L., Fernandez X., Marty-Gasset N., Pichereaux C., Rossignol M., Chambon C., Viala D., Astruc T., Molette C., 2011. JAFC, (59), 12617-12628.
- Théron L., Cullere M., Bouillier-Oudot M., Manse H., Dalle Zotte A., Molette C., Fernandez X., Vitezica ZG., 2012. J Anim Sci., (90), 3312-3317.
- Théron L., Bouillier-Oudot M., Marie-Etancelin C., Bonnefont C., Fernandez X., Molette C., 2013. INRA Prod. Anim., (26,5), 415-424.

Tableau 1. Poids vif et composition corporelle de canards mulards au cours de la cinétique de gavage (moyenne $\pm$ ET ; n = 15 à J0 ; n = 30 aux autres dates).

	J0	J2	J4	J6	J8	J10	J12	p
Consommation	0	860 $\pm$ 44 ^f	2303 $\pm$ 157 ^e	4004 $\pm$ 219 ^d	5849 $\pm$ 217 ^c	7769 $\pm$ 218 ^b	9635 $\pm$ 219 ^a	***
Poids vif MEG	4137 $\pm$ 287	4130 $\pm$ 282	4151 $\pm$ 291	4142 $\pm$ 278	4140 $\pm$ 283	4142 $\pm$ 283	4138 $\pm$ 272	NS
Poids vif abattage	4140 $\pm$ 289 ^f	4655 $\pm$ 297 ^e	4920 $\pm$ 349 ^e	5258 $\pm$ 306 ^d	5713 $\pm$ 396 ^c	6048 $\pm$ 464 ^b	6495 $\pm$ 440 ^a	***
Poids saigné plumé	3654 $\pm$ 265 ^f	4154 $\pm$ 279 ^e	4321 $\pm$ 289 ^e	4702 $\pm$ 283 ^d	5054 $\pm$ 312 ^c	5359 $\pm$ 348 ^b	5748 $\pm$ 311 ^a	***
Poids carcasse		3334 $\pm$ 232 ^c	3349 $\pm$ 224 ^c	3489 $\pm$ 306 ^c	3754 $\pm$ 214 ^b	3871 $\pm$ 255 ^{ab}	4100 $\pm$ 228 ^a	***
Poids foie	84 $\pm$ 18 ^f	216 $\pm$ 25 ^e	256 $\pm$ 28 ^e	343 $\pm$ 39 ^d	458 $\pm$ 92 ^c	599 $\pm$ 101 ^b	758 $\pm$ 106 ^a	***
Poids gras abdominal	28 $\pm$ 12 ^f	44 $\pm$ 13 ^e	54 $\pm$ 16 ^e	71 $\pm$ 13 ^d	87 $\pm$ 16 ^c	109 $\pm$ 22 ^b	122 $\pm$ 19 ^a	***
Poids peau du muscle pectoral	74 $\pm$ 11 ^f	80 $\pm$ 15 ^f	98 $\pm$ 13 ^e	122 $\pm$ 12 ^d	145 $\pm$ 17 ^c	172 $\pm$ 22 ^b	184 $\pm$ 21 ^a	***
Poids muscle pectoral	267 $\pm$ 20 ^b	267 $\pm$ 23 ^b	270 $\pm$ 21 ^b	268 $\pm$ 22 ^b	273 $\pm$ 22 ^{ab}	283 $\pm$ 23 ^{ab}	289 $\pm$ 21 ^a	***
Poids cuisse	339 $\pm$ 28 ^d	361 $\pm$ 29 ^d	400 $\pm$ 38 ^c	399 $\pm$ 78 ^c	450 $\pm$ 35 ^b	468 $\pm$ 35 ^b	506 $\pm$ 41 ^a	***
Gain de poids		525 $\pm$ 118 ^f	769 $\pm$ 245 ^e	1116 $\pm$ 218 ^d	1573 $\pm$ 298 ^c	1906 $\pm$ 312 ^b	2357 $\pm$ 336 ^a	***
IC		1,75 $\pm$ 0,61 ^c	3,23 $\pm$ 0,81 ^b	3,71 $\pm$ 0,67 ^{ab}	3,84 $\pm$ 0,72 ^a	4,18 $\pm$ 0,68 ^a	4,17 $\pm$ 0,58 ^a	***
Pois foie / Consommation		251 $\pm$ 30 ^c	111 $\pm$ 10 ^b	86 $\pm$ 11 ^a	78 $\pm$ 15 ^a	77 $\pm$ 13 ^a	79 $\pm$ 11 ^a	***

*** p < 0,001

a,b,c,d,e Deux dates avec des exposants différents sont statistiquement différentes.

Tableau 2. Caractéristiques des foies de canards mulards au cours de la cinétique de gavage (moyenne $\pm$ ET ; n = 15 à J0 ; n = 30 aux autres dates). Les teneurs en lipides sont des valeurs prédites à partir des données des spectres mesurés dans le proche infra-rouge.

	J0	J2	J4	J6	J8	J10	J12	p
Poids (g)	84 $\pm$ 18 ^f	216 $\pm$ 25 ^e	256 $\pm$ 28 ^e	343 $\pm$ 39 ^d	458 $\pm$ 92 ^c	599 $\pm$ 101 ^b	758 $\pm$ 106 ^a	***
Teneur en lipides (%)	4,60 $\pm$ 1,37 ^e	14,12 $\pm$ 2,18 ^f	29,41 $\pm$ 4,82 ^e	41,75 $\pm$ 4,41 ^d	48,54 $\pm$ 4,10 ^c	52,60 $\pm$ 3,15 ^b	56,21 $\pm$ 3,55 ^a	***
Rendement technologique (%)				98 $\pm$ 1 ^a	95 $\pm$ 4 ^a	88 $\pm$ 7 ^b	72 $\pm$ 11 ^c	***
L*	35 $\pm$ 2 ^e	49 $\pm$ 2 ^d	55 $\pm$ 3 ^c	56 $\pm$ 2 ^c	60 $\pm$ 3 ^b	63 $\pm$ 2 ^a	65 $\pm$ 3 ^a	***
a*	13 $\pm$ 1 ^d	20 $\pm$ 2 ^a	18 $\pm$ 2 ^b	17 $\pm$ 2 ^b	15 $\pm$ 2 ^c	12 $\pm$ 1 ^d	10 $\pm$ 2 ^e	***
b*	10 $\pm$ 1 ^e	22 $\pm$ 2 ^d	28 $\pm$ 3 ^c	31 $\pm$ 3 ^b	32 $\pm$ 3 ^{ab}	34 $\pm$ 3 ^a	34 $\pm$ 4 ^a	***

*** p < 0,001

a,b,c,d,e,f Deux dates avec des exposants différents sont statistiquement différentes.

Tableau 3. Corrélations entre la consommation en gavage, poids vif à l'abattage, poids du gras abdominal et les caractéristiques des foies (n=195).

	Consommation en gavage	Poids vif abattage	Poids gras abdominal	Foie Poids	Foie Rendement	Foie MS	Foie Lip	Foie MM ^y	Foie L*	Foie a*	Foie b*
Consommation	1,00	0,88	0,87	0,94	-0,77	0,92	0,92	-0,84	0,84	-0,69	0,76
Poids vif abattage		1,00	0,86	0,90	-0,73	0,81	0,82	-0,78	0,79	-0,58	0,65
Poids gras abdominal			1,00	0,84	-0,66	0,81	0,82	-0,79	0,76	-0,58	0,69
Foie Poids				1,00	-0,84	0,86	0,86	-0,80	0,84	-0,68	0,69
Foie Rendement					1,00	-0,62	-0,62	0,58	-0,59	0,67	-0,41
Foie MS						1,00	0,99	-0,87	0,89	-0,52	0,86
Foie Lip							1,00	-0,87	0,90	-0,55	0,87
Foie MM ^y								1,00	-0,82	0,23	-0,80
Foie L*									1,00	-0,51	0,89
Foie a*										1,00	-0,32
Foie b*											1,00

^y Les MM ont été mesurées sur 65 échantillons représentatifs de l'ensemble des données.

Tableau 4. Liste des métabolites différentiels entre deux dates d'abattage. Les métabolites en vert augmentent au cours du temps alors que les métabolites en rouge diminuent.

Intervalles abattage	2 jours						4 jours					6 jours				8 jours				10 jours			12 jours	
Métabolites	J0-J2	J2-J4	J4-J6	J6-J8	J8-J10	J10-J12	J0-J4	J2-J6	J4-J8	J6-J10	J8-J12	J0-J6	J2-J8	J4-J10	J6-J12	J0-J8	J2-J10	J4-J12	J0-J10	J2-J12	J0-J12			
Isoleucine							+	+				+				+	+		+	+	+			
Lactate	+						+			+	+	+			+	+	+	+	+	+	+			
Alanine							+								+	+		+	+	+	+			
Thréonine	+						+			+	+				+	+	+	+	+	+	+			
Lysine							+								+	+		+	+	+	+			
Glutamine	+						+												+		+			
Creatine							+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Phosphocreatine							+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Phosphocholine	+			+			+	-		+				+	+	+	+	+	+	+	+			
Glycogène	+		+				+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Serine	+	+					+	+				+	+	+		+	+	+	+		+			
Glycérophosphocholine	-							+					+				+			+				
Choline	-						-					-				-			-		-			
Glucose	-	+		-			+	-	-	-	-	-		-	-	-		-	-	-	-			
Bétaïne	-								-			-		-		-	-	-	-	-	-			
TMAO	-								-			-		-		-		-	-		-			
Taurine	-								-			-		-		-		-	-		-			
Myoinositol	-								-			-		-		-		-	-		-			
Uridine									-							-			-	-	-			
AMP			-				-	-	-			-	-	-		-	-	-	-	-	-			
IMP			-				-	-	-			-	-	-		-	-	-	-	-	-			
ADP			-				-	-	-			-	-	-		-	-	-	-	-	-			
Proline							-	-	-			-	-	-		-	-		-	-	-			
Glutamate		-					-	-	-			-	-	-		-	-		-	-	-			
Glutathione réduit	-		-				-	-		+	+	-			+	-			-		-			
Succinate			+				-	+	+			-	-	+		-	-		-	-	-			
Glycine		-	+	-			-			-		-			-	-	-		-		-			
Glycérol		-	+	-			-			-		-			-	-		-			-			

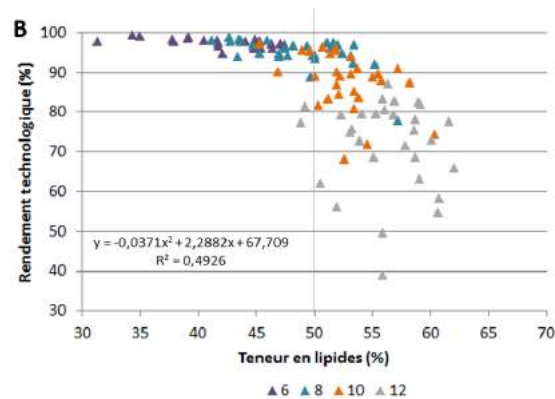
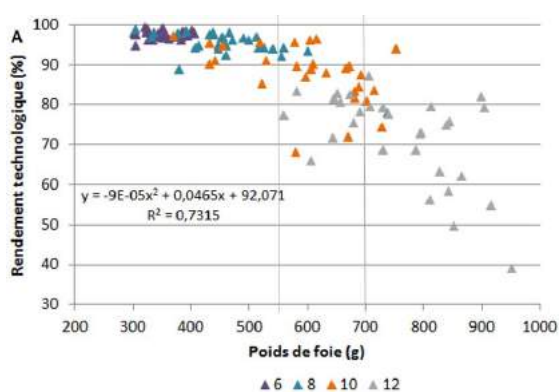


Figure 1. Evolution du rendement technologique des foies à la cuisson en fonction du poids de foie (A) et en fonction du taux de lipides des foies (B).

SESSION
HYGIENE ET QUALITE
DES PRODUITS

Posters

LOGICIEL DE SUIVI DES CONSOMMATIONS D'ANTIBIOTIQUES EN ÉLEVAGE DE VOLAILLES.

Yohan PIEL¹, Ghislaine EDDARAI¹, Sophie LAGADEC-PELLE¹, Virginie
DELANNOY¹, Nathalie CAPDEVIELLE²

¹SANDERS BRETAGNE - BP 61 Saint Gérard, 56300 Pontivy,

²Ceva Santé Animale S.A - 10, av. de la Ballastière, CS 30126, 33501 Libourne
nathalie.capdevielle@ceva.com

RÉSUMÉ

Dans le cadre de l'usage raisonné des antibiotiques, le suivi des consommations est une étape indispensable pour avoir une meilleure connaissance des pratiques, des niveaux de consommation et ensuite mettre en œuvre des mesures d'amélioration et les évaluer.

C'est dans cet objectif, qu'un logiciel de suivi des consommations a été conçu et développé par la société DBM. C'est un outil de suivi innovant qui assiste l'éleveur dans une démarche de gestion durable de la santé de ses animaux. Ce logiciel de pilotage est utilisable par l'éleveur et son vétérinaire : il permet de mesurer et de valoriser les actions communes mises en place pour réduire l'utilisation des antibiotiques, de comparer les évolutions par production, filière ou éleveurs, en se comparant aux résultats de l'ensemble des élevages suivis mais aussi aux indicateurs de référence français (Rapport de suivi annuel Anses, enquêtes RefA²vi de l'ITAVI), ou européens (ESVAC).

Par l'intermédiaire d'une base de données, ce logiciel extrait informatiquement et met en corrélation, les données de production d'une part, et les données de prescriptions de vétérinaires volontaires ou d'éleveurs d'autre part. A partir des données de consommation de médicaments et des méthodes de calculs officielles, un calcul de suivi de consommation d'antibiotiques est réalisé afin de visualiser les indicateurs officiels français et européens (mg/kg, ALEA - Animal Level of Exposure to Antimicrobials, DDDvet - Defined Daily Dose for animals, DCDvet - Defined Course Dose for animals) pour chaque trimestre ou chaque lot d'animaux.

La consultation et le suivi de ces indicateurs se fait de façon très rapide, quasiment en temps réel, au travers d'un site internet dédié, accessible uniquement aux éleveurs référencés et aux vétérinaires volontaires. Pour l'éleveur et son vétérinaire, ce logiciel est un outil de "diagnostic" réactif et d'aide à la décision qui permet un suivi personnalisé des consommations d'antibiotiques avec détermination d'objectifs chiffrés et mesure des actions mises en place. Il doit aussi permettre de valoriser les efforts réalisés auprès des filières et partenaires aval.

ABSTRACT

Software for monitoring of antibiotics consumptions in poultry breeding.

In the context of reasonable use of antibiotics, monitoring consumption is an indispensable step to have a better knowledge of practices, consumption levels in order to implement improvement actions and evaluate them. In this perspective, software for consumptions monitoring has been developed by the company DBM. It is an innovative follow-up tool that helps the breeder in an animal health sustainable management approach. This software can be used by the breeder and the veterinarian: it measures and assesses joint actions set up to reduce the use of antibiotics, compares the evolutions by production, sectors or breeders in relation to the results of all livestock monitored and also to French reference indicators (annual follow-up by ANSES and RefA²vi study by ITAVI) or European (ESVAC).

Through a database, the software collects production data on the one hand and prescription data from voluntary veterinarians or breeder declaration on the other. From the basis of medicine consumption data and official calculation methods, antibiotic consumption is calculated in order to see French and European official indicators (mg/kg, ALEA - Animal Level of Exposure to Antimicrobials, DDDvet - Defined Daily Dose for animals, DCDvet - Defined Course Dose for animals) for each quarter or each animal group. The consultation and follow-up of these indicators can be done very quickly by a web page accessed only by referenced breeders and voluntary veterinarians. For the breeder and his veterinarian, the software is a tool that enables a reactive "diagnosis" and that helps to make a decision. It makes a personalized follow-up of antibiotic consumption with target figure setting and measurement of conducted actions. The software shows the efforts carried out by the breeders and veterinarians to their partners and networks.

INTRODUCTION

Le phénomène d'antibiorésistance est devenu un sujet d'actualité majeur depuis une dizaine d'années tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire, ce qui a débouché en France sur le plan " EcoAntibio 2017 ". Depuis 1999, l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (ANMV) et l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) publient chaque année un rapport de suivi des ventes d'antimicrobiens vétérinaires (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, 2015) basé sur une déclaration annuelle des laboratoires pharmaceutiques des ventes d'antibiotiques en France. Il constitue la référence nationale exhaustive sur l'utilisation des antibiotiques et permet d'avoir un suivi et une tendance d'évolution globale annuelle par espèce en mg/kg ou ALEA.

Parallèlement, les instituts techniques et les interprofessions (CLIPP, INAPORC, IFIP, ITAVI) publient régulièrement pour chaque production un suivi plus détaillé de l'utilisation des antibiotiques à partir de panels d'éleveurs. Ce suivi est le plus fin et représentatif de l'utilisation des antibiotiques en élevage (en indicateur d'exposition ALEA - Animal Level of Exposure to Antimicrobials, mg/kg, Index de Fréquence des Traitements par les Antibiotiques IFTA). Mais ce suivi n'est à ce jour pas généralisable et le temps de récupération et d'analyse des données l'empêche d'en faire un outil exploitable dans les élevages ou les filières pour réduire les utilisations d'antibiotiques. (Chauvin et al., 2012).

L'Agence Européenne des Médicaments (EMA) a été missionnée par la commission européenne pour bâtir le projet ESVAC (European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption), dont le but est d'harmoniser le suivi des utilisations d'antibiotiques dans les pays membres de l'Union Européenne. L'ESVAC a défini des indicateurs de suivi officiels, exploitables et standardisés, et vise à récupérer et publier les consommations d'antibiotiques sous cette forme pour tous les pays européens en 2020.

Le grand public a également pris conscience de cette problématique et est de plus en plus exigeant sur la qualité des produits issus des productions animales (Ifop, 2014).

Les éleveurs sont aussi sensibilisés depuis une quinzaine d'années à limiter l'utilisation des antibiotiques, et à mettre en avant leur engagement et leurs efforts. INDICAVET s'intègre dans cette démarche d'usage raisonné et a été développé pour mesurer et objectiver les résultats obtenus, et encourager et valoriser le travail quotidien des producteurs français pour limiter l'usage des antibiotiques.

1. 1. PRÉSENTATION DE L'OUTIL

Ce logiciel est un outil de suivi des consommations d'antibiotiques à l'échelle de l'élevage, d'une filière ou d'une production. A partir des données brutes récoltées de manière sécurisée et confidentielle, le logiciel fournit un suivi de l'utilisation des antibiotiques dans les élevages de chaque filière inclus dans le dispositif. Les données recueillies sont les prescriptions des vétérinaires volontaires, les déclarations d'éleveurs dont le cahier des charges les y engage et les données de productions des groupements ou des éleveurs indépendants.

Le logiciel permet un suivi en mg/kg, ALEA, DDDvet et DCDvet de façon

- **objective** (réalisé par un organisme externe à partir de données brutes)
- **fiable et automatique** (les données sont exportées directement à partir des vétérinaires prescripteurs volontaires pour limiter les erreurs de saisies ou directement auprès des éleveurs qui s'y engagent et des groupements de producteurs)
- **généralisable** (les données brutes sont récupérées puis harmonisées pour les rendre exploitables quelles que soient les sources)
- **officielle** (à partir des méthodes de calculs de l'ANSES et des tables de l'ANMV ou de l'ESVAC)
- **comparable** (mêmes méthodes que les références nationales et européennes et pour chaque espèce)
- **réactive** (un suivi en temps réel avec un résultat trimestriel et par lot, exploitable directement dans chaque élevage suivi et chaque espèce).

Une version de démonstration est disponible sur le site <https://INDICAVET.dbm-vi.eu>.

2. UTILISATIONS DU LOGICIEL

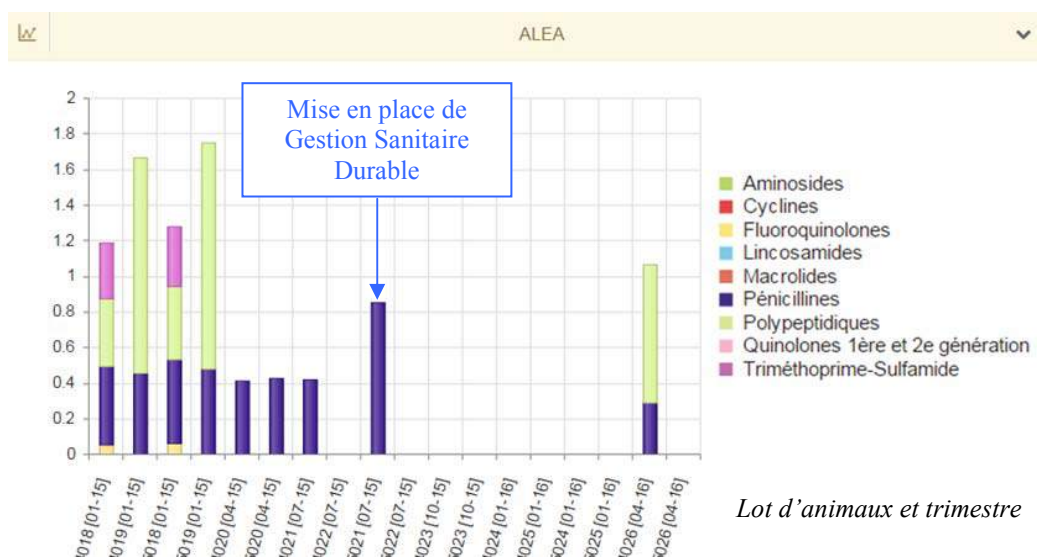
Ce logiciel est un outil innovant de diagnostic de l'efficacité des mesures mises en place, d'aide à la décision et de gestion durable de la santé des animaux d'élevage dans l'objectif d'une réduction

du recours aux antibiotiques. Il est utilisable par l'éleveur et son vétérinaire et par les responsables des filières ou productions.

Il offre un suivi trimestriel et par lot de l'utilisation des antibiotiques, permettant de fixer des objectifs chiffrés de réduction d'utilisation des antibiotiques pour chaque filière, production, et élevage. A

l'échelle d'un élevage, ce logiciel est un véritable outil de pilotage pour l'éleveur et son vétérinaire, afin de se comparer, de fixer un objectif de réduction chiffré, de mettre en place des actions correctives et de mesurer l'effet de ces actions sur l'utilisation des antibiotiques (figure 1).

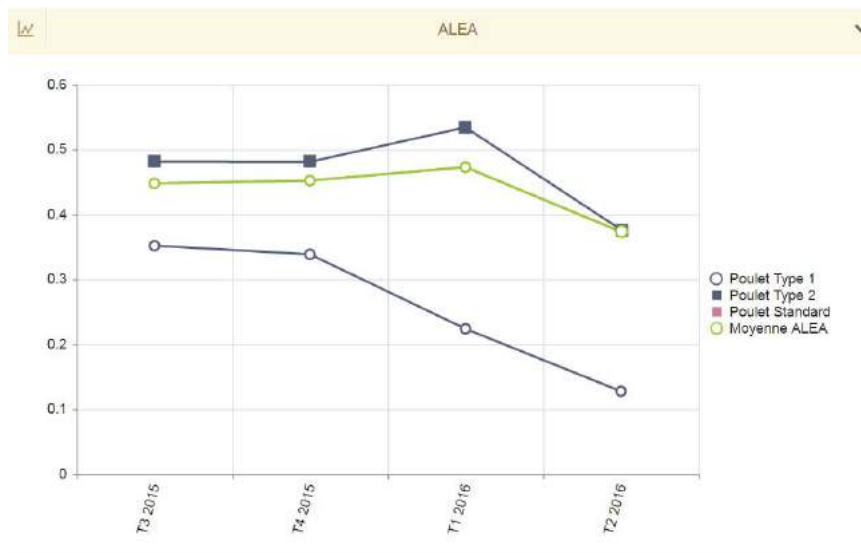
Figure 1. Exemple de suivi des mesures de Gestion Sanitaire Durable dans un élevage de volaille, par lot et par trimestre



Le logiciel permet de mesurer les actions de Gestion Sanitaire Durable entreprises à l'échelle des productions, des filières et des élevages et de répondre à certains cahiers des charges. Il offre un classement des élevages pour un travail accru dans les cas les plus utilisateurs, et une valorisation du travail accompli dans les élevages les plus faibles utilisateurs. Le logiciel propose aussi une comparaison par rapport aux moyennes nationales

et européennes, et une comparaison des différentes productions, types d'élevages et filières (figure 2). L'outil rend aussi possible un calcul des impacts de différents facteurs sur l'utilisation des antibiotiques (génétique, type d'élevage, vaccins, alternatives aux antibiotiques, etc), et le suivi spécifique de certains antibiotiques (fluoroquinolones, colistine, macrolides...) et mise en place d'objectifs de réductions.

Figure 2. Exemple de suivi deux filières de poulet de chair par trimestre



Aujourd'hui, le logiciel offre un suivi de 190 élevages de porcs, plus de 270 élevages de volailles de chair, plus d'une centaine d'élevages de poules pondeuses et 35 élevages de lapins sur les entreprises Sanders Bretagne et Sanders Ouest. Cela en fait aujourd'hui le plus important référentiel multi-espèces de consommation d'antibiotiques en France. Un plan est actuellement en cours de déploiement au niveau national afin d'élargir cette base de référencement et massifier encore les données collectées.

CONCLUSION

Ce logiciel est un outil de suivi innovant qui assiste l'éleveur dans une démarche de gestion durable de

la santé de ses animaux. Il complète les suivis exhaustifs de références de l'ANSES-ANMV et les initiatives interprofessionnelles de suivis détaillés de panels d'éleveurs. L'objectivité, les indicateurs officiels, l'automatisation et la généralisation possible à grande échelle permettent d'en faire un outil de pilotage utilisable par l'éleveur, son vétérinaire et les responsables de productions dans un objectif de réduction de l'utilisation des antibiotiques. Grâce à ce logiciel, Sanders peut mettre en place et mesurer les actions de Gestion Sanitaire Durable à l'échelle de ses filières.

Ce logiciel permet également d'encourager et valoriser les pratiques vertueuses, et ainsi répondre aux attentes sociétales actuelles notamment sur la problématique de l'antibiorésistance.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), 2015. Suivi des ventes d'antibiotiques vétérinaires. <https://www.anses.fr/fr/content/suivi-des-ventes-dantibiotiques-veterinaires>.

Chauvin C., Le Bouquin S., Sanders P., 2012. Usage des antibiotiques en filières porcine, avicole et cunicole en France. Résultats d'enquêtes. Bulletin épidémiologique santé animale - alimentation, pp.12-15.

European Medicines Agency (EMA), 2016. European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC). http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document_listing/document_listing_000302.jsp&mid=WC0b01ac0580153a00.

Institut Français d'Opinion Publique (IFOP), 2014. Palmarès des critères d'achat de la viande et attentes à l'égard du rayon boucherie de la grande distribution. http://www.ifop.com/?option=com_publication&type=poll&id=2693.

Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, 2013. EcoAntibio. <http://agriculture.gouv.fr/plan-ecoantibio-2012-2017-lutte-contre-lantibioresistance>

ACCUMULATION D' α -HEXABROMOCYCLODODECANE (α -HBCD) DANS LES TISSUS DE POULETS A CROISSANCE RAPIDE OU LENTE

Jondreville Catherine¹, Travel Angélique², Méda Bertrand³, Dominguez-Romero Elena^{1,2,3}, Cariou Ronan⁴, Dervilly-Pinel Gaud⁴, Le Bizec Bruno⁴, Baéza Elisabeth³

¹AFPA, INRA, Université de Lorraine - 54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY,

²ITAVI, UMT BIRD - 37380 NOUZILLY,

³URA, INRA - 37380 NOUZILLY,

⁴LABERCA, LUNAM Université, Oniris, INRA – 44307 NANTES CEDEX

catherine.jondreville@inra.fr

RÉSUMÉ

Le but de la présente étude était de décrire le devenir de l' α -hexabromocyclododécane (α -HBCD) ingéré dans les tissus des poulets de chair à croissance rapide (R) et à croissance lente (L), par exposition à un aliment contenant 40 ng α -HBCD/g pendant respectivement 42 et 84 jours. Les paramètres d'élimination ont été estimés chez les poulets L successivement exposés puis décontaminés pendant 42 jours. À la fin de l'expérimentation, les poulets L avaient ingéré plus d'aliment que les poulets R (+42%) pour une efficacité alimentaire réduite de 34%. À l'âge commercial d'abattage, le poids de matière grasse (MG, g) dans les muscles des cuisses et pilons était presque deux fois plus élevé chez les poulets L que chez les poulets R, alors que leurs filets en contenaient environ deux fois moins. Indépendamment de la souche, le gras abdominal était le tissu le plus concentré en α -HBCD (ng/g MG), suivi des muscles de la cuisse et du pilon puis du filet. Les ratios d'accumulation de l' α -HBCD étaient légèrement plus élevés chez les poulets L que chez les poulets R (6,7 vs. 5,2 ; 2,1 vs. 2,2 et 9,9 vs. 8,4 respectivement dans les muscles de la cuisse et du pilon, le filet et le gras abdominal). Les demi-vies d'élimination chez les poulets L dans ces tissus étaient respectivement de 20, 12 et 19 jours. La dilution par la croissance contribuait pour environ 50% à cette diminution de la concentration en période de décontamination.

ABSTRACT

Accumulation of α -hexabromocyclododecane (α -HBCD) in tissues of fast- and slow-growing broilers

The aim of the current study was to describe the fate of ingested α -hexabromocyclododecane (α -HBCD) in fast-growing (FG) and slow-growing (SG) broilers, through an exposure to a dietary concentration of 40 ng α -HBCD g⁻¹ feed during 42 and 84 days, respectively. Depuration parameters were assessed in SG broilers successively exposed during 42 days and depurated during 42 days. At market age, SG broilers had ingested 42% more feed than FG broilers for a feed efficiency 34% lower. At market age, the leg muscles of SG broilers contained almost twice as much fat as those of FG broilers and their breast muscle about half as much. Irrespective of the strain, abdominal fat displayed the highest α -HBCD concentration on a lipid weight basis, followed by leg muscles and then breast muscle. The accumulation ratios of α -HBCD were slightly higher in SG than in FG broilers (6.7 vs. 5.2, 2.1 vs. 2.2, and 9.9 vs. 8.4 in leg muscles, breast muscle and abdominal fat, respectively). The elimination half-lives in SG broilers were 20, 12 and 19 days in leg muscle, breast muscle and abdominal fat, respectively, to which dilution through growth contributed for around 50%.

INTRODUCTION

L'hexabromocyclododécane (HBCD) est un retardateur de flamme bromé utilisé comme additif pour ignifuger les textiles et les isolants de construction, en particulier les polystyrènes, qui constituent 80% de ses usages en Europe (ECHA, 2009). En raison de sa persistance, de sa bioaccumulation et de sa toxicité, l'HBCD figure à l'annexe A de la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants (POP). Bien que les mélanges techniques utilisés comme additifs soient composés à plus de 75% d'isomère γ , l'isomère α prédomine dans les tissus animaux, avec une proportion augmentant le long de la chaîne trophique pour atteindre près de 100% à son sommet (Koch et al., 2015). Cette modification du profil est généralement attribuée à la transformation des isomères γ et β en isomère α dans des milieux biotiques et abiotiques, ainsi qu'à la plus grande persistance de l'isomère α , sa demi-vie d'élimination étant de l'ordre de 5 à 7 fois plus longue que celle des autres isomères (Koch et al., 2015).

Cependant, le degré d'isomérisation de l'isomère γ en isomère α est trop faible pour expliquer la prédominance de l' α -HBCD dans les produits issus d'animaux exposés à un mélange technique. En particulier, bien que la concentration d'HBCD dans les denrées alimentaires d'origine animale soit généralement inférieure à 1 ng/g de matière grasse (MG) (EFSA, 2011), les plans de surveillance français ont révélé des concentrations pouvant parfois atteindre 3000 ng/g MG, principalement sous forme d' α -HBCD (DGAL, 2009). Cariou et al. (2014) ont identifié des matériaux d'isolation à base de polystyrène extrudé (XPS) comme de possibles sources d'exposition des volailles dans les bâtiments d'élevage et Dominguez-Romero et al. (2016) ont estimé que des poules ingérant quotidiennement 3,2 mm³ de XPS pondraient des œufs contenant 3000 ng d'HBCD/g MG. Dans cette étude, les poules étaient exposées à des aliments contenant 40 ng d' α -HBCD/g. À la fin de la période d'exposition de 18 semaines, 19% de l' α -HBCD ingéré avaient été éliminés via la ponte et 19% étaient stockés dans les tissus corporels, principalement les tissus adipeux, avec une concentration dans le gras abdominal, exprimée en ng/g MG, 9,2 fois plus élevée que dans l'aliment (en ng/g). Selon le modèle de MacLachlan et al. (2010), les tissus des poulets à croissance rapide (R) soumis à la même concentration alimentaire d' α -HBCD seraient environ deux fois plus concentrés que ceux des poules pondeuses, principalement en raison : 1. de l'absence de ponte comme voie d'élimination et 2. de l'affinité relative plus élevée du contaminant pour les tissus due à la concentration de lipides sanguins de 4 à 5 fois inférieure. En plus des poulets à croissance rapide, les consommateurs demandent des produits provenant de systèmes alternatifs tels que les systèmes biologiques ou Label, impliquant des

animaux à croissance lente (L) élevés pendant au moins 80 jours et présentant une efficacité alimentaire réduite et des dépôts de lipides tissulaires différents (Quentin et al., 2003). L'impact de la croissance lente et de l'augmentation de l'apport alimentaire sur l'accumulation d' α -HBCD dans les tissus mérite d'être exploré. Le but de cette étude est d'évaluer la demi-vie et l'accumulation de l' α -HBCD dans les tissus des poulets R et L élevés respectivement pendant 6 et 12 semaines.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Aliments

Les aliments expérimentaux, à base de maïs, de blé et de tourteau de soja, permettaient de couvrir les besoins nutritionnels des poulets. Les poulets R ont reçu un aliment de type croissance pendant 6 semaines et les poulets L ont reçu un aliment démarrage jusqu'à 3 semaines d'âge puis un aliment croissance jusqu'à 12 semaines. La concentration cible de 40 ng α -HBCD/g d'aliment a été choisie de façon à obtenir des niveaux de contamination des muscles de l'ordre de plusieurs centaines de ng/g MG. Les aliments contaminés ont été obtenus en remplaçant 5 g d'huile de soja non contaminée des aliments témoins par 5 g d'huile de soja artificiellement contaminée. La préparation de l'huile contaminée a nécessité une opération préalable de transformation du γ -HBCD en α -HBCD par un traitement thermique (172 °C, 6 h) puis une purification du produit carbonisé. Les cristaux obtenus, contenant en moyenne 99,3% d' α -HBCD, ont ensuite été dissous dans de l'acétone et ajoutés dans l'huile de soja. Les aliments ont été granulés (2,5 mm).

1.2. Animaux et conduite expérimentale

L'expérimentation a été conduite au PEAT (INRA, Nouzilly) dans des locaux agréés (agrément n° C37-175-1), selon un protocole approuvé par le CEEA Val de Loire. Des poulets mâles d'un jour ont été utilisés : 29 poulets R (Ross PM3, pesant 48,7±0,1 g, moyenne± SE) et 50 poulets L (JA657, pesant 42,5±0,3 g). Dix poussins d'un jour de chaque souche ont été abattus comme témoins. Les autres ont été élevés en cages individuelles jusqu'à la fin de l'expérience. Tous ont été vaccinés contre les maladies de Marek et Gumboro et la bronchite infectieuse. Quinze poulets R ont reçu l'aliment contaminé et ont été abattus par groupes de 4 à 7 animaux à l'âge de 2, 4 ou 6 semaines. Les 4 autres poulets R ont reçu l'aliment témoin jusqu'à l'âge de 6 semaines. Trente-quatre poulets L ont reçu l'aliment contaminé pendant 12 semaines ou 6 semaines suivies de 6 semaines de décontamination au moyen de l'aliment témoin. Ils ont été abattus par groupes de 4 ou 5 animaux après 3, 6, 9 ou 12 semaines d'exposition ou après 6 semaines d'exposition suivies de 1, 2, 4 ou 6 semaines de décontamination. Les 6 poulets L restants ont reçu l'aliment témoin et ont été

abattus après 6 ou 12 semaines d'élevage. Les poulets âgés d'un jour ont été abattus par dislocation cervicale et les plus âgés par électronarcose puis exsanguination, après un jeûne de 12 heures. Les conditions de température et de lumière étaient conformes à l'Arrêté du 28 juin 2010 établissant les normes minimales relatives à la protection des poulets destinés à la production de viande. L'aliment a été distribué une fois par jour, selon les spécifications des sélectionneurs. L'eau était disponible à volonté.

La quantité d'aliment ingérée par chaque poulet et son poids vif (PV) ont été enregistrés chaque semaine. Chaque aliment a été échantillonné chaque semaine et conservé à +4 °C. Un échantillon composite a été utilisé pour les analyses. Juste après l'abattage, tous les muscles d'une cuisse et d'un pilon, y compris le gras intermusculaire, un filet (*Pectoralis major*) et le gras abdominal ont été prélevés et pesés, puis conservés à -18 °C.

1.3. Analyses chimiques

Les isomères α -, β - et γ -HBCD ont été dosés dans l'aliment et les tissus. Après lyophilisation, la matière grasse a été extraite par un mélange de solvants organiques toluène/acétone 70:30 (v/v), sous pression (100 bars) et à chaud (120 °C). L'extrait a ensuite été purifié au moyen d'une colonne d'extraction sur phase solide contenant de la silice acide, puis par partition liquide/liquide entre hexane et soude 1 N. Les concentrations des 3 isomères d'HBCD ont été déterminées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), selon une méthode validée et accréditée (norme ISO 17025), la quantification des molécules reposant sur le principe de dilution isotopique. Le seuil de quantification (statistiquement significatif) a été déterminé en tenant compte du niveau de contamination procédurale rencontré pour ce type de molécule (blancs d'analyses systématiquement contaminés). La concentration de MG dans le gras abdominal a été déterminée par gravimétrie après l'étape d'extraction de la matière grasse de l'analyse de l'HBCD et selon la méthode au chloroforme/méthanol décrite par Folch et al. (1957) dans les muscles.

1.4. Calculs et analyses statistiques

La quantité d'aliment ingéré cumulée (AI, g), le gain de poids cumulé et l'indice de consommation (IC) ont été calculés individuellement chaque semaine. Afin de faciliter la comparaison des deux souches, la quantité d' α -HBCD ingérée par les poulets L ainsi que la concentration d' α -HBCD dans leurs tissus ont été standardisées pour un aliment présentant une concentration d' α -HBCD égale à celle de l'aliment distribué aux poulets R. Le ratio d'accumulation (RA) de l' α -HBCD dans les différents tissus au poids commercial d'abattage a été calculé comme le rapport de la concentration d' α -HBCD dans le tissu (ng/g MG) sur sa concentration dans l'aliment (ng/g). Les analyses statistiques ont été conduites comme décrit par Dominguez-Romero et al. (2016) au moyen du

logiciel SAS. Dans un premier temps, l'absence d'effet de l'exposition à l' α -HBCD sur les performances de croissance, ainsi que le poids et la teneur en MG des tissus a été vérifiée pour chaque souche au moyen d'une procédure GLM (résultats non présentés). Les animaux témoins ont été exclus des analyses suivantes. Pour chaque souche, les concentrations d' α -HBCD dans les tissus (ng/g MG) ont été analysées selon la procédure MIXED. Le modèle incluait le tissu en mesures répétées afin de tenir compte de la corrélation entre les tissus d'un même poulet, le traitement, qui correspond à la durée d'exposition pour les poulets R (n=3) et aux durées d'exposition et de décontamination combinées pour les poulets L (n=8), et l'interaction entre le tissu et le traitement. Les RA dans les tissus des deux souches à l'âge d'abattage ont ensuite été comparés selon un modèle équivalent, en remplaçant le traitement par la souche.

Afin de tenir compte de la croissance dans le processus de diminution de la concentration d'HBCD dans les tissus des poulets L en période de décontamination, la constante cinétique de dépôt de lipides (k_{glip} , j^{-1}) a été soustraite à la constante cinétique d'élimination globale (k , j^{-1}) pour donner la constante cinétique d'élimination (k_d) (OCDE, 2012). La constante cinétique du dépôt de lipides a été estimée à partir des quantités de lipides présents dans chaque tissu ($\text{lip}_{\text{tissu}}$, g) selon une régression linéaire de la forme suivante : $\ln(\text{lip}_{\text{tissu}}) = a + k_{\text{glip}} \times t$ où t est la durée de décontamination (j). La constante cinétique d'élimination globale a été estimée à partir de la concentration d' α -HBCD dans chaque tissu (C_{tissu} , ng/g MG) selon une régression linéaire de la forme suivante : $\ln(C_{\text{tissu}}) = b + k \times t$ où t est la durée de décontamination (j). Les demi-vies globale et corrigée du dépôt de lipides ont été calculées comme respectivement $\ln(2)/k$ et $\ln(2)/k_d$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Conformément aux attentes, les aliments témoins étaient exempts d'HBCD et les aliments contaminés exempts de β - et de γ -HBCD (<0,03 ng/g). Les concentrations d' α -HBCD dans les aliments contaminés étaient de respectivement 37,2 et 38,7 ng/g pour l'aliment démarrage et l'aliment croissance-finition fournis aux poulets L et de 35,7 ng/g pour l'aliment fourni aux poulets R.

2.1. Performances et caractéristiques des tissus

Conformément aux attentes, le PV des poulets L à 12 semaines (2616 ± 20 g) était de 7% inférieur à celui des poulets R à 6 semaines (2810 ± 44 g). Dans le même temps, les poulets L avaient ingéré 42% de plus d'aliment que les poulets R (6543 ± 14 vs. 4609 ± 55 g), pour un IC supérieur de 53% ($2,54 \pm 0,02$ vs. $1,67 \pm 0,02$). A l'âge commercial d'abattage, la concentration de MG dans les muscles des cuisses et pilons des poulets L était plus élevée que celle des poulets R ($52,5 \pm 6,3$ vs. $31,0 \pm 3,3$ g/kg), alors que les

filets présentait la même teneur en MG ($13,1 \pm 1,2$ vs. $13,2 \pm 0,9$ g/kg) (Tableau 1). La quantité totale de lipides déposés dans les muscles des cuisses et pilons était plus élevée chez les poulets L que chez les poulets R ($19,9 \pm 2,4$ vs. $10,2 \pm 1,3$ g), alors que le contraire était observé pour le filet ($3,8 \pm 0,2$ vs. $6,8 \pm 0,5$ g). Le poids de lipides déposé dans le gras abdominal était plus élevé chez les poulets R ($40,4 \pm 2,5$ g) que chez les poulets L ($34,2 \pm 3,8$ g).

2.2. Accumulation d' α -HBCD dans les tissus

Pour les deux souches, la concentration d' α -HBCD (ng/g MG) était plus élevée dans le gras abdominal que dans le filet, tandis que les muscles des cuisses et pilons présentaient des concentrations intermédiaires (Tissu, $p < 0,001$) (Figure 1). Au poids commercial d'abattage, les lipides des cuisses et pilons et du filet des deux souches étaient respectivement 1,6 et 4,3 fois moins concentrés en α -HBCD que le gras abdominal (Tableau 1). Sur la base du poids frais, ces rapports étaient de 40 et 260. Ainsi, la consommation de cuisse-pilon d'animaux contaminés conduit à une exposition environ 7 fois plus élevée que la consommation de filet. L'accumulation préférentielle de l'HBCD dans les tissus gras riches en lipides neutres est en accord avec les observations faites sur les poules pondeuses exposées à de l' α -HBCD (Dominguez-Romero et al., 2016), en lien avec l'apolarité et la lipophilicité de la molécule (Haddad et al., 2000). Le RA dans le gras abdominal des poulets R était de $8,4 \pm 0,6$ (Tableau 1), ce qui est très semblable à $9,2 \pm 0,6$ estimé chez les poules pondeuses (Dominguez-Romero et al., 2016). Ce résultat est en contradiction avec un RA plus élevé chez les poulets de chair prédit par MacLachlan (2010). Dans l'ensemble, les RA chez les poulets L étaient 1,2 fois plus élevés que chez les poulets R ($p < 0,05$). En plus de ce classement général, les tissus présentaient une cinétique d'accumulation de l' α -HBCD variable (traitement $\times$ tissu, $p < 0,001$) (Figure 1). Chez les animaux ayant achevé leur croissance, l' α -HBCD est d'abord distribué aux tissus très irrigués puis à des tissus peu irrigués tels que le gras abdominal (Dominguez-Romero et al., 2016). Dans la présente étude, la concentration d' α -HBCD dans les tissus dépend également de la cinétique d'exposition par rapport au PV et de celle du dépôt de lipides tissulaires. Des modèles cinétiques de premier ordre ont été ajustés au dépôt de lipides (g) et à la concentration d' α -HBCD (ng/g MG) dans les tissus des poulets en décontamination (Tableau 2, Figure 1). Les constantes globales d'élimination (k) étaient de $0,0334 \pm 0,0029$, $0,0593 \pm 0,0050$, $0,0374 \pm 0,0024$ j^{-1} , correspondant à des demi-vies globales de 20 ± 2 , 12 ± 1 et 19 ± 1 j respectivement dans les cuisses-pilons, le filet et le gras abdominal. Corrigées pour le dépôt de lipides (k_{glip}), ces constantes d'élimination ont été

divisées par 2,6, 2,0 et 2,6 et, par conséquent, les demi-vies multipliées par les mêmes facteurs, pour atteindre respectivement les valeurs de 53, 24 et 47 jours, en accord avec une irrigation plus importante du gras intramusculaire que des dépôts de lipides intermusculaires et périphériques. Chez les poules pondeuses, une demi-vie d'élimination dans le gras abdominal plus courte (35 jours) a été estimée, probablement en raison de la contribution de la ponte à l'élimination de l' α -HBCD (Dominguez-Romero et al., 2016). Initialement, il était prévu d'utiliser la constante d'élimination corrigée du dépôt de lipides pour estimer la constante d'absorption et le facteur de bioaccumulation de l' α -HBCD (OCDE, 2012). Malheureusement, le nombre de points d'échantillonnage entre 0 et 6 semaines était insuffisant pour décrire correctement le dépôt lipidique lent dans les muscles des cuisses et pilons et dans le gras abdominal, qui reflète probablement un dépôt global de gras corporel lent en début d'élevage. Néanmoins, associé à un niveau élevé d'exposition par rapport au PV en début de l'expérience, il explique vraisemblablement le pic de concentration d' α -HBCD jusqu'à 333 ± 14 et 584 ± 34 ng/g MG, respectivement dans les muscles de la cuisse-pilon et le gras abdominal, à 3 semaines d'exposition (Figure 1).

CONCLUSION

La présente étude confirme l'accumulation importante d' α -HBCD dans les tissus adipeux. Elle souligne que la consommation de cuisses et pilons de poulets contaminés conduit à une exposition plus élevée que le filet, en raison d'une concentration de lipides plus élevée, eux-mêmes plus concentrés en α -HBCD. En dépit d'une efficacité alimentaire moindre, la concentration d' α -HBCD dans les tissus des poulets L, en particulier dans les principaux muscles comestibles, n'est que légèrement plus élevée que chez les poulets R. Cette expérimentation fournit un jeu de données utilisable pour la validation d'un modèle mathématique de prédiction de la contamination des produits chez les poulets L et R (Méda et al., 2017).

REMERCIEMENTS

Cette étude a bénéficié d'un co-financement de la part du CASDAR (projet n°1256) a été conduite dans le cadre de l'UMT Biologie Intégrative Recherche et Développement (BIRD 2). Les auteurs remercient N. Besne, F. Mercierand, P. Didier (INRA, PEAT), P. Chartrin, T. Bordeau (INRA, URA), C. Souchet (ITAVI), P. Hartmeyer (UR AFPA), D. Marion (INRA, UR BIA) et J. Huwe (USDA, ARS) pour leur assistance technique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cariou R. et al., 2014. Organohalogen Compd. (76) 1521-1524.
 DGAL, 2009. http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/recueil2008_tt_public-PSPC.pdf
 Dominguez-Romero E. et al., 2016. J. Agric. Food Chem. (64) 2112-2119.
 ECHA (European Chemicals Agency), 2009. URL http://echa.europa.eu/documents/10162/13640/hbcd_en.pdf.
 EFSA, 2011. EFSA Journal (9) 2296-2414.
 Folch J. et al., 1957. J. Biol. Chem. (226) 497-509.
 Haddad S. et al., 2000. Chemosphere, (40) 839-843.
 Koch C. et al., 2015. Environ. Poll. (199) 26-34.
 MacLachlan D.J., 2010. Food Addit. Contam. Part A Chem. Ana. Control Expo. Risk. Assess. (27) 302-314.
 Méda B. et al., 2017. 12^{èmes} Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras.
 OCDE, 2012. OECD Publishing, Paris, 72 pp. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264185296-en>.
 Quentin, M. et al., 2003. Anim. Res. (52) 65-77.

Tableau 1. Teneur en matière grasse, quantité de matière grasse et ratio d'accumulation de l' α -HBCD dans les tissus des poulets à croissance rapide (R) ou lente (L) au poids commercial d'abattage

	Matière grasse (g/kg)		Matière grasse (g) ¹		RA ²	
	R	L	R	L	R	L
Cuisse et pilon	31,0±3,3a	52,5±6,3b	10,2±1,3a	19,9±2,4b	5,2±0,3a	6,7±0,7b
Filet	13,2±0,9	13,1±1,2	6,8±0,5b	3,8±0,2a	2,2±0,3	2,1±0,1
Gras abdominal	883±9a	906±8b	40,4±2,5b	34,2±3,8a	8,4±0,6a	9,9±0,9b
Probabilité ³						
Souche	<0,01		0,87		0,03	
Tissu	<0,001		<0,001		<0,001	
Souche*tissu	0,10		<0,01		0,17	
ETR	17,9		7,0		1,0	

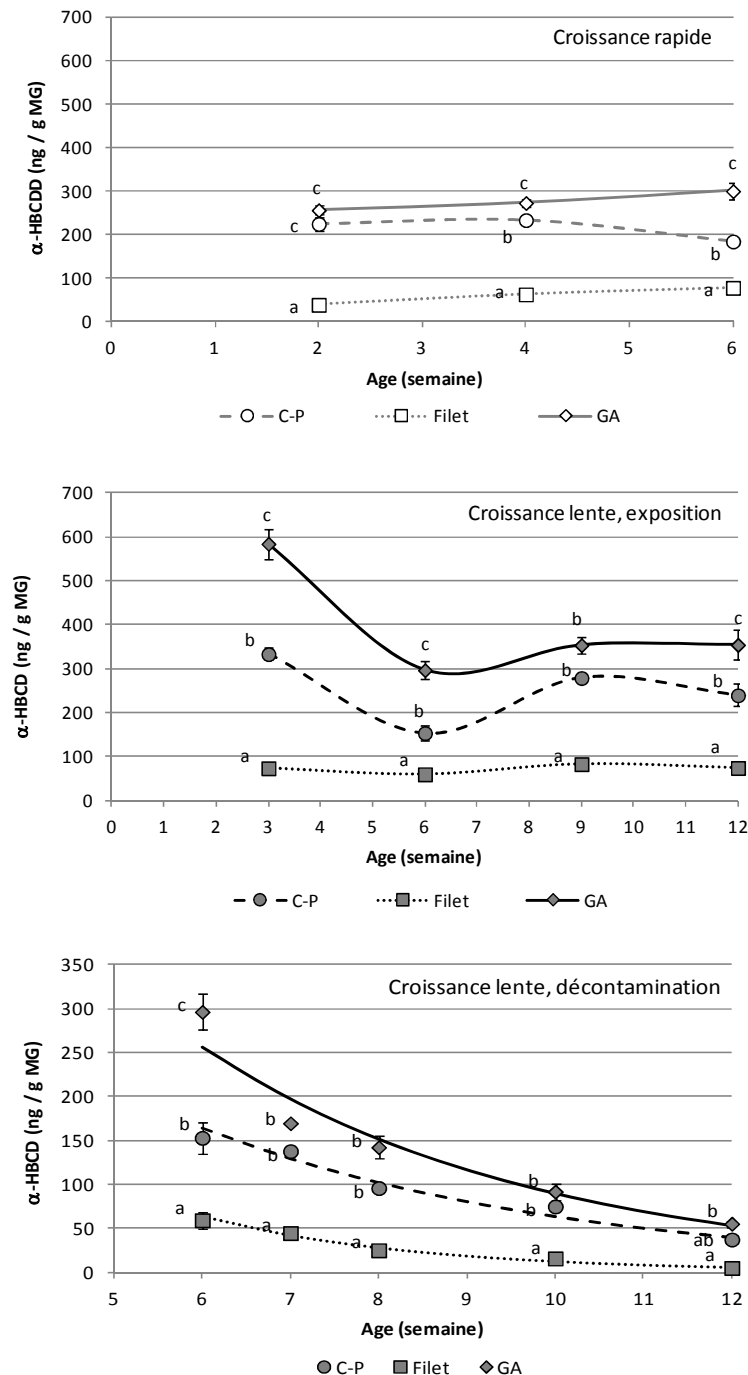
¹En comptant deux cuisses- pilons et deux filets. ²RA, ratio d'accumulation calculé comme le rapport de concentrations d' α -HBCD dans le tissu (ng/g MG) et dans l'aliment (ng/g). ³Les valeurs (moyenne $\pm$ écart-type de la moyenne) sur une même ligne non suivies de la même lettre (a, b) diffèrent (P<0,05). ETR, écart-type résiduel

Tableau 2. Paramètres cinétiques d'élimination d' α -HBCD dans les tissus des poulets à croissance lente

Tissu	Cuisse -pilon	Filet	Gras abdominal
$k_{glip} \times 10^{-3} (j^{-1})$	21,0±3,6	30,0±1,9	22,8±3,7
R ²	0,90	0,97	0,98
ETR	2,05	0,17	1,94
$k \times 10^{-3} (j^{-1})$	34,0±2,9	59,3±5,0	37,4±2,4
R ²	0,96	0,98	0,93
ETR	8,7	3,1	0,17
$t_{1/2}$ globale (j)	20±2	12±1	19±1
$k_d \times 10^{-3} (j^{-1})$	13,0	29,3	14,6
$t_{1/2}$ corrigée du dépôt de lipides (j)	53	24	47

Figure 1. Concentration d' α -HBCD dans les tissus des poulets à croissance rapide (R) ou lente (L) pendant les phases d'exposition et de décontamination

C-P, muscles de la cuisse et du pilon ; GA, gras abdominal. Les points sont des moyennes $\pm$ écart type de la moyenne. Les valeurs au même âge non suivies par la même lettre (a, b, c) diffèrent ($P < 0,05$). Sur le graphique représentant la décontamination des poulets L, les lignes correspondent aux modèles cinétiques de premier ordre présentés dans le tableau 2.



EFFET DU MODE DE PRODUCTION SUR LA COMPOSITION LIPIDIQUE DES ŒUFS ET DE LA VIANDE DE VOLAILLE : IMPACT SUR LES APPORTS NUTRITIONNELS DU MENU MOYEN DES FRANÇAIS

Mairesse Guillaume¹, Schmitt Bernard², Ferry Constance², Chesneau Guillaume¹,
Kerhoas Nathalie³, Mourot Jacques⁴

¹Valorex, La Messayais, 35210 COMBOURTILLE

²Centre d'Enseignement et de Recherche en Nutrition humaine, Centre Hospitalier de
Bretagne Sud, 56322 LORIENT

³Association Bleu-Blanc-Cœur, La Messayais, 35210 COMBOURTILLE

⁴INRA-AgroCampus Ouest, UMR 1348 PEGASE, 35590 SAINT-GILLES
g.mairesse@valorex.com

RÉSUMÉ

L'objectif de cette étude est d'étudier l'effet d'un changement de mode de production des animaux, au travers des cahiers des charges Bleu-Blanc-Cœur (BBC), sur les apports en acides gras journaliers d'un menu moyen français, avec un focus particulier sur les produits avicoles. Les cahiers des charges BBC imposent des apports minimum en acide α -linoléique (ALA, C18:3n-3) dans les rations animales, entraînant une modification de la composition en acides gras des produits. Un menu sur 15 jours représentatif de la consommation moyenne des français a été développé à partir des données d'enquêtes alimentaires. Sur cette base, deux menus types ont été construits : le premier menu (STD) comprend des produits animaux issus d'un mode de production standard ; le second substitue ces produits animaux standards par leurs équivalents issus de la filière BBC. Le bilan des apports en acides gras de ces deux menus est ensuite calculé. Les résultats montrent que l'enrichissement en oméga 3 des produits grâce à la modification du mode de production des animaux d'élevage permet une meilleure adéquation vis-à-vis des apports nutritionnels conseillés (ANC) en acides gras. L'effet est particulièrement visible pour les acides gras polyinsaturés n-3 pour lesquels les apports croissent de 80% pour l'ALA (C18:3n-3) et de 35% pour le DHA (acide docosahexaénoïque, C22:6n-3), réduisant ainsi d'environ 45% les écarts vis-à-vis des ANC pour l'ALA et le DHA. Les œufs BBC sont les premiers vecteurs de l'amélioration des apports en DHA puisqu'ils contribuent à 66% à la réduction des écarts aux ANC, comparativement au menu STD. Les viandes de volaille et les œufs BBC constituent un levier aussi important que la viande de porc avec des contributions respectives de 11% et de 13% à la réduction des écarts aux ANC pour l'ALA.

ABSTRACT

The animal production system is a tool for improving fatty acids intakes in a French menu – focus on eggs and poultry meat.

The aim of this study is to assess the impact of a change in animal production system, through Bleu-Blanc-Coeur (BBC) specifications, on the fatty acids daily intake of an average French menu. The BBC specifications require to increase α -linolenic acid (ALA, C18: 3n-3) in animal feed to change the fatty acid composition of the products. A 15-day meal plan representative of average consumption for the French adult male population was developed. It includes animal products from standard production system (STD) or from a BBC production system. The fatty acids intake of both diet was calculated. The results show that the modification of the production system allows a better conformity with the ANC (French dietary intake recommendations) in fatty acids. The effect is particularly important for n-3 polyunsaturated fatty acids for which the intake increases by 80% for ALA (C18:3n-3) and by 35% for DHA (C22: 6n-3), thus reducing about 45% the deviations from ANC for ALA and DHA. BBC eggs are the main product to DHA improvements since they contribute to 66% to the reduction of ANC deviations compared to the STD menu. For ALA, poultry meat and eggs from BBC specifications are as important as pork meat with a contribution of 11% and 13%, respectively, to the reduction of the deviation from ANC.

INTRODUCTION

Les dernières enquêtes alimentaires révèlent un décalage persistant entre les apports alimentaires et les apports nutritionnels conseillés (ANC) notamment en ce qui concerne les lipides (ANSES, 2015). Ainsi, tous les leviers permettant la réduction de tels écarts sont à considérer. Les produits animaux sont les principaux contributeurs à l'apport lipidique des français, à hauteur de 60 à 67% selon les études (Tressou-Cosmao *et al.*, 2015). Or, l'amélioration du profil nutritionnel des produits animaux peut être efficacement pilotée par le mode de production et notamment par les stratégies alimentaires mises en place dans les élevages. Dans ce contexte, la filière Bleu-Blanc-Cœur (BBC) a depuis 2001 mis en place des cahiers des charges de pratiques d'élevage réintroduisant des végétaux à fortes teneurs en acide alpha-linolénique (ALA) dans la ration (herbe, luzerne, lin,...) des animaux monogastriques (porc et volaille) et ruminants. Ces changements de mode de production aboutissent au final à la commercialisation de produits animaux dont le profil lipidique est amélioré par rapport aux produits conventionnels et conformément aux recommandations nutritionnelles : augmentation des apports en acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3), baisse du rapport AGPI n-6/AGPI n-3, baisse des acides gras saturés (AGS) (Schmidely *et al.*, 2011). Ainsi, compte-tenu du lien étroit entre alimentation animale et composition en acides gras des produits animaux, le choix d'un mode de production BBC peut s'avérer stratégique à des fins de rééquilibrage des apports en acides gras dans le cadre d'un menu moyen français. L'objectif de cette étude est ainsi d'étudier l'effet d'un changement de mode de production, au travers des produits animaux issus de la filière Bleu-Blanc-Cœur (BBC), sur les apports en acides gras journaliers dans le cadre d'un menu moyen français, avec un focus particulier sur les produits avicoles, viandes et œufs.

1. MATERIELS ET METHODES

Un menu moyen sur 15 jours, représentatif de la population adulte masculine (plus de 18 de ans), a été construit à partir de la base de données issue de l'enquête menée par le CREDOC sur les Comportements et Consommations Alimentaires en France (CREDOC, 2010). A partir de ces données, une sélection des 92 aliments les plus consommés par les français a été réalisée. Une quantité moyenne de consommation en g/j a ensuite été déterminée. Sur cette base, deux menus types ont été construits : le premier menu (STD) comprend des produits animaux issus d'un mode de production standard ; le second substitue ces produits animaux standards par leurs équivalents issus de la filière BBC. Seule la

composition en acides gras des produits diffère entre BBC et STD (Coelho *et al.*, 2016). La part des produits animaux dans ces 2 menus est identique (470g de produits animaux par jour, incluant les produits laitiers et les fromages, dont 39 g d'œuf et 37g de viande de volaille). Les contributions des différentes catégories d'aliments aux apports lipidiques totaux sont également similaires entre les menus : 36,6% des apports lipidiques totaux journaliers pour les produits laitiers, 15,7% pour la charcuterie (exclusivement de porc), 5,9% pour les viandes bovines, 4,3% pour les œufs, 3% pour la viande de porc et 1.5% pour la viande de volaille. Le bilan des apports en acides gras de ces deux menus est calculé en s'appuyant sur les tables de composition nutritionnelle CIQUAL excepté pour les produits animaux (hors poissons) pour lesquels de nouvelles références de profil en acides gras ont été établies à partir de données issues de la bibliographie et des analyses de composition en acides gras des produits animaux issus du plan de contrôle 2010-2013 de l'Association Bleu-Blanc-Cœur. En effet, les tables CIQUAL ne font pas la distinction entre les modes de production des aliments.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les 2 menus constitués apportent 37.2% des apports énergétiques totaux sans alcool (AET) sous forme de lipides, ce qui est conforme à la littérature (CREDOC, 2010 ; ANSES, 2015 ; Tressou *et al.*, 2016). De la même manière, les apports des autres acides gras sont globalement similaires à ces précédentes études (ANSES, 2015, Tressou *et al.*, 2016).

Le menu BBC permet une réduction des apports en acides gras saturés (AGS) et acides gras proathérogènes quand ils sont consommés en excès (C12:14-16:0) de 8% et de 18%, respectivement. En outre, des augmentations des apports en C18:3n-3 (ALA) de 79.9%, en C20:5n-3 et C22:6n-3 (acide docosahexaénoïque, DHA) respectivement de 42.7% et 35%, sont observées, même si les huiles constituent une source importante d'AGPI dans les menus.

L'amélioration des apports lipidiques au travers de la filière BBC s'exprime différemment selon les types d'aliments et démontre la complémentarité des différents aliments dans les apports en acides gras. Les produits laitiers et les viandes de ruminants issus de la filière BBC agissent essentiellement sur la réduction des apports en acides gras saturés, notamment athérogènes.

Pour l'ALA, la modification du mode d'élevage permet de réduire de 45% les écarts aux ANC, dont 47% est attribuable aux charcuteries, 14,8% aux produits laitiers, 13,4% aux œufs, 10,7% aux viandes de porc, 1,31% aux viandes de volaille et 3% pour les viandes bovines (Tableau 2).

Pour l'EPA, la réduction des écarts par rapport aux ANC est de 21% dont 14% est attribuables aux œufs et viande de volaille.

La hausse du DHA est quant à elle essentiellement attribuée aux œufs. En effet, la réduction de l'écart par rapport aux ANC est de 44% dont 66% issus des œufs BBC.

CONCLUSION

Le choix du mode de production des produits animaux comme levier d'amélioration des apports en acides gras dans la population française se révèle quantitativement pertinent, à minima au moins sur la population adulte masculine tel qu'envisagé dans l'étude. Des évaluations complémentaires devront être

envisagées pour les autres populations (femmes et enfants), pour lesquels les habitudes de consommations diffèrent de celle prises en compte dans ce travail. Même si les produits de porc (viande et charcuterie) sont des pourvoyeurs importants d'AGPI n-3, la complémentarité entre produits animaux se doit d'être considérée. En effet, les différents produits animaux issus d'un mode de production adéquat tel que proposé ici dans les cahiers des charges Bleu-Blanc-Coeur, combinés aux recommandations du Programme National Nutrition Santé notamment par le choix des huiles végétales dans les menus, sont complémentaires pour se rapprocher encore davantage des ANC.

Tableau 1. Contribution des différentes familles d'aliments aux apports journaliers en acides gras

	AGS (%AET)		C12-C14-C16 (%AET)		LA (%AET)		ALA (%AET)		EPA (mg)		DHA (mg)	
	STD	BBC	STD	BBC	STD	BBC	STD	BBC	STD	BBC	STD	BBC
Produits laitiers ¹	9,50	8,53	6,19	4,60	0,17	0,26	0,06	0,10	14,85	30,03	0,00	6,60
Viande bovine	0,96	0,88	0,61	0,57	0,04	0,06	0,01	0,02	6,71	13,95	0,28	5,42
Viande porcine	0,44	0,42	0,31	0,28	0,12	0,12	0,01	0,04	1,21	3,01	1,72	2,67
Viande volaille	0,20	0,17	0,15	0,12	0,10	0,11	0,01	0,04	0,71	2,40	1,47	4,10
Œufs	0,43	0,40	0,32	0,31	0,24	0,21	0,01	0,04	0,00	3,09	20,09	52,29
Charcuterie	2,11	1,97	1,52	1,40	0,57	0,56	0,04	0,18	5,27	11,54	5,48	6,64
Poisson	0,10	0,10	0,06	0,06	0,02	0,02	0,01	0,01	53,35	53,35	109,19	109,19
Autres ²	2,22	2,22	1,37	1,37	2,83	2,83	0,22	0,22	0,50	0,50	0,99	0,99
Total	15,98	14,71	10,53	8,72	4,08	4,15	0,36	0,65	82,60	117,87	139,22	187,90
ANC 2010	<12		<8		4		1		250		250	

¹ Produits laitiers : beurres, crèmes, laits frais, desserts lactés et fromages ; ² Autres : huiles végétales, fruits et légumes, féculents

Tableau 2. Contribution des produits animaux issus de la filière BBC à la réduction des écarts entre les apports en acides gras et les ANC (en %)

	AGS	C12-C14-C16	ALA	EPA	DHA
Produits laitiers ¹	76,5	87,6	14,8	43,0	13,6
Viande bovine	6,3	1,8	3,0	20,5	10,6
Viande porcine	1,3	1,4	10,7	5,1	1,9
Viande volaille	2,6	1,6	11,3	4,8	5,4
Œufs	2	0,6	13,4	8,8	66,1
Charcuterie	11,3	7	46,8	17,8	2,4

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANSES, 2015. In : Apports en acides gras de la population vivant en France et comparaison aux apports nutritionnels conseillés définis en 2010. ANSES Eds, Maisons-Alfort, France, 244 p.
- Coelho, C.R.V., Pernollet, F., van der Werf, H.M.G. 2016. PLoS ONE 11(8): e0160397. doi:10.1371/journal.pone.0160397
- CREDOC, 2010. Base de données Comportements et consommations alimentaires en France (CCAF)
- Schmidely P, Brunshwig P, Enjalbert F, Etienne M, Lessire M, Sauvant D, et al., 2011. In : Impact des pratiques en alimentation animale sur la composition en acides gras des produits animaux destinés à l'Homme. Agence Nationale de Sécurité Sanitaire Alimentation, Environnement, Travail, Maisons-Alfort , pp.274.
- Tressou-Cosmao J, Pasteau P, Le Guillou C, Simon N. In : Analyse des apports nutritionnels en acides gras de la population française à partir des données INCA 2, ONIDOL, Paris: ONIDOL, pp70.

MODELISATION GÉNERIQUE DU DEVENIR D'UN RETARDATEUR DE FLAMMES BROME (HBCE) : APPLICATION AU POULET DE CHAIR

Méda Bertrand¹, Royer Eric², Guérin Stéphanie¹, Garcia de Salazar Andrea², Dominguez-Romero Elena^{3,4}, Thene Nicolas², Henri Jérôme⁵, Travel Angélique³, Jondreville Catherine⁴

¹URA, INRA, 37380 NOUZILLY

²IFIP Institut du Porc, 34 Boulevard de la gare, 31500 TOULOUSE

³ITAVI, Centre INRA Val de Loire, 37380 NOUZILLY

⁴AFPA, INRA, Université de Lorraine, 54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY

⁵ANSES Laboratoire de Fougères, 10B Rue Claude Bourgelat, 35133 JAVENE
bertrand.meda@inra.fr

RÉSUMÉ

L'hexabromocyclododécane (HBCE) est un retardateur de flammes ajouté dans certains polystyrènes utilisés comme isolants dans les bâtiments d'élevage. Ce composé, qui est un perturbateur endocrinien, est quantifié à des concentrations pouvant atteindre plusieurs centaines de ng g⁻¹ lipides dans les denrées alimentaires d'origine animale (DAOA pour une médiane inférieure à 0,5 ng g⁻¹ lipides). Des méthodes pour quantifier le transfert de l'HBCE vers les DAOA doivent être développées. Cette étude présente un modèle générique de type PBPK (pharmacocinétique basé sur la physiologie), développé pour les animaux en croissance, et son application chez le poulet de chair. Ce modèle, simulant l'accumulation d'HBCE dans les tissus, repose sur deux sous-modèles. Le sous-modèle physiologique représente différents compartiments (poids total et poids de lipides) : le plasma, le foie, deux muscles ayant des teneurs en lipides différentes (filet et cuisse), le tissu adipeux de réserve (gras abdominal) et un compartiment représentant le reste de l'animal. Dans le sous-modèle ADME (absorption, distribution, métabolisme, excrétion), l'HBCE ingéré, une fois absorbé, est dirigé vers le foie où une fraction est métabolisée (clairance hépatique). La partie non métabolisée est distribuée dans les tissus via la circulation sanguine à l'aide de deux paramètres : l'irrigation sanguine et le coefficient de partage. Le modèle a été paramétré pour tenir compte des vitesses de croissance différentes entre tissus (allométries) ainsi que des teneurs en lipides variables selon la génétique et le sexe. Le modèle a été validé avec des données expérimentales où des poulets de chair ont été contaminés par de l'HBCE. Ce modèle pourra être utilisé pour évaluer le niveau de contamination de produits avicoles selon différents modes d'élevage ou conditions d'exposition.

ABSTRACT

Fate of a brominated flame retardant in chickens and pigs: a generic modelling approach

Hexabromocyclododecane (HBCE) is an endocrine disruptor both for humans and animals. It is widely used as a flame retardant in building materials of livestock housing and has been detected in animal products at levels sometimes reaching several hundreds of ng g⁻¹ lipids, while the median is below 0.5 ng g⁻¹ lipids. Thus, there is a great need for methods to investigate the contamination of animal products by HBCE. This study proposes a generic Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) model for growing farm animals, and its application for broilers. It consists in the connection of two sub-models. The physiological sub-model represents different compartments (total weight and lipid weights): plasma, liver, breast muscle, leg muscles, abdominal fat and one compartment representing the rest of the animal. In the ADME sub-model (absorption, distribution, metabolism, excretion), HBCE is absorbed in digestive tract, before being distributed in the organism by the plasma considering differences in blood irrigation between tissues. Since HBCE is a lipophilic and non polar compound, a partition coefficient (Kp), defined as the ratio between neutral lipid concentrations in a tissue and in plasma, was used to predict its distribution in each tissue. In the liver, a fraction of HBCE is eliminated by metabolism (hepatic clearance). Model was calibrated to take into account differences in tissue growth (allometric growth) and lipid contents according to species, genetics and sex, before being validated using experimental data where animals were exposed to HBCE through feed. This model will be used to assess the risk of meat contamination by HBCE in different broiler production systems.

INTRODUCTION

L'hexabromocyclododécane (HBCD) est un retardateur de flamme bromé utilisé pour ignifuger les textiles et les matériaux isolants ou électriques. Comme d'autres polluants organiques persistants (POP), ce contaminant émergent est un perturbateur endocrinien (Van der Ven *et al.*, 2006), lipophile et bio-accumulable dans les tissus (EFSA, 2011). Différents matériaux à base de polystyrène et contenant jusqu'à près de 4% d'HBCD, ont été identifiés dans les bâtiments d'élevage comme des sources possibles d'exposition des animaux par voie orale ou respiratoire (Cariou *et al.*, 2014), pouvant entraîner un risque de bio-accumulation dans les produits animaux.

Bien qu'il n'existe aucune valeur limite réglementaire, l'HBCD est fréquemment détecté dans des denrées alimentaires d'origine animale (DAOA : viandes, œufs, lait) à des doses généralement inférieures au ng par gramme de lipides et sans risque pour la santé humaine (EFSA, 2011). Toutefois, les plans de surveillance relèvent une variabilité importante, et parfois des niveaux très élevés de contamination (>1000 ng/g lipides). Les DAOA apparaissent donc comme une source majeure de l'exposition humaine à l'HBCD (EFSA, 2011).

Plusieurs modèles mathématiques ont été développés afin d'étudier les risques de contamination des produits avicoles par certains POP (e.g. Fournier *et al.*, 2015 ; MacLachlan, 2010 ; van Eijkeren *et al.*, 2006). Cependant, certains ne concernent que la poule pondeuse et le paramétrage est parfois spécifique de certains POP.

Aussi, cette étude présente le développement d'un modèle générique permettant d'estimer la contamination de différents tissus en fonction des caractéristiques des animaux et des systèmes d'élevage, et son application au poulet de chair à croissance rapide ou lente.

1. DESCRIPTION DU MODELE GENERIQUE ET APPLICATION AU POULET DE CHAIR

1.1. Caractéristiques générales du modèle

Le modèle a été élaboré de façon générique pour pouvoir étudier les flux de HBCD chez le poulet de chair et le porc en croissance (pour l'application au porc, voir Royer *et al.*, 2017). Le modèle a été développé à l'aide du logiciel VENSIM® (Ventana Systems, Harvard, MA USA). C'est un modèle de type PBPK (*Physiologically Based Pharmacokinetic*), c'est-à-dire associant deux sous-modèles : un sous-modèle physiologique représentant les caractéristiques biologiques liés à l'anatomie et à la croissance de l'animal et un sous-modèle ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion) représentant les flux du xénobiotique, ici l'HBCD. Par ailleurs, il est dynamique (pas de temps journalier), mécaniste (représentation des phénomènes

liés à la croissance de l'animal) et déterministe (pas de prise en compte de la variabilité dans les paramètres ou les sorties du modèle).

Pour le poulet de chair, 6 compartiments d'intérêt et définis anatomiquement sont représentés : le muscle du filet (*Pectoralis major*), les muscles de la cuisse, le foie, le gras abdominal, le plasma, et enfin, pour satisfaire aux lois de conservation de la matière, le reste des tissus (Figure 1).

1.2. Sous-modèle physiologique

Le poids vif (BW , kg) de l'animal en fonction de son âge est représenté à l'aide d'une fonction de Gompertz modifiée (Aubry *et al.*, 2004). Cette fonction repose sur deux couples âge (j)/poids (kg) initiaux et finaux choisis par l'utilisateur en fonction des caractéristiques de la production étudiée (age_1 , BW_1 ; age_2 , BW_2) et sur un paramètre de précocité (B_g , j^{-1}) décrivant l'allure de la courbe de croissance. Ce dernier varie selon la souche (croissance rapide ou lente) et le sexe considérés (Tableau 1) :

$$BW(AGE) = BW_2 \times \left(\frac{BW_2}{BW_1} \right)^{\frac{e^{-B_g \times (AGE - Age_1)} - e^{-B_g \times (Age_2 - Age_1)}}{-1 + e^{-B_g \times (Age_2 - Age_1)}}}$$

Le poids (W_{tissue} , kg) du foie, du gras abdominal et des muscles du filet et de la cuisse est prédit à l'aide d'allométries (coefficients a_i et b_i ; Tableau 1) issus d'une analyse des données de la littérature, en fonction de la souche (croissance rapide ou lente) et du sexe. La quantité de lipides neutres ($NeutL_{tissue}$, kg) dans ces compartiments est ensuite estimée à l'aide des teneurs moyennes en lipides pour ces tissus (L_{tissue} , $kg.kg^{-1}$) et de ratios lipides neutres:totaux ($R_{neut,tissue}$, %) moyens issus de la littérature (Tableau 1) :

$$W_{tissue} = e^{b_i} \times BW^{a_i}$$

$$NeutL_{tissue} = W_{tissue} \times L_{tissue} \times \frac{R_{neut,tissue}}{100}$$

Le gain de poids du reste des tissus est obtenu par différence entre le gain de poids total et le gain de poids du foie, du gras abdominal et du filet et de la cuisse, puis le gain de lipides neutres dans le reste des tissus est estimé par différence entre le dépôt total de lipides neutres dans l'animal (non décrit ici) et la somme des lipides neutres déposés dans le foie, le gras abdominal et les muscles du filet et des cuisses.

1.3. Sous-modèle « Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination » (ADME)

Le sous-modèle ADME permet de simuler les flux d'HBCD au sein de l'animal depuis une exposition par voie orale jusqu'à sa distribution vers les tissus via le plasma et sa métabolisation par le foie.

L'animal est exposé à l'HBCD ($HBCD_{abs}$, $\mu g.j^{-1}$) par voie orale et les quantités ingérées peuvent être soit données directement en entrée du modèle, soit proportionnelles à la quantité d'aliment ingéré. Dans le cas de cette étude, et afin de valider le modèle, cette seconde option a été retenue :

$$HBCD_{abs} = Conso_{alim} \times C_{alim} \times \frac{\alpha_{abs}}{100}$$

avec $Conso_{alim}$ l'ingestion quotidienne d'aliment (kg.j^{-1}), C_{alim} la concentration en HBCD dans l'aliment ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) et α_{abs} la fraction d'HBCD qui est résorbée dans le plasma depuis le tube digestif. La valeur d' α_{abs} (90%) est issue de Szabo *et al.* (2011) (Tableau 2). Cette valeur élevée est cohérente avec l'absorption généralement élevée des POP chez les oiseaux (Kelly *et al.*, 2004).

Les échanges d'HBCD entre le plasma et les tissus reposent sur des coefficients de partage ($K_{p,tissue}$, L.kg^{-1}) représentant l'affinité relative de l'HBCD pour un tissu donné par rapport au compartiment de distribution (ici le plasma). Comme HBCD est lipophile et apolaire (Haddad *et al.*, 2000), ce coefficient, pour un tissu donné, est supposé égal au rapport de concentrations de lipides neutres dans le tissu considéré et le plasma. La quantité d'HBCD échangée à chaque pas de temps entre le plasma et un tissu (A_{tissue} , $\mu\text{g.j}^{-1}$; avec $A_{tissue} > 0$ quand HBCD s'accumule dans le tissu) s'écrit alors :

$$A_{tissue} = Q_{tissue} \times \left(C_{plasma} - \frac{C_{tissue}}{K_{p,tissue}} \right)$$

Avec Q_{tissue} , le débit plasmatique vers le tissu (L.j^{-1}) et C_{plasma} et C_{tissue} , les concentrations d'HBCD dans le plasma et le tissu ($\mu\text{g.L}^{-1}$ et $\mu\text{g.kg}^{-1}$).

Pour le foie, le filet, le gras abdominal et la cuisse, le débit plasmatique (Q_{tissue}) est calculé comme le produit entre le poids de ce tissu (W_{tissue}), une valeur d'irrigation sanguine ($perf_{tissue}$, L.kg^{-1}) et l'hématocrite du sang (Ht , %). Les valeurs pour ces paramètres dans le modèle sont issues de la littérature (Tableau 2) :

$$Q_{tissue} = (W_{tissue} \times perf_{tissue}) \times \left(1 - \frac{Ht}{100} \right)$$

Pour le reste des tissus, le débit plasmatique est calculé par différence entre le débit plasmatique total de l'animal et les débits vers les autres tissus (foie, filet, cuisse, gras abdominal) :

$$Q_{other} = \left[Q_{tot} \times BW \times \left(1 - \frac{Ht}{100} \right) \right] - \sum Q_{tissue}$$

avec Q_{tot} le débit sanguin total ($\text{L.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$; Tableau 2). L'HBCD ingéré est également métabolisé dans le foie (clairance hépatique; Cl_{liver} , $\mu\text{g.j}^{-1}$) et éliminé :

$$Cl_{liver} = HBCD_{liver} \times K_{met}$$

avec $HBCD_{liver}$ la quantité d'HBCD dans le foie et K_{met} une constante de métabolisation (j^{-1}). La valeur de K_{met} a été fixée à $0,1 \text{ j}^{-1}$, soit une molécule modérément métabolisée selon la classification de MacLachlan *et al.* (2010) (Tableau 2). L'élimination d'HBCD se fait donc uniquement sous forme de métabolites via la bile ou l'urine.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Analyse de sensibilité

Une analyse de sensibilité a été conduite, en faisant varier les paramètres physiologiques du modèle

(teneurs en lipides totaux, ratios lipides neutres:totaux, irrigation des tissus...) un par un entre une valeur minimale et une valeur maximale avec une valeur d'incrément entre ces bornes. Les valeurs finales des concentrations dans les tissus ont été considérées pour estimer la sensibilité aux paramètres. Le Tableau 3 présente les principaux paramètres auxquels le modèle est sensible. Ainsi, les concentrations d'HBCD (exprimées en ng/g lipides totaux) dans l'ensemble des compartiments sont très influencées par les caractéristiques du foie (teneurs en lipides totaux et ratio neutres:totaux, K_{met}). Ce résultat semble logique puisque le foie est le compartiment par lequel l'HBCD arrive dans l'organisme, avant sa distribution par le plasma. En outre, il est cohérent que la clairance hépatique influence les concentrations dans tout l'animal puisque le métabolisme hépatique représente l'unique voie d'élimination de la molécule. A l'inverse, dans les autres compartiments, le ratio lipides neutres:totaux d'un compartiment donné, n'affecte que la concentration en HBCD dans celui-ci, ce qui est logique, étant donné que la teneur en lipides neutres du compartiment permet d'estimer le coefficient de partage ($K_{p,tissue}$) pilotant les flux d'HBCD entre le compartiment et le plasma.

Les autres paramètres décrits précédemment, y compris les paramètres associés à l'irrigation sanguine (Tableaux 1 et 2), n'ont pas ou peu d'influence significative sur les concentrations d'HBCD dans les tissus.

2.2. Validation après réajustement des coefficients de partage et de la constante de métabolisation

Dans le cadre du projet BrAviPorc, une étude expérimentale, destinée à accompagner le travail de modélisation, a été conduite sur des poulets à croissance lente ou rapide contaminés par HBCD via l'aliment pendant toute leur vie (de 1 à 42 ou 84 j respectivement) (Jondreville *et al.*, 2017). Une première confrontation de ces données expérimentales de aux prédictions du modèle n'était pas satisfaisante, puisque les concentrations simulées d'HBCD dans les tissus étaient toutes du même ordre de grandeur, et ne permettaient pas de discriminer les tissus, à l'inverse des données expérimentales, où les concentrations dans les tissus les plus riches en lipides (gras abdominal et cuisse) étaient 2 à 4 fois plus élevées.

L'analyse de sensibilité ayant montré l'importance des ratios de lipides neutres:totaux dans les tissus étudiés (utilisés pour l'estimation des coefficients de partage), ainsi que de la constante de métabolisation, ces paramètres ont été ajustés à partir des données expérimentales citées précédemment. Ainsi, pour chaque souche, les $K_{p,tissue}$ ont été ajustés à partir des données d'animaux contaminés pendant toute leur vie, puis un ajustement de la constante de métabolisation K_{met} a été réalisé à partir des données expérimentales de Jondreville *et al.* (2017) comprenant une période de décontamination entre 43 et 84 j d'âge (aliment non contaminé) chez le poulet à croissance lente ayant

préalablement reçu un aliment contaminé entre 1 et 42 j d'âge. Ces données étaient en effet les plus pertinentes pour l'estimation de la constante de métabolisation, seul paramètre permettant la décontamination des animaux. La valeur finale de la K_{met} retenue est de $0,3 \text{ j}^{-1}$ soit une valeur trois fois plus élevée que la valeur initiale et cette différence a un fort impact sur les concentrations simulées d'HBBCD dans les tissus (Tableau 2).

La Figure 2 présente la confrontation des prédictions du modèle aux données expérimentales de Jondreville *et al.* (2017). Après ajustement des coefficients de partage ($K_{p,tissue}$), le modèle permet ainsi, pour les deux souches, de hiérarchiser les tissus en fonction de leur contamination. En outre, les valeurs des concentrations finales prédites (*i.e.* à l'abattage des animaux) sont proches des concentrations observées. Ces résultats constituent une validation interne. En effet, les données expérimentales présentées ont été utilisées pour ajuster les coefficients de partage. Toutefois, compte-tenu de l'absence d'autres données expérimentales disponibles dans la littérature pour le poulet de chair, une validation externe n'est pas possible. Ces résultats permettent néanmoins de considérer que les prédictions du modèle sont satisfaisantes, et qu'il pourra être utilisé pour analyser différents scénarios de contamination.

2.3. Perspectives d'utilisation du modèle

Ce modèle soulève tout d'abord la nécessité d'un point de vue sanitaire de réduire l'incertitude liée à la clairance hépatique de l'HBBCD et ceci, dans toutes les espèces animales qui y sont exposées et qui sont destinées à la consommation humaine.

Suite à cette étude, des scénarios pourront être construits afin d'étudier les niveaux de contamination des produits avicoles en fonction de différentes hypothèses techniques (mode d'élevage, performances zootechniques...) et d'exposition des animaux (niveau d'exposition, période et durée d'exposition...). Cette approche permettra de mieux

comprendre et de hiérarchiser les facteurs de risque associés à la contamination des produits avicoles par l'HBBCD.

En outre, le modèle ayant été développé de façon générique, puis paramétré et validé pour le porc en croissance (Royer *et al.*, 2017), il sera également possible de réaliser cette analyse de scénarios chez le porc. Enfin, il sera possible de comparer les produits issus des deux types de production, notamment en comparant les conditions d'exposition requises chez le porc et le poulet de chair pour obtenir des niveaux de contamination similaires chez ces deux espèces.

Enfin, la généralité du modèle pourra également permettre son adaptation pour l'étude d'autres polluants organiques persistants lipophiles et apolaires (ex. PCB, DDT...).

CONCLUSION

Cette étude présente un modèle permettant d'étudier la contamination de produits avicoles (viande du filet et de la cuisse) par l'hexabromocyclododécane (HBBCD). Basé sur un sous-modèle physiologique, il permet d'étudier l'influence du mode d'élevage et des performances zootechniques sur les niveaux de contamination de différents produits animaux, et ainsi d'évaluer l'exposition des consommateurs. Il permettra également d'identifier les meilleurs leviers d'action pour garantir la qualité sanitaire des produits.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par le fond CAS DAR (projet 2013-2016 BrAviPorc) et a été réalisée dans le cadre de l'UMT Biologie Intégrative Recherche et Développement (BIRD 2). Les auteurs remercient Elisabeth Baéza (INRA URA) pour ses conseils sur les dépôts lipidiques chez le poulet de chair.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aubry A., Quiniou N., Le Cozler Y., Querné M., 2004. Journées Rech. Porcine, 36, 409-422.
- Cariou R., Vénisseau A., Amand G., Marchand P., Marcon M., Huneau A., Le Bouquin S., Dervilly-Pinel G., Travel A., Le Bizec B., 2014. Organohalogen Compd., (76), 1521-1524.
- Dominguez-Romero E., Cariou E., Omer E., Marchand P., Dervilly-Pinel G., Le Bizec B., Travel T., Jondreville C., 2016. J. Agric. Food Chem., (64), 2112-2119.
- EFSA, 2011. EFSA Journal, (9), 2296-2413.
- Fournier A., Martin O., Travel A., Puillet L., Feidt C., Jondreville C., 2015. Env. Toxicol. Chem., (24), 173-183.
- Haddad S., Poulin P., Krishnan K., 2000. Chemosphere, (40), 839-843.
- Jondreville C., Travel A., Méda B., Dominguez-Romero E., Cariou R., Dervilly-Pinel G., Le Bizec B., Baéza E., 2017. 12^{èmes} Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras.
- Kelly B.C., Gobas F.A.P.C., McLachlan M.S., 2004. Env. Toxicol. Chem., (23), 2324-2336.
- MacLachlan D.J., 2010. Food Addit. Contam., (27), 302-314.
- Royer E., Méda B., Cariou R., Garcia de Salazar A., Guérin S., Thene N., Baéza E., Jondreville C., 2017. Journées Rech. Porcine, (49), à paraître.
- Szabo D.T., Diliberto J.J., Hakk H., Huwe J.K., Birnbaum L.S., 2011. Toxicol. Sci., (121), 234-244.

Van der Ven L., Verhoef A., Van de Kuil T., Slob W., Leonards P.E.G., Visser T.J., Hamers T., Herlin M., Håkansson H., Olausson H., Piersma A.H., Vos J.G., 2006. Toxicol. Sci., (94), 281-292.
 Van Eijkeren J.C.H., Zeilmaker M.J., Kan C.A., Traag W.A., Hoogenboom L.A.P., 2006. Food Addit. Contam., (23), 509-517.

Figure 1. Représentation schématique des compartiments et des flux d’HBCD considérés dans le modèle PBPK.

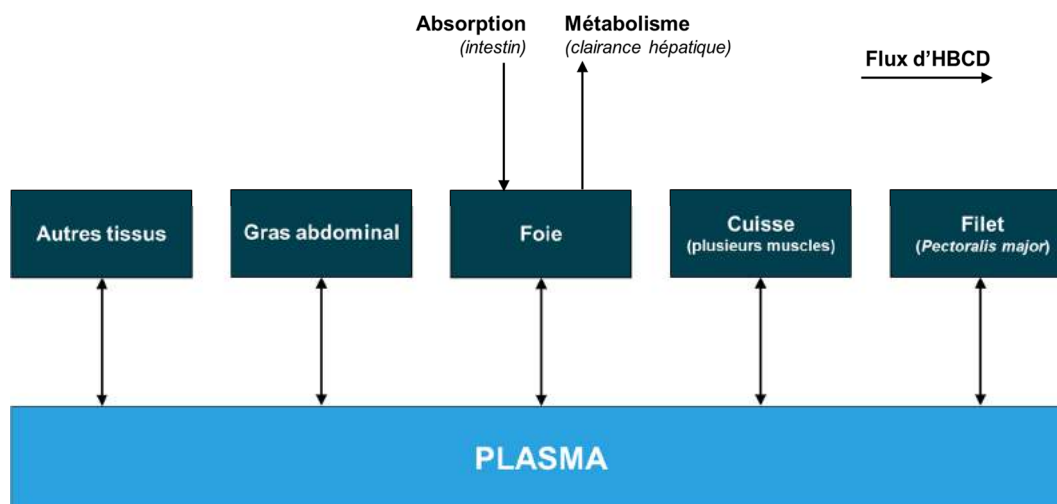


Tableau 1. Principaux paramètres utilisés dans le sous-modèle physiologique.

Phénomène biologique	Compartiment	Variable	Unité	Valeurs			
				Croissance rapide		Croissance lente	
				Mâle	Femelle	Mâle	Femelle
Croissance corporelle ^a	—	B_g	j ⁻¹	0,0442	0,0439	0,0301	0,0301
Croissance allométrique des tissus ^a	foie	a_{liver}	—	0,87	0,87	0,94	0,94
		b_{liver}	—	-3,67	-3,67	-3,95	-3,95
	filet	a_{breast}	—	1,48	1,57	1,03	1,12
		b_{breast}	—	-2,17	-2,11	-2,40	-3,00
	cuisse	a_{leg}	—	1,12	1,05	1,15	1,12
		b_{leg}	—	-2,21	-1,97	-2,07	-1,90
	gras abdominal	a_{abd_fat}	—	1,15	1,11	1,91	2,38
		b_{abd_fat}	—	-4,21	-3,78	-4,92	-4,52
Teneur en lipides des tissus ^b	foie	L_{liver}	kg.kg ⁻¹	0,043	0,067	0,043	0,061
	filet	L_{breast}	kg.kg ⁻¹	0,013	0,018	0,009	0,018
	cuisse	L_{leg}	kg.kg ⁻¹	0,028	0,086	0,022	0,058
	gras abdominal	L_{abd_fat}	kg.kg ⁻¹	0,838	0,851	0,838	0,838
Ratio lipides neutres:totaux ^b	foie	$R_{neut,liver}$	%	80,9	80,9	80,9	80,9
	filet	$R_{neut,breast}$	%	69,9	69,9	69,9	69,9
	cuisse	$R_{neut,leg}$	%	95,0	87,9	91,0	87,9
	gras abdominal	R_{neut,abd_fat}	%	98,0	98,0	98,0	98,0

^a Valeurs obtenues par ajustement des modèles de croissance corporelle et allométriques à l’aide de données de la littérature.

^b Valeurs issues d’une compilation de données de la littérature.

Tableau 2. Principaux paramètres utilisés dans le sous-modèle
« Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination » (ADME).

Phénomène biologique	Compartiment	Variable	Unité	Valeur initiale
Absorption intestinale	—	α_{abs}	%	99
Clairance hépatique	foie	K_{met}^a	j^{-1}	0,1
Hématocrite	plasma	Ht	%	26,8
Irrigation sanguine des tissus ^b	foie	$perf_{liver}$	$L.kg^{-1}.j^{-1}$	1200
	filet	$perf_{breast}$	$L.kg^{-1}.j^{-1}$	209
	cuisse	$perf_{leg}$	$L.kg^{-1}.j^{-1}$	163
	gras abdominal	$perf_{abd_fat}$	$L.kg^{-1}.j^{-1}$	95
Débit sanguin total ^c	plasma	Q_{tot}	$L.kg^{-1}.j^{-1}$	283

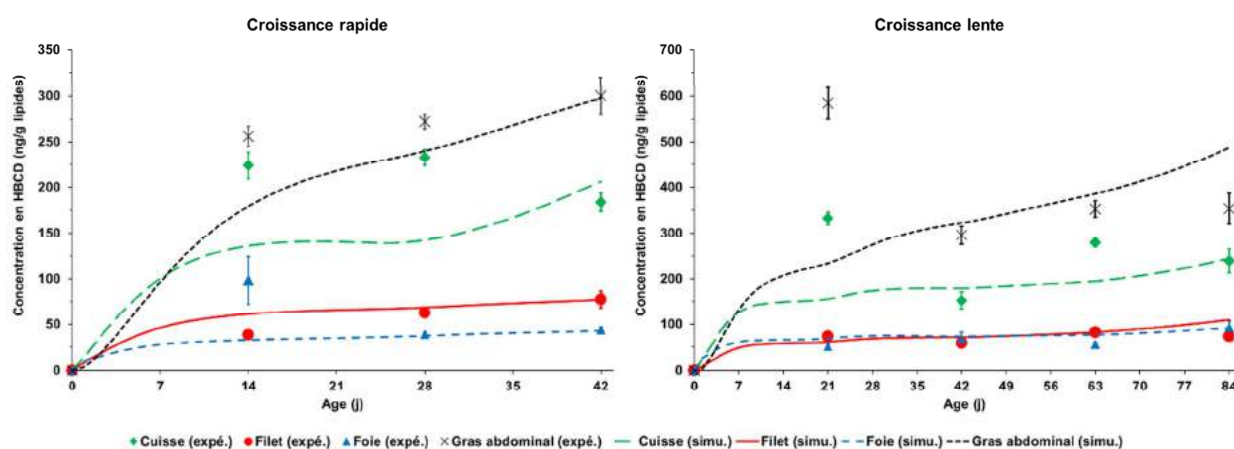
^a Constante de métabolisation ; ^b par kilo de tissu ; ^c par kilo de poids vif

Tableau 3. Sensibilité des sorties du modèle (concentrations d’HBCD dans les tissus) aux variations de différents paramètres du modèle.

Paramètres (X)		Concentration en HBCD (Y)	
Phénomène biologique	Compartiment	Compartiment	Relation entre variation du paramètre et variation de la concentration ^a
Clairance hépatique (K_{met})	foie	foie, filet, cuisse, gras abdominal, plasma, reste des tissus	$\Delta Y = 0,32 (\Delta X)^2 - 0,49 \Delta X - 0,01$
Teneur en lipides totaux	foie	foie, filet, cuisse, gras abdominal, plasma, reste des tissus	$\Delta Y = 0,18 (\Delta X)^2 - 0,51 \Delta X + 0,01$
Ratio lipides neutres:totaux	foie	foie	$\Delta Y = 0,60 \Delta X$
	filet	filet	$\Delta Y = 0,99 \Delta X$
	cuisse	cuisse	$\Delta Y = 0,99 \Delta X$
	gras abdominal	gras abdominal	$\Delta Y = 0,94 \Delta X$
	plasma	plasma	$\Delta Y = 1,04 \Delta X$

^a Exemple : si la relation est $\Delta Y = 0,80 \Delta X$, une variation de 10% du paramètre X (ΔX) se traduira par une variation de 8% de la sortie Y (ΔY).

Figure 2. Validation du modèle pour le poulet à croissance rapide et à croissance lente après réajustement des coefficients de partage ($K_{p,tissue}$) et de la constante de métabolisation (K_{met}). Les données expérimentales sont issues des travaux de Jondreville *et al.* (2017).



UNE GESTION MULTIDISCIPLINAIRE DU RISQUE DANS LES ABATTOIRS DE VOLAILLES : QUELLE ORGANISATION EN PRATIQUE ?

Salines Morgane^{1,2}, Allain Virginie¹, Magras Catherine², Le Bouquin Sophie¹

¹ Anses Laboratoire de Ploufragan, BP 53, 22440 Ploufragan, France

² UMR1014 SECALIM, INRA, Oniris, CP40706, 44307 Nantes, France

sophie.lebouquin-leneveu@anses.fr

RESUME

Les systèmes de surveillance sanitaire sont de plus en plus gérés de manière multipartite, en impliquant plusieurs acteurs se partageant les tâches. En France, le personnel des abattoirs de volailles, spécifiquement formé, est autorisé à participer aux tâches des auxiliaires officiels, sous la supervision et la responsabilité du Service Vétérinaire d'Inspection (SVI), et sur la base d'une analyse de risque. Pour organiser de manière efficace les interactions entre les parties prenantes dans cette gestion multipartite du risque, un système de contrôle basé sur l'alerte du SVI par l'abatteur est mis en place. Si la réglementation française définit des critères à surveiller ainsi que des valeurs seuil au-delà desquelles une alerte doit être déclenchée, différents systèmes de fonctionnement entre l'abatteur et les SVI peuvent être observés sur le terrain. Nous avons mené une étude de terrain visant à décrire les modalités d'alerte utilisées en pratique et à identifier l'impact de cette méthode innovante sur l'organisation du travail. Des entretiens semi-directifs ont été conduits dans trente abattoirs de volailles avec le vétérinaire / l'auxiliaire officiel et/ou avec le responsable / l'assistant qualité, séparément. Les entretiens ont été enregistrés et retranscrits et les données ont été analysées qualitativement. Plusieurs modes de fonctionnement ont été observés. Dans certains abattoirs, des tâches de contrôle sont réalisées à la fois par l'abatteur et par le SVI tandis que, dans d'autres situations, elles sont effectuées par le SVI uniquement en cas d'alerte par l'abatteur. Dans tous les cas, des procédures internes sont mises en place et permettent le déclenchement d'une alerte et sa gestion. Les outils de communication utilisés dépendent du degré de l'alerte ou de la qualité des relations entre les parties prenantes. Selon les interviewés, le système est efficace si l'organisation du travail est clairement décrite : définition des missions, mise en place de procédures spécifiques pour l'échange d'informations, programmes de formation. En conclusion, ce fonctionnement multipartite semble efficace grâce à des critères d'alerte adaptés, à la formalisation du système en amont et à la coopération entre les parties prenantes. Il responsabilise tous les acteurs et apporte la garantie que des actions correctives soient engagées en toutes circonstances.

ABSTRACT

A multidisciplinary risk management in poultry slaughterhouses: what organisation in practice?

Health surveillance systems are increasingly managed in a multiparty way, involving several stakeholders sharing tasks. In France, poultry slaughterhouse staff – specially trained – is allowed to participate in the tasks of official auxiliaries under the supervision and the responsibility of Official Veterinary Services (OVS) and on the basis of a risk analysis. To organize well the interaction between stakeholders in this multiparty risk management, a control system based on alerts from Food Business Operators (FBO) to OVS is implemented. If the French regulation sets indicators to be monitored as well as warning values, various modus operandi between FBO and OVS can be observed in practice. A field study was conducted in order to describe the alert ways used on the ground and to identify the impact of this innovative method on the work organization. Thirty poultry slaughterhouses were surveyed through semi-directive interviews led with both the official veterinarian/auxiliary and/or the quality manager/assistant, separately. The interviews were recorded and computationally transcribed; data were qualitatively analyzed. Several modus operandi were observed. Regarding control task division: in some slaughterhouses, several control tasks were performed both by the FBO and the OVS whereas, in other situations, control tasks were performed by OVS only in case of alert by the FBO. In all cases, internal procedures were implemented and allow alerts to be raised. Communication tools depended on the alert severity or on the quality of relations between stakeholders. According to the interviewees, this surveillance system is efficient if the work organization is clearly described: organization of positions, definition of missions and roles, implementation of specific procedures on information exchange and training programs. In conclusion, this multiparty system appears relevant thanks to adapted alert criteria, the system preparation and formalization and the cooperation between the stakeholders. It shares the responsibility and guaranties that corrective actions are implemented under all conditions.

INTRODUCTION

Selon les exigences réglementaires du Paquet Hygiène (Anonyme, 2004), l'inspection sanitaire officielle des volailles à l'abattoir se compose de plusieurs étapes successives. En particulier, à l'arrivée du lot, l'examen visuel d'un échantillon d'animaux est réalisé afin d'évaluer le statut sanitaire et les conditions de bien-être du lot, c'est l'inspection *ante mortem* (IAM). Pendant l'abattage, l'inspection *post mortem* (IPM) permet, sur la base de critères macroscopiques, de détecter et de retirer de la chaîne alimentaire toute carcasse impropre à la consommation humaine, soit pour des défauts de qualité, soit pour des raisons de sécurité sanitaire des produits. Au vu des spécificités de l'abattage des volailles (animaux en cage, taille importante des lots, cadence d'abattage élevée et automatisation de la chaîne, dangers zoonotiques généralement sans répercussion clinique ni lésionnelle), l'inspection des produits en abattoirs de volailles est particulièrement complexe. En France, le personnel des abattoirs de volailles, spécifiquement formé, est autorisé à participer aux tâches des auxiliaires officiels sur les produits, sous la supervision et la responsabilité du Service Vétérinaire d'Inspection (SVI), et sur la base d'une analyse de risque. Pour organiser de manière efficace les interactions entre les parties prenantes dans cette gestion multipartite du risque, un système de contrôle basé sur l'alerte du SVI par l'abatteur a été conçu sur les bases d'un travail scientifique (Allain et al. 2013) (Figure 1). Si la réglementation française a défini des critères à surveiller ainsi que des valeurs seuil au-delà desquelles une alerte doit être déclenchée, différents systèmes de coopération entre l'abatteur et le SVI peuvent être observés sur le terrain. Ainsi, notre étude a visé à décrire les modalités d'alerte utilisées en pratique sur le terrain et à identifier l'impact de cette méthode innovante sur l'organisation du travail.

1. MATERIELS ET METHODES

L'enquête sur le terrain a été menée grâce à des entretiens semi-directifs. Une grille d'entretien a été construite de manière à constituer un guide souple et pour que l'entretien ne dure pas plus d'1h30. Ces entretiens ont ensuite été conduits dans trente abattoirs de volailles avec le vétérinaire / l'auxiliaire officiel et/ou avec le responsable / l'assistant qualité, séparément. Les entretiens ont été réalisés par un seul enquêteur et enregistrés. Ils ont été intégralement retranscrits et les données ont été analysées de manière qualitative. Afin de représenter une grande diversité de situations à la fois en termes d'organisation de l'abattage et de pression d'inspection vétérinaire, des abattoirs à fort (> 15 000 tonnes par an) et moyen (de 2 000 à 15 000 tonnes par an) tonnages ont été inclus dans l'enquête. L'espèce abattue jouant un rôle sur l'organisation de l'abattage,

les alertes rencontrées et donc les caractéristiques de l'inspection vétérinaire, des structures abattant des espèces différentes ont été sélectionnées : poulet, dinde, canard gras et maigre, pintade. Enfin, nous avons souhaité enquêter des abattoirs ayant un niveau de sensibilisation et de connaissances varié vis-à-vis du système de critère d'alerte.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Population d'étude

Au total, 31 entretiens ont été réalisés – 9 avec des services qualité (correspondant à 10 interlocuteurs différents), 22 avec des services vétérinaires d'inspection (correspondant à 25 interlocuteurs différents). Sur les 39 abattoirs contactés, seuls 30 sites d'abattage ont finalement pu être enquêtés. Ils sont situés dans 13 départements différents, abattent toutes les espèces de volailles et types de production, et ont des tonnages et des organisations d'inspection variés.

2.2. Diversité dans l'organisation de l'inspection

Caractéristiques et missions des équipes. Les équipes du service qualité et du service vétérinaire d'inspection sont de tailles variées, entre une et quatre personnes pour les équipes qualité, et de deux à quatre personnes dans les équipes du service vétérinaire d'inspection. Lorsque les équipes qualité sont composées de plusieurs personnes, le rôle de chacun est variable. Dans certains cas, les assistants ou techniciens qualité sont en charge des missions de qualité sur le site, tandis que le responsable qualité gère plusieurs établissements du même groupe. Dans d'autres cas, assistants et responsables qualité n'effectuent pas les mêmes tâches : par exemple, l'assistant qualité s'occupe des fiches d'Information sur la Chaîne Alimentaire (ICA) et du contact avec les éleveurs, tandis que le responsable qualité gère la partie commerciale avec les clients et les relations avec les services vétérinaires. Le rôle des auxiliaires officiels (AO) est variable selon les établissements : parfois, les AO ont une grande autonomie, sont la plupart du temps seuls sur le site d'abattage, réalisent la majeure partie des tâches d'inspection des produits, et ne contactent le vétérinaire officiel (VO) qu'en cas de problème ; sur d'autres sites, AO et VO se partagent les tâches d'inspection des produits et travaillent ensemble.

Répartition des missions entre opérateurs et service d'inspection. Dans tous les abattoirs, des procédures internes sont mises en place et permettent le déclenchement d'une alerte et sa gestion. Néanmoins, la division des tâches de contrôle est variable selon les abattoirs (Figure 2). Dans tous les cas, les opérateurs industriels réalisent trois tâches de contrôle : l'analyse des fiches ICA, le contrôle *ante mortem* des animaux

et le contrôle *post mortem* des carcasses et abats. Dans la majorité des abattoirs, les services vétérinaires d'inspection ne réalisent que du contrôle de second niveau des actions menées par les opérateurs (contrôle aléatoire et inopiné de la bonne analyse des fiches ICA, contrôles *ante mortem* ponctuels, contrôles aléatoires de la bonne réalisation des retraits) et interviennent en cas d'alerte par l'abatteur. En revanche, dans les 5 abattoirs situés dans 2 des départements enquêtés, sur la plage horaire de travail des agents du SVI, certaines tâches de contrôle sont conduites en doublon, à la fois par les opérateurs de l'abattoir et par les agents du SVI (double analyse de toutes les ICA, double contrôle *ante mortem* de tous les lots). Dans les deux départements où le fait est observé, le double contrôle des ICA par l'abatteur et le SVI est un choix des vétérinaires officiels et de leur hiérarchie. Certains interlocuteurs du SVI justifient ce choix par une anticipation accrue et une possibilité d'organiser de manière optimale leur journée du lendemain ; d'autres par un manque de confiance envers l'abatteur, comme le déclare un vétérinaire officiel : « *Ca nous semble important de vérifier toutes les ICA. A un moment on avait allégé notre inspection et on s'est aperçus qu'il y avait des oublis donc on a décidé de toutes les voir.* » Un technicien qualité partage également cet avis : « *Moi je trouve que c'est bien, deux contrôles des ICA, parce qu'on abat quand même 500 000 poulets par jour.* » Néanmoins, un autre VO explique : « *Je suis très content d'avoir les ICA, même si je pense que ça responsabilise moins l'abatteur. Comme ils nous donnent toutes les ICA, je pense qu'ils se l'approprient moins cette notion de critères d'alerte.* »

Moyens de communication. Les outils de communication utilisés dépendent du degré de l'alerte ou de la qualité des relations entre les parties prenantes. Ainsi, dans tous les établissements, les enquêtés différencient ce qu'ils appellent des alertes qualifiées de « vraies » des alertes qualifiées de « mineures ». Les alertes mineures sont définies pour les critères d'alerte dits « classiques », rencontrés fréquemment et ne posant pas de souci particulier de gestion (par exemple, mesure décrite dans le Plan de Maîtrise Sanitaire) ; les interlocuteurs privilégient alors des voies de communication moins directes, tel que le mail. En revanche, pour des critères d'alerte dont le dépassement de la valeur seuil est inhabituel ou très élevé (signes cliniques sur les animaux réceptionnés, taux de mortalité transport très élevé, taux de retrait très élevé), les enquêtés déclarent préférer gérer les alertes au téléphone ou de vive voix lorsque cela est possible. Un vétérinaire officiel exprime ce changement de voie de communication de la façon suivante : « *Quand ils veulent vraiment notre avis, ils passent par un autre canal que l'alerte classique par mail.* »

2.3. Contraintes et opportunités de la gestion multipartite du risque

Pour les opérateurs de l'abattoir : entre pression et responsabilisation. Par cette organisation, les opérateurs de l'abattoir sont davantage responsabilisés, comme l'explique un vétérinaire officiel : « *C'est un travail d'équipe, je trouve ça bien qu'il y ait un premier tri réalisé par l'établissement, déjà parce que ça les sensibilise et ça les responsabilise.* » Néanmoins, ce système impose une pression certaine aux opérateurs de l'abattoir. Ainsi, un vétérinaire officiel explique : « *Pour les opérateurs aux retraits c'est une certaine forme de responsabilité qui n'est pas si évidente que ça à gérer. Pour tous, c'est une forme de responsabilité, mais ceux qui vont subir le plus de pression c'est les opérateurs aux retraits. A la fois parce qu'il y a les éleveurs qui viennent, et le directeur peut venir dire qu'il y a trop de retraits.* » Un responsable qualité déclare aussi : « *Les opérateurs ont une pression importante. C'est vrai qu'ils font du mieux qu'ils peuvent et quand derrière ils ont des remarques de la DDPP, y a certaines fois où ils savent plus trop où ils en sont. Une fois il y a eu un contrôle qui a été non conforme alors que les opérateurs venaient juste d'être formés, et ça les a découragés, ça a été très difficile.* »

Pour les services vétérinaires d'inspection : une diversification des missions. Nombre d'interlocuteurs du service vétérinaire d'inspection expliquent que ce système de critères d'alerte correspond davantage à leur vision de l'inspection vétérinaire en abattoir car il leur permet de diversifier leurs missions. Un vétérinaire officiel constate par exemple : « *On va plus sur un rôle d'encadrement des équipes, d'organisationnel, de rapport avec les professionnels, plutôt que sur un rôle technique de base. Pour moi c'est très positif.* » De même, un vétérinaire officiel discute avec son auxiliaire officiel et explique : « *Le fait de ne plus être sur chaîne permet de faire des choses qui peuvent être plus utiles, plus intéressantes. – (AO) oui plus enrichissantes que le fait d'ouvrir des ganglions ou des machins comme ça. – (VO) pour moi c'est une professionnalisation de l'inspection.* »

Pour l'ensemble des équipes : des contraintes organisationnelles. (1) Du côté des services vétérinaires d'inspection, des contraintes organisationnelles sont mises en avant, telles que le temps nécessaire pour la gestion des alertes, le fait que les alertes perturbent le planning, et la nécessité de formalisme. Par ailleurs, certains vétérinaires officiels ne voient pas l'intérêt de certains critères d'alerte et regrettent de perdre du temps à gérer des alertes auxquelles ils n'accordent que peu d'importance. Un vétérinaire officiel évoque plus particulièrement la difficulté de gérer les alertes à partir du contrôle *post mortem*, ne voyant pas quelles possibilités d'action sur le lot s'offrent à lui alors que

l'abattage est terminé, ne pouvant que constater un taux de retrait élevé et se sentant alors impuissant et frustré. (2) Du côté des services qualité, les principales contraintes évoquées sont le temps important consacré à la gestion des alertes, la réorganisation des postes et des tâches au sein de l'entreprise, la charge financière et l'investissement en temps et en organisation pour les formations. Ils regrettent également la lourdeur du formalisme (création de documents, enregistrements quotidiens, archivage, traçabilité des actions engagées etc.).

Un système jugé dans l'ensemble performant. Finalement, plusieurs vétérinaires officiels déclarent avoir confiance dans l'efficacité du système actuel : *« En alliant un système d'alertes, des passages inopinés, d'inspections produits, et surtout d'inspections process, ça fait une inspection qui est cohérente et efficace. En termes de produits, on passe toujours en inopiné, on trouve jamais une carcasse qui n'aurait pas dû être dans le frigo. »* Au global, la moitié des interlocuteurs des services qualité et tous les interlocuteurs des services vétérinaires d'inspection estiment que le système de critères d'alerte représente une évolution pertinente de leur métier et saluent la valorisation des compétences de chacun, comme l'explique un auxiliaire officiel : *« Nous, nous avons une compétence administrative, technique, eux ils ont une compétence terrain, c'est complémentaire. Même s'il y en a qui savent pas lire et écrire, ils ont une compétence terrain et faut pas leur enlever. »* Deux limites majeures sont néanmoins évoquées par nos interlocuteurs. (1) Du côté des services vétérinaires d'inspection, une confiance limitée qu'ils peuvent accorder à l'abatteur, du fait d'un manque de transparence dans certains établissements. Ainsi, un vétérinaire officiel déclare : *« C'est l'abatteur qui s'auto-contrôle, c'est très bien sur le papier mais c'est un non-sens pour certains abatteurs. Pour ici c'est un non-sens. »* (2) Du côté des services qualité, l'absence de retour de l'action engagée par les services vétérinaires d'inspection en cas d'alerte est un point fréquemment rapporté, comme l'explique un responsable qualité : *« Nous on joue notre rôle, les alertes on les fait, après comment c'est relayé derrière par les services vétérinaires, ça je ne sais pas. Quelle exploitation est faite réellement de toutes les informations qu'on leur donne, nous on n'a pas forcément le retour. »*

Un impact variable de la participation du personnel sur les relations intra- et inter-équipes. Pour 15 interlocuteurs sur 35, le système de contrôle basé sur critères d'alerte a une influence sur la nature des relations entre l'abatteur et le service vétérinaire. Certains interlocuteurs considèrent que le système est susceptible de dégrader les relations, comme l'explique un vétérinaire officiel : *« Le fait de ne plus faire les retraits, c'est plus difficile par rapport aux relations avec l'abatteur, il voit moins l'intérêt de*

notre rôle, on est plus perçus comme des empêcheurs de tourner en rond. On n'est plus sur la chaîne et on est assez nombreux maintenant, ils prennent ça pour du harcèlement. » Un autre vétérinaire officiel précise : *« On met la pression, ça peut mettre des tensions très conséquentes dans certains abattoirs. »* Deux vétérinaires officiels expliquent que ce système de critères d'alerte complique la gestion de leur équipe : *« Mes agents ont l'impression d'être tout le temps débordés par les alertes, les enregistrements, et que la réponse qu'on met derrière, c'est un peu juste pour faire une réponse... C'est un peu ce que me disait un agent "trop d'alertes tuent l'alerte". »* A l'inverse, plusieurs vétérinaires estiment que la mise en place de ce système permet d'intensifier les échanges avec l'abatteur : *« Indirectement c'est positif, c'est pas tant le critère d'alerte en soit, que le fait qu'on soit en relation. A travers ce système relationnel plus fréquent, il y a une habitude de relation qui se prend, sur d'autres thématiques que le critère d'alerte, l'établissement ne va pas hésiter à vous appeler pour un autre problème. »*

PERSPECTIVES ET CONCLUSION

L'Institut national de Veille Sanitaire a défini trois points clés conditionnant l'efficacité d'un système d'alerte (InVS, 2005) : (1) La capacité du système à détecter précocement une alerte : le système étudié apporte cette garantie, par la définition de critères d'alerte adaptés. Au vu des entretiens, certains critères ont cependant été jugés comme « devant évoluer » (par exemple le taux de retrait seuil au-delà duquel les SVI doivent être alertés). (2) La préparation minutieuse en amont du système et sa compréhension par les parties prenantes : l'organisation multipartite contribue à la structuration des activités et induit la mise en place de procédures internes dans tous les abattoirs enquêtés. Elle semble globalement être bien comprise et contribue à une meilleure appropriation du contrôle des produits par les abattoirs. (3) Les facultés de coopération, de discussion et de communication des parties prenantes : ces aspects sont variables selon les établissements et constituent la limite majeure à tout bon fonctionnement d'un système. En conclusion, ce fonctionnement multipartite innovant semble efficace grâce à l'élaboration de critères d'alerte adaptés et à leur bonne compréhension, à la formalisation du système en amont et à la coopération entre les parties prenantes. Il responsabilise tous les acteurs et apporte la garantie que des actions correctives efficaces soient engagées en toutes circonstances.

REMERCIEMENTS

Cette étude a bénéficié d'un financement du Ministère en charge de l'agriculture. Les auteurs remercient les abattoirs et les services vétérinaires ayant participé à l'étude.

REFERENCES

Allain A., Le Bouquin S., Donguy M.P., Magras C., 2013. Inspection sanitaire en abattoirs de volailles de chair – quelles missions ? quelle organisation ? 10ièmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, 475-479.

Anonyme, 2004. Règlement (CE) No 854/2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine.

Institut national de Veille Sanitaire, 2005. L'alerte sanitaire en France. Principes et Organisation. Disponible : http://www.invs.sante.fr/publications/2005/prsp/rapport_prsp.pdf, 77 p.

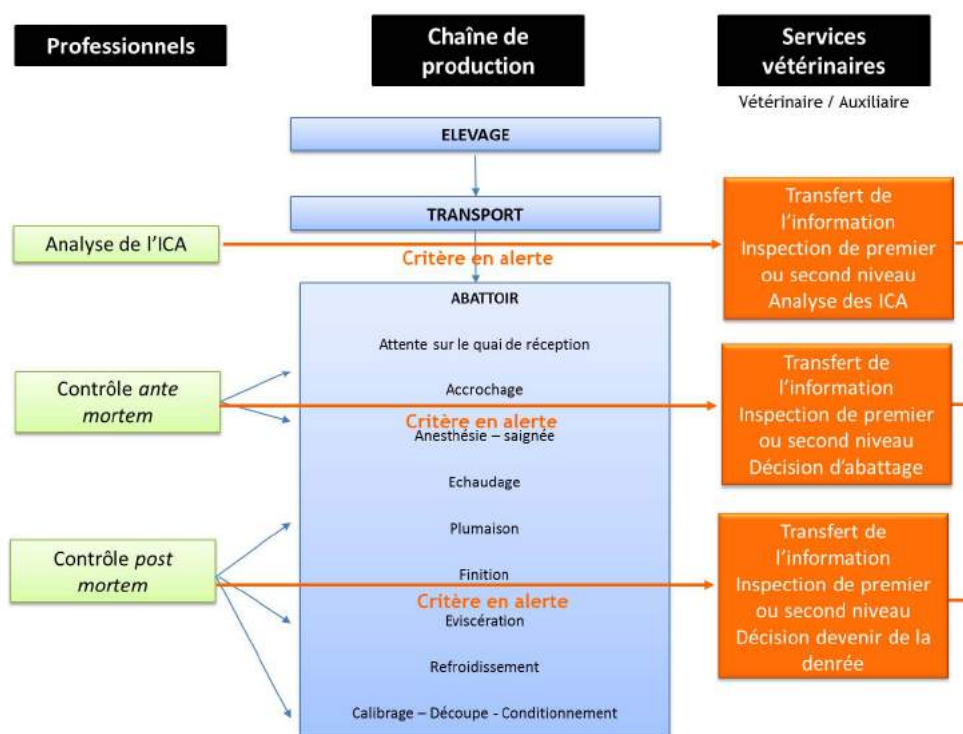


Figure 1 : Organisation de la gestion multipartite du risque sur la base d'alertes

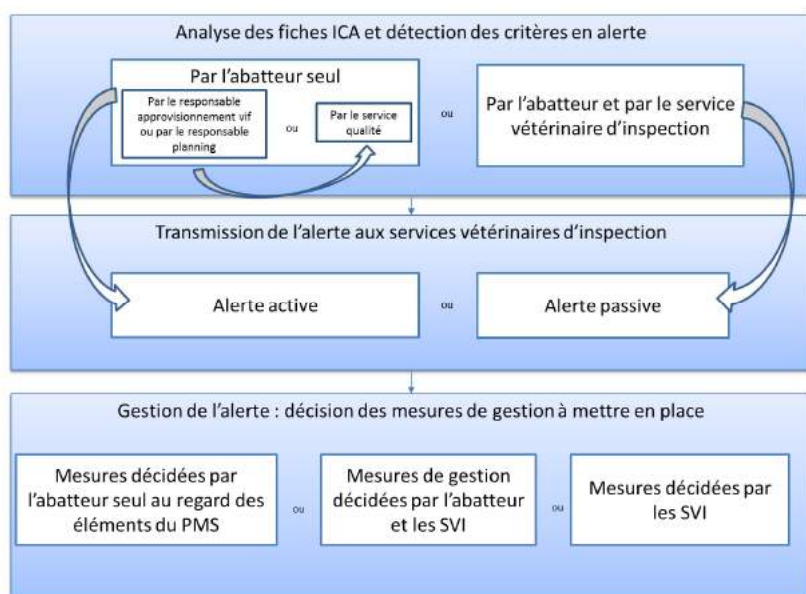


Figure 2 : Modalités de détection, de transmission et de gestion des alertes sur la fiche ICA dans les abattoirs enquêtés (n=30)

Pour la détection des critères en alerte, deux cas de figure ont été observés sur le terrain : soit les fiches ICA sont analysées uniquement par l'abatteur, soit elles sont analysées en doublon par l'abatteur et par le SVI, de manière séparée. Dans le premier cas (alerte active), l'abatteur lance une alerte active vers les SVI s'il détecte un critère en alerte, c'est-à-dire qu'il appelle le vétérinaire ou lui envoie un mail pour lui lister les lots à alerte de la journée. Dans le deuxième cas (alerte passive), il n'y a pas d'alerte à proprement parler : l'abatteur notifie sur la fiche ICA qu'un critère est en alerte mais il transmet au SVI toutes les fiches ICA de tous les lots, sans l'avertir spécifiquement de l'arrivée d'un lot à alerte. Ensuite, trois cas de figures possibles ont été observés pour la gestion de l'alerte : (1) soit les mesures de gestion sont décidées par l'abatteur seul, de manière autonome, conformément aux éléments du PMS ; (2) soit les mesures de gestion sont discutées par l'industriel et le SVI, avec généralement des mesures de routine mises en place par l'abatteur et un contrôle effectué par le SVI ; (3) soit une décision administrative est prise par les SVI. Ces trois cas de figure peuvent être observés dans un même abattoir selon le niveau d'urgence à gérer l'alerte.

Morgane Salines^{1,2}, Virginie Allain¹, Catherine Magras², Sophie Le Bouquin¹

¹ Anses, laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Epidémiologie et Bien-Être Avicoles et Cunicoles, BP53, 22440 Ploufragan

² UMR1014 SECALIM, INRA, Oniris, 44307, Nantes

morgane.salines@anses.fr

CONTEXTE et OBJECTIFS

Au vu des spécificités de l'abattage des volailles (animaux en cage, taille des lots, cadence élevée et automatisation de la chaîne ; dangers zoonotiques généralement sans répercussion clinique ni lésionnelle), l'inspection des produits en abattoirs est particulièrement complexe. En France, le personnel des abattoirs de volailles, spécifiquement formé, est autorisé à participer aux tâches des auxiliaires officiels sur les produits, sous la supervision et la responsabilité du Service Vétérinaire d'Inspection (SVI), et sur la base d'une analyse de risque. Pour organiser de manière efficace les interactions entre les parties prenantes dans cette gestion multipartite du risque, un système de contrôle basé sur l'alerte du SVI par l'abatteur a été construit et mis en place (Allain et al. 2013 JRA, 475-479). Notre étude a visé à décrire les modalités d'alerte utilisées en pratique sur le terrain et à identifier l'impact de cette méthode innovante sur l'organisation du travail.

MATÉRIEL et MÉTHODES

MÉTHODES D'INVESTIGATION & POPULATION D'ÉTUDE

- ✓ **Entretiens semi-directifs**
dits compréhensifs (Kaufmann, 2014)
trame d'une étude CAP
(Connaissances – Attitudes – Pratiques)
- ✓ **Auprès des vétérinaires et/ou auxiliaires officiels (SVI) ET des responsables et/ou assistants qualité (SQ)**

COLLECTE & ANALYSE DES DONNÉES

- ✓ **Réalisation des entretiens**
1h30 d'entretien, 1 seul enquêteur
En face à face, rdv téléphonique à défaut
Prise de notes + enregistrement si accord
- ✓ **Analyse des données**
Analyse horizontale et verticale
Retranscription des enregistrements + verbatims

UN ÉCHANTILLON D'ÉTUDE DIVERS

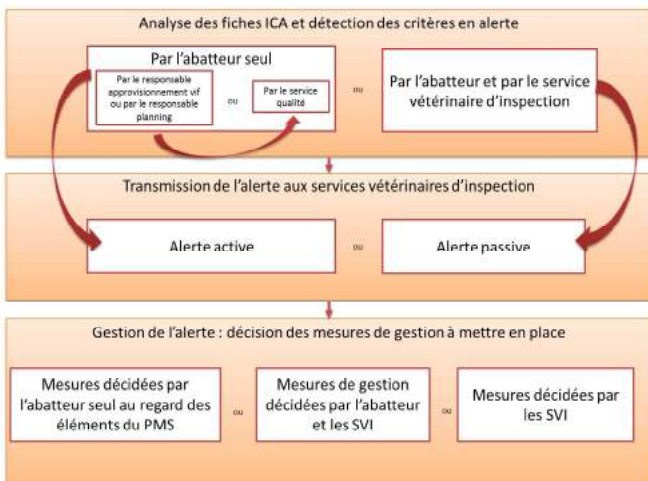
- ✓ **30 sites d'abattage**
espèces, tonnages, organisations variés, formés ou non
- ✓ **Entretiens : 22 avec les SVI**
- ✓ **9 avec les Services Qualité**



25  10

RÉSULTATS

UNE GRANDE DIVERSITÉ DANS L'ORGANISATION DE TERRAIN : EXEMPLE DE LA GESTION DES ICA



UN SYSTÈME JUGÉ DANS L'ENSEMBLE PERFORMANT

Au global, la moitié des interlocuteurs des SQ et tous les interlocuteurs des SVI estiment que le système de critères d'alerte représente une évolution pertinente de leur métier et saluent la valorisation des compétences de chacun : « En alliant un système d'alertes, des passages inopinés, des inspections produits, et surtout des inspections process, ça fait une inspection qui est cohérente et efficace » (SVI)

TRANSFORMER LES CONTRAINTES EN OPPORTUNITÉS

Pression & responsabilisation des opérateurs

SVI : « Pour les opérateurs aux retraits, c'est une certaine forme de responsabilité qui n'est pas si évidente que ça à gérer »

SQ : « Les opérateurs ont une pression importante »

Diversification des missions des SVI

SVI : « On va plus sur un rôle d'encadrement des équipes, d'organisationnel, de rapport avec les professionnels, plutôt que sur un rôle technique de base. Pour moi c'est une professionnalisation de l'inspection »

Confiance mutuelle = pierre d'achoppement

Indispensable. Très variable selon les établissements.



Contraintes organisationnelles

SVI : Temps de gestion des alertes, perturbation du planning, nécessité de formalisme

SQ : Temps de gestion des alertes, réorganisation des postes, formation, nécessité de formalisme, charge financière

Qui conduisent parfois à une certaine lassitude : « trop d'alertes tuent l'alerte »

Communication = clé de voûte

Parfois source de tensions, mais souvent fluide et indirectement bénéfique : « A travers ce système relationnel plus fréquent, il y a une habitude de relation qui se prend, sur d'autres thématiques que le critère, l'établissement ne va pas hésiter à vous appeler pour un autre problème » (SVI)

CONCLUSION

L'efficacité de ce dispositif est conditionnée à l'élaboration de critères d'alerte adaptés et à leur bonne compréhension, à la formalisation du système en amont et à la coopération entre les parties prenantes. Ce fonctionnement multipartite innovant responsabilise tous les acteurs et apporte la garantie que des actions correctives efficaces soient engagées en toutes circonstances.

APPORT DE L'IMAGERIE MEDICALE (TOMODENSITOMETRIE) POUR CONNAITRE LA COMPOSITION CORPORELLE DANS LES ESPECES AVICOLES

Marine Dewez¹, Francois Lecompte², Christelle Ramé³, Eric Venturi⁴, Christophe Staub⁴, Sylvain Brière¹, Joelle Dupont³, Pascal Froment³

¹Hendrix Genetics Turkeys France SAS, St-Laurent de la Plaine 49290, France, France,

²Plateforme CIRE, – Physiologie de la Reproduction et des Comportements - UMR INRA - CNRS (UMR 6175) - Université François Rabelais de Tours - 37380 Nouzilly,

³Equipe SENSOR INRA – Physiologie de la Reproduction et des Comportements - UMR INRA - CNRS (UMR 6175) - Université François Rabelais de Tours - 37380 Nouzilly, France,

⁴PEAO, – Physiologie de la Reproduction et des Comportements

Marine.Dewez@hendrix-genetics.com ; pascal.froment@inra.fr

RÉSUMÉ

Le métabolisme énergétique (en lien avec la croissance, la masse du tissu adipeux,...) est un modulateur important de la fertilité. Afin d'améliorer les performances de fertilité, nous avons évalué la faisabilité d'analyser la composition en tissu adipeux de 3 espèces avicoles d'importance autour de la période de stimulation lumineuse : la poule, la dinde et la pintade en utilisant des outils non invasifs tels que l'imagerie médicale (tomodensitométrie, CTScan) qui permettent de localiser le tissu. Chez ces 3 espèces, la composition en tissu adipeux varie entre 10 et 15 % en fonction de l'âge. Plus particulièrement, nous avons réalisé une cinétique d'engraissement chez la poule afin de la mettre en lien avec l'alimentation, la croissance, et la qualité des œufs. Pour cela, des poules de type chair (génétique Cobb) ont été nourries selon 2 régimes (*ad libitum*; régime restreint) de 3 semaines à 35 semaines d'âge. Sur cette période, des analyses ont été effectuées avec un scanner biomédical (Siemens Comme Définition; 100K Volta et 120 mA / s). 500 images ont été prises tous les 0,6 mm. Un traitement de l'image par seuillage a été utilisé pour quantifier le tissu adipeux. Nous avons calculé une corrélation r^2 de 0,94 entre le poids du tissu adipeux abdominal mesuré et le poids du tissu adipeux déterminé dans tout l'organisme *in vivo* par tomodensitométrie. La corrélation entre le poids corporel des poules et le volume de tissu adipeux déterminé *in vivo* est de $r^2=0,82$. La localisation et le développement du tissu adipeux a révélé des différences significatives dès l'âge de 6 semaines entre les lots *ad libitum* et restreint. Dans le groupe *ad libitum*, l'augmentation de volume du tissu adipeux est également associée à une concentration élevée en triglycérides plasmatiques et un début de la période de ponte plus précoce. Des mesures préliminaires de masse musculaire, de volume osseux et du foie ont été réalisées, et permettent d'ouvrir sur l'acquisition de nouvelles données qui pourraient être extrapolées avec les paramètres de fertilité ou de l'alimentation utilisée. En conclusion, ce travail montre l'importance du CTscan pour suivre l'évolution de la composition corporelle de façon non invasive, et de l'associer aux paramètres de croissance. Des expériences similaires sont en cours chez la dinde et la pintade.

ABSTRACT

Contribution of medical imaging (tomography) to a better knowledge of the body composition in poultry species

Energy metabolism (in connection with growth, adipose tissue, etc.) is an important modulator of fertility. In order to improve performance in fertility, we have evaluated the feasibility to analyze the adipose tissue composition in 3 poultry species: chicken, turkey and guinea fowl by using a non-invasive method such as medical imaging (computed tomography, CTScan). In these 3 species, the adipose tissue composition varies between 10 and 15% depending the age. In particular, we carried out kinetics of fattening in the hen to associate it with the feeding, growth, and egg quality. In the experiment, meat-type chickens (Cobb genetics) were bred with 2 diets conditions (*ad libitum* and restricted diet) from 3 weeks to 35 weeks of age. During this period, analyzes were performed with a biomedical scanner (Siemens, 100K Volta and 120mA / s). 500 images were taken every 0.6 mm. Image processing by thresholding was used to quantify adipose tissue. We calculated a correlation r^2 of 0.94 between the weight of the abdominal adipose tissue measured and the weight of the adipose tissue determined throughout the organism *in vivo* by computed tomography. The correlation between the chicken body weight and the volume of adipose tissue determined *in vivo* is $r^2 = 0.82$. The location and development of adipose tissue revealed significant differences as early as 6 weeks between *ad libitum* and restricted groups. In the *ad libitum* group, the increase in volume of adipose tissue is also associated with a high plasma triglyceride concentration and early onset of the laying period. Preliminary measurements of muscle, bone and liver volume have been measured, and allow opening new perspectives on the acquisition of new data that could be extrapolated with the feed and fertility parameters. In conclusion, this work has shown the importance of the CTscan to follow the evolution of the body composition in a non-invasive method, and to associate it with the growth parameters. Similar experiments are underway in turkey and guinea fowl.

INTRODUCTION

L'élevage intensif et la sélection génétique de poule reproductrice de type chair a entraîné au cours du temps une production d'animaux de plus en plus lourds susceptibles de développer des troubles métaboliques et reproductifs (Richards et al. 2007). L'une des solutions mise en place pour pallier à ces différents désordres a été d'appliquer un régime alimentaire contrôlé (alimentation restreinte) mais qui, en conséquence, entraîne des comportements d'agressivité et de stress (de Jong et al. 2002) remis en cause par l'Europe. De nombreux travaux comparant une alimentation *ad libitum* par rapport à une alimentation restreinte montrent des effets de la restriction alimentaire sur le bien-être, la croissance, la composition corporelle et la production d'œufs (Hocking et al. 1996 ; Robbins et al. 1986 ; Joseph et al. 2000). Toutefois, la cinétique de développement de certains organes sensibles à l'alimentation comme le tissu adipeux, le foie, dans les souches actuelles restent mal connues. Afin de mieux connaître le profil de développement de la poule reproductrice de type chair, et de pouvoir adapter un régime alimentaire plus précis en vue d'améliorer la performance de la fécondité, nous avons étudié la composition corporelle à l'aide de l'imagerie médicale.

Nous avons évalué la cinétique de l'engraissement, le taux de croissance, la qualité des œufs et la composition de l'animal à l'aide d'outils non invasifs tels que l'imagerie médicale et notamment l'utilisation de la tomographie par ordinateur (CT-scan). Cette technique permet de mieux suivre l'évolution de la condition corporelle et de la relier à la fertilité. De plus, un atout majeur de cette technique d'imagerie anatomique est d'accéder à la composition sur un même animal au cours de sa croissance de manière éthique.

1. MATERIELS ET METHODES

Le protocole mis en place a reçu un avis favorable par le comité d'éthique (CEEA VdL) sous la référence du dossier : 01607.02

1.1. Les animaux

Les analyses ont été réalisées sur un lot de 320 poussins femelles de type chair (parentaux Cobb 500, Hendrix Genetics) et ont été répartis, au sol, en groupes homogènes de 10 dans 32 parquets de 3 m² et élevés au sein de l'Unité Expérimentale du Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours (UE-PEAT) selon les conditions classiques d'élevage, c'est-à-dire 14h de lumière à leur arrivée suivie d'une diminution progressive de l'exposition à la lumière jusqu'à atteindre 8 heures de lumière au moment de la ponte (21^{ème} semaine) puis une augmentation progressive de

l'exposition à la lumière jusqu'à atteindre 15h de lumière à la fin de l'étude (39^{ème} semaine).

Par ailleurs en vue d'élargir l'utilisation du CT-Scan à d'autres espèces avicoles, des essais de faisabilité ont été réalisés sur la pintade et la dinde. Nous ne présentons en fin d'étude que les données sur des dindes à l'âge de 27, 30 et 31 semaines prélevées sur des fermes commerciales et euthanasiées.

1.2. Les régimes alimentaires

Les poules reproductrices Cobb500 ont reçu une alimentation de démarrage de type *ad libitum* du 1^{er} jour à la 3^{ème} semaine. A partir de la 3^{ème} semaine les poules ont été séparées en deux groupes. Un premier groupe (n=160) a reçu une alimentation restreinte permettant de suivre la courbe théorique de poids fournie par le guide d'élevage et le second groupe (n=160) a reçu une alimentation plus importante dite « *ad libitum* » permettant une croissance 1,7 fois plus importante que chez les animaux *restreints*.

1.3. Mesures de l'engraissement par scanner

Le poids corporel de l'ensemble des poules a été mesuré de l'âge de 3 semaines à l'âge de 39 semaines. Une analyse par imagerie de 4 poules par condition, qui ont été sélectionnées au hasard, a été réalisée de l'âge de 8 semaines à 35 semaines (Figure 2).

Les acquisitions ont été réalisées avec un CT biomédical (Siemens As Definition) avec les paramètres suivants: balayage de 100 kV et 120 mA avec une épaisseur de 0,6 mm (500 images), et un pitch de 0,45. Un filtre de reconstruction Safire I26 a été utilisé pour mieux caractériser les tissus adipeux. Le traitement des images par seuillage a été utilisé pour quantifier et surveiller le tissu de 4 à 35 semaines (Figure 1). Le même volume de voxel (résolution) a été utilisé dans toutes les analyses réalisées. Des échantillons de différents tissus ont été analysés au CT-Scan pour calibrer l'analyse d'image par la suite.

Une analyse de la composition en matière grasse de la carcasse a été réalisée à partir de 21 semaines et à 39 semaines par mesure du poids du tissu adipeux abdominal.

1.8. Analyses statistiques

Les résultats sont représentés sous forme de moyenne $\pm$ SEM et avec un niveau de significativité inférieur à 0.05 (*P<0.05).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Le but de la présente étude est d'évaluer la composition corporelle des poules reproductrices, dans le cadre d'un contexte de production standard, au

cours de leur croissance et pendant la période de ponte.

2.1. Développement de la masse grasseuse

Les animaux restreints augmentent leur volume de tissu adipeux de 10 fois entre l'âge de 4 ($17 \text{ cm}^3 \pm 1$) à l'âge de 35 semaines ($164 \text{ cm}^3 \pm 11$), et ceux *ad libitum* l'augmentent de 5 fois (4 semaines : $85 \text{ cm}^3 \pm 14$ vs 35 semaines : $395 \text{ cm}^3 \pm 19$).

Aux âges de 4 et 13 semaines, le régime alimentaire induit un volume 5 fois plus important du tissu adipeux entre les restreints et ceux *ad libitum* (restreint : $17 \text{ cm}^3 \pm 1$ vs *ad libitum* : $85 \text{ cm}^3 \pm 14$). Puis de l'âge de 17 à 35 semaines, le volume moyen du tissu adipeux est 2 fois plus important entre les 2 lots (restreint : (17 semaines) $63 \text{ cm}^3 \pm 11$ à (22 semaines) $164 \text{ cm}^3 \pm 1$ vs *ad libitum* : (17 semaines) $145 \text{ cm}^3 \pm 27$ à (22 semaines) $323 \text{ cm}^3 \pm 37$). L'augmentation du tissu adipeux est associée à une concentration élevée de triglycérides plasmatiques et au début de la ponte.

A l'âge de 39 semaines, environ 20 poules par condition ont été analysées au CT-scan et le poids de la graisse abdominale a été pesé. Nous avons calculé une corrélation positive significative entre le poids du tissu adipeux abdominal mesuré *ante mortem* et le volume du tissu adipeux déterminé précédemment *in vivo* par tomодensitométrie ($R^2 = 0,94$) (Figure 3). La corrélation entre le poids corporel des poules des 2 groupes et le volume de tissu adipeux déterminé *in vivo* est de $R^2 = 0,82$.

La localisation des dépôts de masse grasseuse se situe majoritairement dans l'abdomen et au niveau du dos (Figure 4).

2.1. Corrélation entre le taux de ponte et la masse grasseuse

Le groupe restreint a présenté un retard de 3 semaines du début de la ponte et une faible augmentation des taux de triglycérides. De plus, les poules présentant un engraissement $> 200 \text{ cm}^3$ produisent des œufs plus lourds et moins fertiles liés à une augmentation de la mortalité embryonnaire (Figure 5).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Richards, M. P., and M. Proszkowiec-Weglarz, 2007. Poultry Science 86(7): 1478–1490.
 Hocking, P. M., M. H. Maxwell, and M. A. Mitchell, 1996. British Poultry Science 37(2): 263–278.
 de Jong, I. C., S. van Voorst, D. A. Ehlhardt, and H. J. Blokhuis, 2002. British Poultry Science 43(2): 157–168.
 Robbins, K. R., G. C. McGhee, P. Osei, and R. E. Beauchene, 1986. Poultry Science 65(12): 2226–2231.
 Joseph, N. S., F. E. Robinson, D. R. Korver, and R. A. Renema, 2000. Poultry Science 79(12): 1790–1796.

2.3. Perspectives de mesures d'autres tissus (foie et le muscle)

En plus des mesures réalisées sur la masse adipeuse, l'analyse au CT-Scan permet de déterminer le volume osseux et le volume musculaire (Figure 6). Une estimation des muscles pectoraux, des volumes du foie et du squelette pourrait être extrapolée au poids des organes et corrélée avec les paramètres de fécondité.

Enfin, en vue d'étendre l'utilisation du CT-Scan pour l'étude de la composition corporelle d'autres espèces avicoles majeures, nous avons réalisé une première analyse sur 6 dindes respectivement âgées de 27, 30 et 31 semaines (début de ponte à 30 semaines), où nous avons mesuré le volume du tissu adipeux, musculaire et du volume osseux (Figure 7). Le volume du tissu adipeux diminue juste après le début de ponte à l'âge de 31 semaines.

CONCLUSION

En conclusion, l'utilisation de la tomодensitométrie a permis d'obtenir des données de composition corporelle au cours de la croissance et en fonction des régimes alimentaires des poules. Ces analyses peuvent être associées à des données physiologiques et biochimiques. En perspective, ces outils permettront de mieux quantifier, voire prédire l'engraissement pour optimiser la productivité des animaux.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été soutenu par Région Centre Val de Loire avec les projets «Oxyferti» et «Adipofertikine» ainsi que le Réseau MiDi (Milieux et Diversité). Nous tenons à remercier les animaliers de l'UE-PEAT et plus particulièrement Frédéric Mercierand, Harold Rigoreau et Maxime Marchand.

Figure 1. Images au CT-Scan d’une poule reproductrice en ponte, et reconstruction 3D de l’anatomie de la poule avec les tissus osseux et musculaires (bas droit).

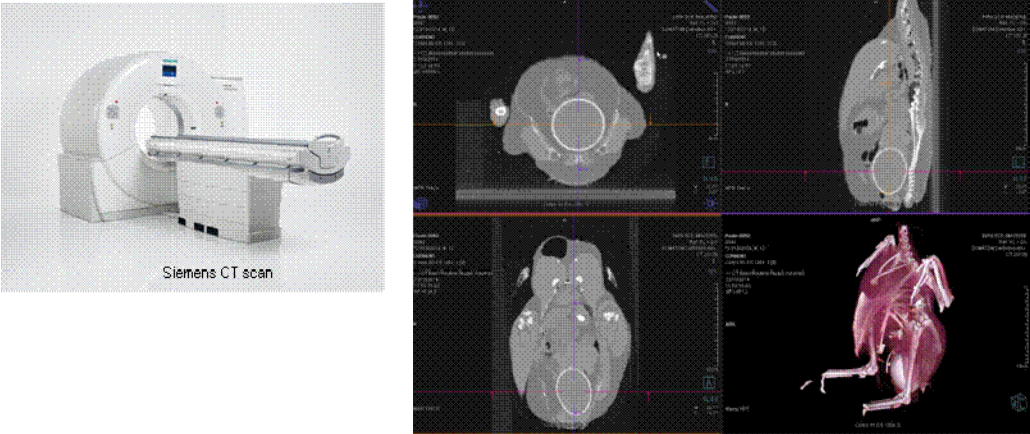


Figure 2. Cinétique du poids corporel et du volume du gras abdominal dans les 2 lots de poules reproductrices

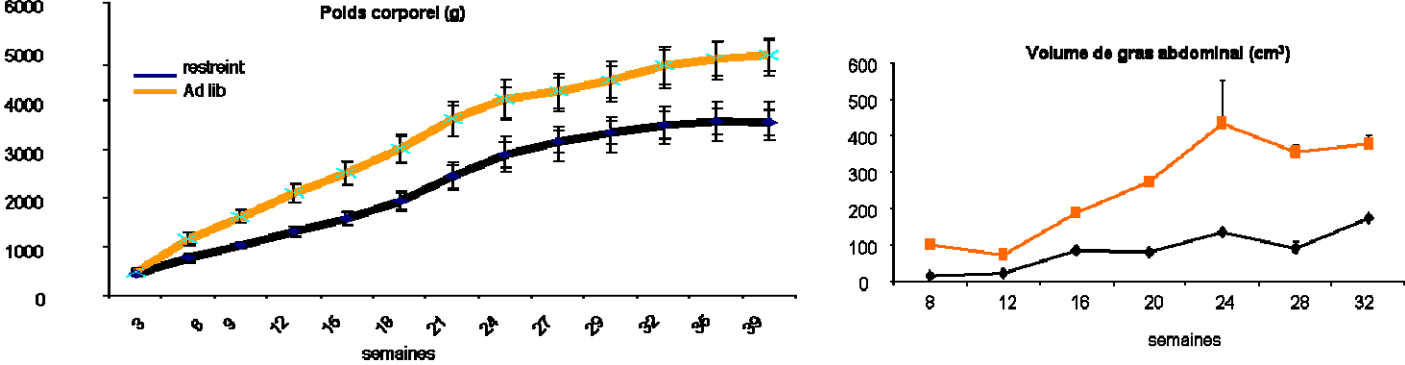


Figure 3. Corrélation entre le volume de gras abdominal mesuré au CT-Scan et du poids de gras abdominal

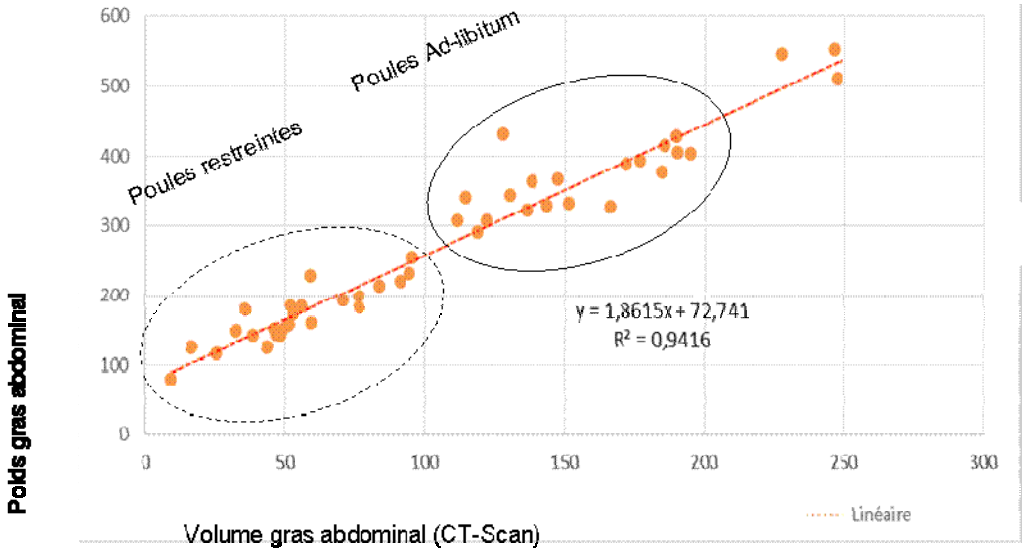


Figure 4. Images au CT-Scan du volume 3D du tissu adipeux chez la poule reproductrice (*ad libitum* et restreintes)

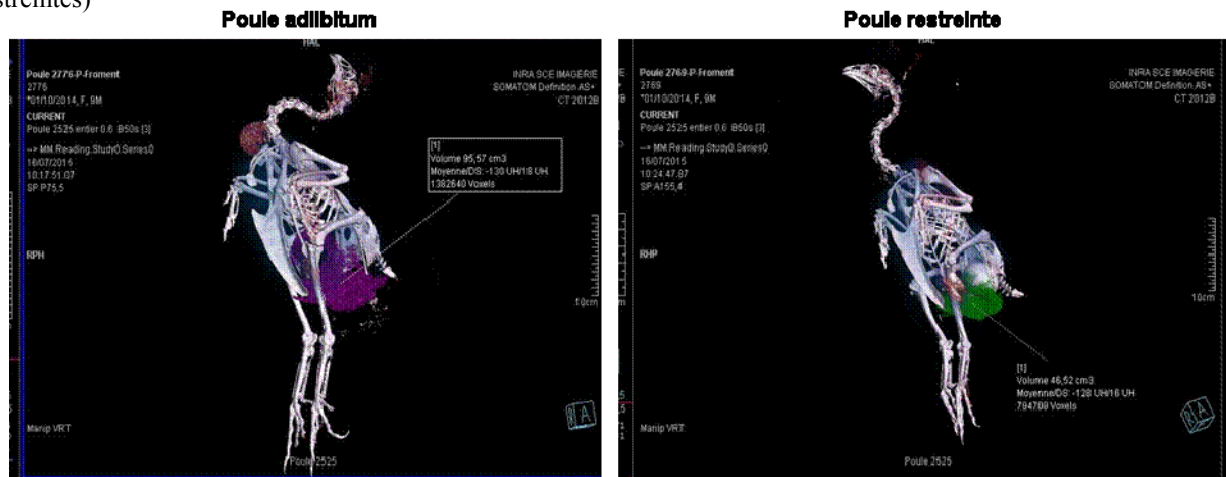


Figure 5. Mesures du poids de l'œuf (g) et du pourcentage d'œufs éclos dans les 2 lots de poules reproductrices (*ad libitum* et restreintes)

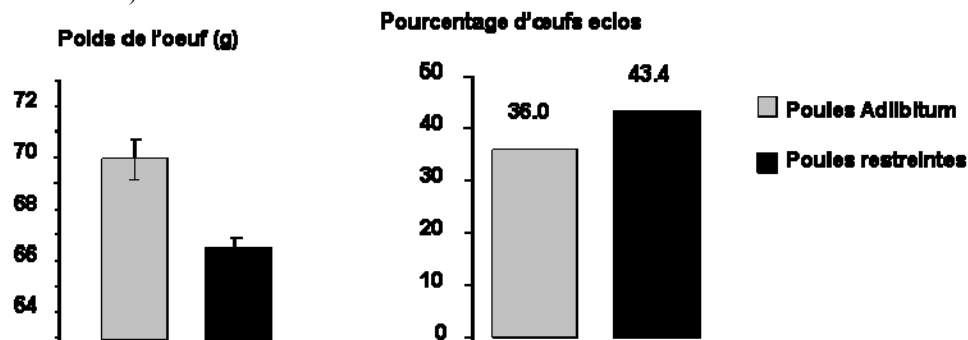


Figure 6. Images au CT-Scan du volume musculaire et du volume osseux chez la poule reproductrice

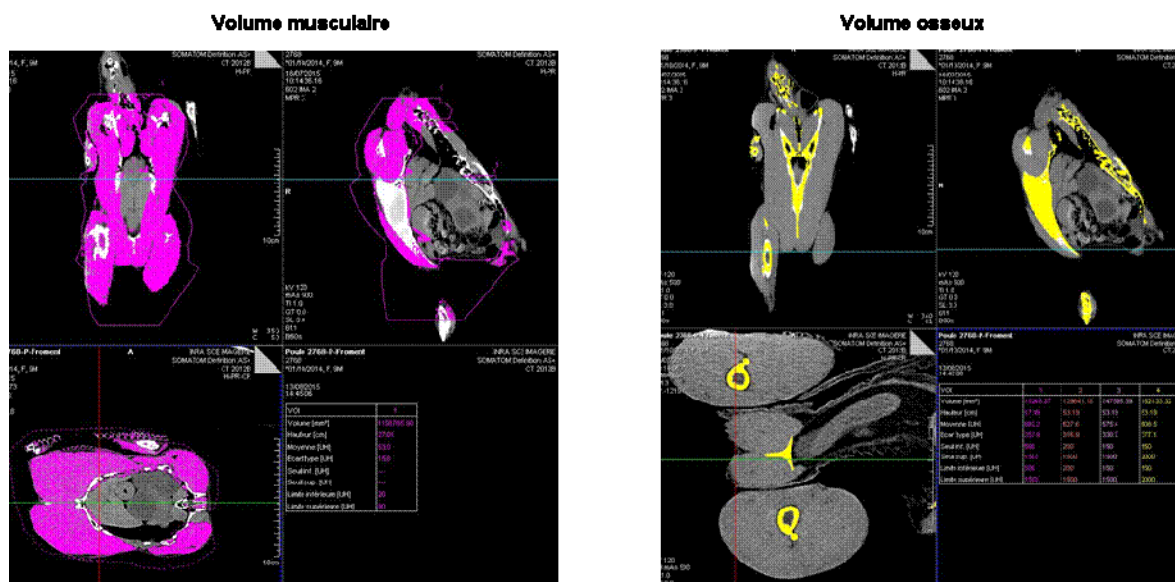
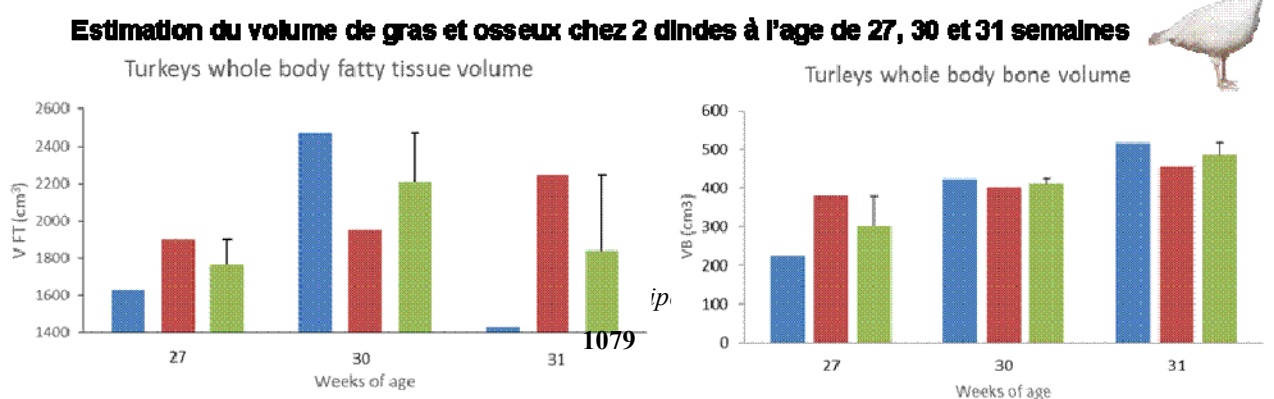


Figure 7. Estimation du volume de gras et osseux chez 2 dindes à l'âge de 27, 30 et 31 semaines.



PHYLOGENIE, MARQUEURS DE VIRULENCE ET ANTIBIORESISTANCE DE 87 SOUCHES DE ESCHERICHIA COLI ISOLEES DE LA VIANDE DE POULET DE CHAIR COMMERCIALISEE DANS LA WILAYA DE JIJEL (EST ALGERIE)

D. Boudjerda^a b H. Brugère^b, D. Bibbal^b and M. Lehouel^a

^a*Laboratory of pharmacology and phytochemistry. University of Jijel, Algeria.*

^b*INSERM, UMR1043, F-31300 Toulouse, France*

^d*Laboratory of molecular toxicology. University of Jijel, Algeria*

Laboratory of pharmacology and phytochemistry. University of Jijel, Algeria

boudjmel@yahoo.fr

RÉSUMÉ

Dans le but de mener une enquête épidémiologique sur : la phylogénie, les marqueurs de la virulence et l'antibiorésistance des souches d'*Escherichia coli* commensales présentes dans les produits alimentaires, Quarante-huit (85) souches d'*Escherichia coli* ont été isolées de 100 échantillons de viande de volaille fraîche commercialisés dans des boucheries localisées dans région Jijel (Algérie De l'est). Les résultats obtenus montrent que les groupes phylogénétiques A et B1 sont prédominants avec des taux respectifs de 67.5% et 16.9% suivis par B2 4.7% et D 11.76%. Les résultats des test de sensibilité aux antibiotiques révèlent trois grands groupes d'antibiotiques et plus de 13 antibiotypes, le premier rassemble les souches qui présentent 50% à 70% de résistances pour l'Ampicilline, l'Amoxicilline, la Triméthoprim, la Sulphonamide, la Tétracycline, le second rassemble les souches qui présentent 20% à 50% de résistances à l'Amoxicilline + acide Clavulanique, la Kanamycine, la Streptomycine, la Ciprofloxacine, la Flumequine et la Neomycine) et le troisième rassemble les souches qui présentent moins que 20% résistances pour la Cephalothin, et la Colistin. Les résultats du criblage des gènes de virulence par PCR montrent la prédominance des souches porteuses des gènes qui codent pour les facteurs de virulence affectés aux Extraintestinal pathogenic d'*Escherichia coli* (EPEC) avec un taux de 2,4% et l'existence des souches porteuses de gènes virulence caractéristiques des entéroagréatives *Escherichia coli* (EAEC) et les entéroinvasives *Escherichia coli* (EIEC). Nous avons aussi noté que les souches appartenant aux groupes phylogénétiques A et B1 présentent moins de facteurs de virulence et un taux de résistance aux antibiotiques alors que les souches appartenant aux groupes phylogénétiques B et D présentent un potentiel en facteurs de virulence élevé et des taux de résistances aux antibiotiques relativement bas.

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the prevalence, phylogeny, virulence markers and antibiorésistance of commensal *Escherichia coli*. In order to get this objective Eighty-five (85) *Escherichia coli* isolates were obtained from 100 chicken meat samples commercialised in butcheries localised in Jijel area (East Algeria). The results of this study showed that strains belonged to phylogenetic groups A and B1 which were the most common with respectively 67.5% and 16.9% followed by B2 4.7% and D 11.76% groups. AntibioGramme results revealed three great antibiotic resistant strains groups and more than one hundred antibiotype. The first strain group includes resistant strains to Ampicillin, Amoxicillin, Trimethoprim, Sulphonamid Tetracycline with the rates between 50% and 70% of all resistant strains. The second one has 20% to 50% of resistant strains to Amoxicillin plus Clavulanic acid, Kanamycin, Streptomycin, Ciprofloxacin, Flumequin, Neomycin. And the third group includes less than 20% of resistant strains to Cephalothin, Gentamicin and Colistin Furthermore, antibiorésistance to Flumequin, Trimethoprim, Sulfamethoxazole-Trimethoprim, and Tetracycline are more frequent in analysed chicken meat samples. PCR investigation showed the predominance of strains with Extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) virulence factors related genes (2,4 %) and the presence of strains with EAEC and EIEC genes. We noted thus that strains carrying more than two virulence factors are belonged to B2 or D phylogenetic groups and present less resistance to antibiotics whereas strains belonged to group A or B1 present less virulence factors and high rate of antibiorésistance.

INTRODUCTION

La sécurité et l'innocuité des produits alimentaires restent des préoccupations primordiales aussi bien pour le consommateur que pour le producteur. En effet, plusieurs travaux montrent l'implication des produits alimentaires et particulièrement d'origine animale comme la viande bovine ou la viande de volaille dans les toxoinfections alimentaires. L'une des bactéries les plus incriminée est *Escherichia coli* et qui est normalement une bactérie commensale de l'intestin de l'homme et des animaux (Holko et al., 2006). Durant les vingt dernières années plusieurs travaux ont montré la capacité impressionnante de cette espèce à incorporer dans son génome différents gènes se trouvant à sa portée en lui conférant ainsi des aptitudes de virulence et des résistances aux antimicrobiens très variables. Actuellement les souches issues de l'évolution génomique de cette bactérie sont classées en groupe phylogénique (A, B1, B2 et D) et en groupe de pathovars comme par exemple les enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) et les Extraintestinal pathogenic *E. coli* ExPEC.

Dans le but d'estimer le risque sanitaire de la large consommation de ses produits alimentaires nous nous sommes proposés (i) de constituer une collection de souches isolées à partir de la viande de poulet de chair commercialisée dans les boucheries traditionnelles de la région de Jijel (Est Algérie) puis (ii) de faire un criblage des gènes de virulences et enfin (iii) de faire une estimation de la sensibilité des souches isolées aux molécules d'antibiotique utilisées en médecine humaine et animale en Algérie.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Echantillonnage

100 échantillons de viande de poulet de chair ont été prélevés dans 10 boucheries implantées dans les différentes régions de la wilaya de Jijel (Est Algérie) puis acheminés dans des conditions adéquates d'asepsie et de température au laboratoire du département de microbiologie de l'université Mohamed Sedik BEN YAHIA, Jijel, Algérie. L'isolement et les identifications des souches de *E. coli* ont été effectués selon la méthode décrite par Carbonnelle et al 1987.

1.2. Recherches des groupes phylogéniques des souches isolées

Nous avons fait la recherche des groupes phylogéniques de l'ensemble des souches isolées par la méthode décrite par Clermont et al., 2000. Les ADN des souches de références adéquates ont été utilisés.

1.3. Criblage des gènes de virulence par PCR pour souches isolées de *E. coli*

Pour l'ensemble des souches nous avons procédé à la recherche de 10 gènes de virulences caractéristiques des ExPEC (*sfa/focDE*, *kpsMT* K1, *hlyA*, *papEF*, *afa/draBC*, *fyua*, *clbN*, *hlyF*, *fliA*, *cnf*), 3 gènes de virulence caractéristiques des EAEC (*AProbe*, *aap*, *et aggr*), et 1 gène de virulence caractéristique de EIEC (*ipah*). L'extraction de l'ADN génomique et le criblage de l'ensemble gènes de virulence ont été effectués selon la méthode décrite par Alpha et al.(2013). Les ADN des souches de références adéquates et recommandées ont été utilisés.

1.4. Détermination de la résistance phénotypique des souches isolées

Enfin, nous avons procédé à la recherche de la résistance phénotypique des souches isolées par la technique des antibiogrammes. Les antibiogrammes ont été effectués selon les recommandations du CLSI (CLSI, 2006). Nous avons en effet utilisé un milieu gélosé non sélectif de Mueller-Hinton. Afin de cibler les principales familles d'antibiotiques, 16 disques d'antibiotiques de chez Biorad ont été utilisés: Tétracycline (Tet) 75 µg, Ampicilline (Amp) 10 µg, (Amoxicilline + Clavulanic acid) (Amx+AC) (20+10 µg), Amoxicilline (Amx) 25 µg, Colistine (CT) 50µg, Cephalotine (CF) 30 µg, Chloramphenicol (C) µg, Gentamicine (Gn) 10 µg, Kanamycine (K) 30 µg, Streptomycine (S) 10 µg, Neomycine (N) 30 µg, Ciprofloxacine (Cip) 5 µg, Trimethoprim (TMP) 5 µg, Flumequin (UB30) 30 µg, Sulfamethoxazole-Trimethoprim (Sxt) (23.75 µg + 1.25 µg), L'interprétation des résultats a été réalisée selon les recommandations du CLSI (CLSI, 2010) et la souche *E. coli* ATCC 25922 a été utilisée comme contrôle.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Collection des souches *E. coli*

Les analyses microbiologiques des échantillons de la viande de poulet de chair nous a permis d'isoler et d'identifier 85 souches de *E. coli*, ce qui implique que 85% des échantillons testés étaient souillés par des coliformes.

2.2. Criblage des groupes phylogéniques par PCR conventionnelle

Les résultats du criblage des groupes phylogéniques par PCR conventionnelle montre la prédominance des souches du groupe phylogénique A avec un taux de (62.35%), suivi par le groupe B1 avec un taux 18 (21.17%), D 10(11.76) et B2 avec un taux de 4 (4.7%).

Des résultats comparables ont été retrouvés par Unno et al., 2009, mais les résultats de Soufi et al. (2009) ont montré un nombre supérieur de souches du

groupe phylogénique D que celui que nous avons retrouvé. Figure(1)

2.3. Criblage des gènes de virulence

La prévalence des gènes de virulence caractéristique des souches appartenant au groupe des ExPEC étaient les plus élevés avec (24/85) soit 28,23% pour *hlyf*, *afa* (3.52%) (3/85), *fyuA* 11.76% (10/85) *clbN* 2.35% (2/85), suivi par le groupes des EIEC avec une souche porteuse de (*ipah*) soit (1.17%) et en fin une souche du groupe des EAEC porteuse du gène *aap* soit (1.17%) (1/85). Nous notons aussi l'absence des gènes de virulence *aggr*, *cnf*, *sfa/focDE*, *kpsMT* (*K1*), *and afa/draBC* pour l'ensemble des souches testées. Nos résultats sont en accord avec les travaux Johnson et al. (2005) et qui a montré que 46% des échantillons de poulet de chair de 10 supermarchés dans la région de Minneapolis–St.Paul (USA) durant 2001–2003 étaient contaminés par des souches ayant au moins un gène de virulence caractéristiques des ExPEC. Il est important de signaler que les souches appartenant aux groupe des ExPEC sont généralement responsables des maladies du tractus urogénital et de différentes maladies septicémiques chez l'homme et l'animal (Manges, A., and Johnson, J.R., 2012) Figure (2).

2.4. Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques

Le test de sensibilité aux antibiotiques de l'ensemble des souches a révélé une prévalence de résistance élevée aux tétracyclines avec 96.41% (82/85) de souches résistantes, suivi par l'Amoxicilline et la Sulphonamide avec 51.76% (44/85), l'Ampicilline 50.58% (43/85), la Sulfaméthoxazole-triméthoprim 48.23% (41/85), la Triméthoprim 44.70% (38/85), la Stréptomycine 34.11% (29/85), la Kanamycine et la Fluméquine 25.88% (22/85), la Ciprofloxacine 18.82% (16/85), l'Amoxicilline+ acid Clavulanique, la Néomycine 15.29% (13/85), la Colistine 11.76% (10/85), le Chloramphénicol 10.58% (9/85) et la Céphalotine 3.52% (3/85) Figure (3). En revanche,

l'ensemble des souches testées ont montré une sensibilité à la gentamycine. L'analyse des résultats du test de sensibilité aux antibiotiques nous a aussi permis de distinguer 13 groupes d'antibiogrammes majeurs, avec un groupe qui présente une résistance phénotypique à 13 molécules d'antibiotiques (Tableau 1). Ces résultats sont très alarmants et nous incite à appeler les autorités compétentes à prendre aux sérieux l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques et potentiellement pathogènes et toxigènes. Des résultats similaires ont été rapportés par Hammoudi et Aggad, (2008) et Aggad et al., (2010), ces derniers ont souligné l'apparition des souches multirésistantes dans les élevages avicoles de l'Ouest Algérien. D'autres auteurs ont montré que la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques par les souches multirésistantes (Gyles, 2008).

CONCLUSION

Sur la base de l'ensemble des résultats obtenus, nous pouvons conclure que les groupes phylogéniques A et B1 sont dominants par rapport aux groupes B2 et D. Les gènes de virulence caractéristiques des ExPEC sont beaucoup plus élevés que ceux des EIEC et ceux des EAEC. Le test phénotypique de sensibilité aux antibiotiques révèle l'existence de souches multirésistantes aux molécules d'antibiotiques utilisées en médecine humaine et en médecine vétérinaire. À la lumière de ces résultats nous pouvons conclure aussi que les produits alimentaires d'origine animale et particulièrement la viande de poulet de chair en Algérie peuvent véhiculer et disséminer les pathovirus de l'espèce *E.coli* dangereux pour le consommateur et multirésistants aux antibiotiques. Ces observations nous amènent à inciter les éleveurs, les commerçants et les autorités compétentes à respecter les règles d'hygiène et sanitaires dans la filière avicole en Algérie et cela dans le but de limiter l'émergence de nouvelles souches plus pathogènes et multirésistantes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Carbonnelle B., Denis F., Marmonier A., Anon, G., Vargues, R. 1987. Bactériologie médicale techniques usuelles. Ed., SIMEP, Paris, 329-330.
- CLSI, 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI document M100-S20., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.19087, USA.
- Clermont O., S. Bonacorsi and E. Bingen, 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Applied and Environmental Microbiology, 66 : 4555-4558.
- Aggad H., A. Y. Ahmed, A., Hammoudi and M. Kihal, 2010. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Chickens with Colibacillosis. Global Veterinaria, 4, (3), 303-306,

Diallo, A. A., Brugère, H., Kerourédan M., Dupouy V., Toutain P.L., Bousquet-Mélou A., Oswald E., Bibbal D. 2013. Persistence and prevalence of pathogenic and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in municipal wastewater treatment plant receiving slaughterhouse wastewater. *Water Res.*, Vol. 47, (13), 4719–4729

Gyles C.L., 2008. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Animal Health Research Reviews/Conference of Research Workers in Animal Dis.*, 9 : 149-158

Hammoudi A. and H. Aggad (2008). Antibioresistance of *Escherichia coli* Strains Isolated from Chicken Colibacillosis in Western Algeria. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 32,(2), 123-126.

Holko I., T. Bisova, Z. Holkova and V. Kmet, 2006. Virulence markers of *Escherichia coli* strains isolated from traditional cheese made from unpasteurised sheep milk in Slovakia. *Food Control*, 17 : 393–396.

Johnson J.R., S. Jelacic, L.M. Schoening, et al., 2005. The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. *Infection and Immunity*;73: 965-971.

Manges A. R., P. M. Sherry, B. J. Lau, C. J. Nuval, J. N. S. Eisenberg, P. S. and Dietrich, L. W. Riley, 2007. Retail meat consumption and the acquisition of antimicrobial resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infections: a case-control study. *Foodborne Pathogen Dis.*,(4), 419-431.

Soufi L, M. S. Abbassi, Y. Saenz, L. Vinuae, S. Somalo, M. Zarazaga, A. Abbas, R. Dbaya, L. Khanfir, A. Ben Hassen, S. Hammami and C. Torres, 2009. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in *Escherichia coli* isolates from poultry meat in Tunisia. *Foodborne Pathogen Dis.*, (6), 1067–1073.

Unno T., D. Han, J.Jang, S.N. Lee, G. Ko, Y.C. Ha, H.K Joon, M.J Sadowsky and H.G. Hur 2009. Absence of *Escherichia coli* phylogenetic group B2 strains in humans and domesticated animals from Jeonnam Province, Republic of Korea. *Applied and environmental Microbiology*, (75), 5659–5666.

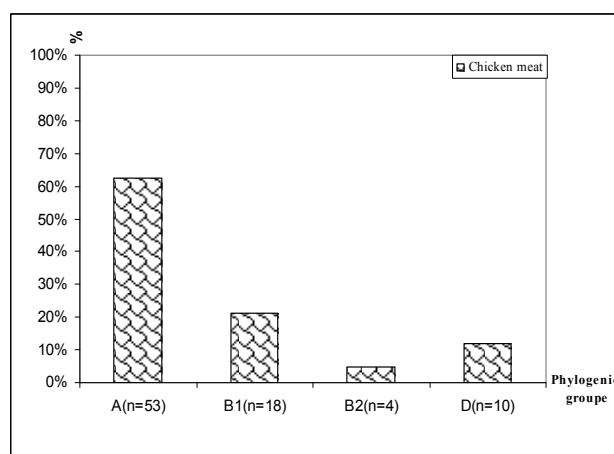


Figure 1: Répartition des groupes phylogéniques des souches de *E.coli* isolées des échantillons de viandes de poulet de chair.

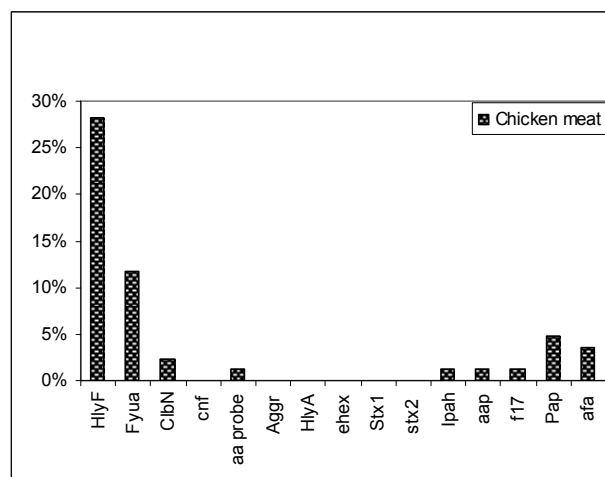


Figure 2: Distribution des genes de virulence détectés dans le génomes des *E.coli* isolées des échantillons de viande de poulet.

Table 2: Les antibiotypes phénotypiques majeurs de l'ensemble des souches analysées (n=85)

Antibiotypes	Nombre des isolats	Pourcentage des isolats %
Tet	7	8.23
Amp-Amx+AC	1	1.17
Tet-Tmp-STX.	4	4.70
Tet-Tmp-SXT-SSS	2	2.35
Amp-Amx-Tmp-Sxt-SSS	3	3.52
Am-Amx+A-SSS-Tm-Sxt-Tet	2	2.35
Amp-Amx-Tet-S-SSS-Tmp-Sxt.	1	1.17
Amp-Amx-Cip-UB30-SSS-Sxt-K-Tet	1	1.17
Amp-Tmp-Sxt-Tet-SSS-Amx-UB30-Cip-C	1	0.43
Amp-Amx-K-C-Sxt-Tmp-Cip-UB30-SSS-Tet	1	1.17
Amp-Amx-Amx+AC-Cip-Tmp-Sxt-SSS-K-S-T-C	2	2.35
Amp-Amx-K-N-S-Cip-UB30-Tmp-Sxt-SSS-Tet-C.	1	1.17
Amp-Amx-Amx+AC-K-N-Cip-UB30-SSS-Tmp-Sxt-Tet-C	1	1.17

(Tet : Tetracycline); (Amp: Ampicilline); (Sxt : Sulfamethoxazole-Trimethoprine); (SSS : Sulphonamide); (Amx : Amoxicilline); (TMP : Trimethoprine); (S : Streptomycine); (UB30 : Flumequine); (K : Kanamycine); (Cip : Ciprofloxacine); (Amx+AC : Amoxicilline plus acide Clavulanique); (CT : Colistine); (N : Neomycine); (C : Chloramphenicol); (CF : Cephalothine); (Gn: Gentamicine).

CARACTERISATION DES DEFAUTS DE CARCASSES DE POULETS VISIBLES A L'ABATTOIR

Bourin Marie¹, Souchet Christophe¹, Baéza Elisabeth²

¹*Institut Technique de l'Aviculture - URA, BP1 - 37380 Nouzilly*

²*INRA - URA, BP1 - 37380 Nouzilly*

bourin@itavi.asso.fr

RÉSUMÉ

Différents défauts de carcasses sont observés depuis 5-6 ans dans la filière de production de volailles de chair. Ils atteignent les filets sans être visibles avant l'abattage des animaux et peuvent toucher des lots ayant de bonnes performances zootechniques à l'élevage. Ils impactent l'aval de la filière (découpe, transformation) car ils peuvent avoir pour conséquence un retrait des filets destinés à la vente (défauts visuels) ou transformation. Ces défauts étant émergents dans les abattoirs en France, il est apparu nécessaire dans un premier temps de mieux les caractériser afin de pouvoir dans une étude ultérieure étudier les facteurs impliqués dans leur déterminisme. Les principaux défauts de filets rencontrés sont : le « white striping », défini par la présence de stries blanches sur le filet ; le « wooden breast » défini par la présence de zones présentant une texture plus dure, au niveau du filet ; les filets « spaghettis » définis par une déstructuration importante des fibres musculaires qui se détachent les unes des autres en filaments et les aiguillettes vertes ou « Oregon disease » définies par une coloration verte des aiguillettes liée à une nécrose des fibres musculaires et au catabolisme de l'hémoglobine. Des supports visuels ont été réalisés avec 3 niveaux de gravité de chacun de ces défauts afin de permettre aux opérateurs de bien les identifier. Des plaquettes de caractérisation ont été réalisées et validées par l'ensemble des partenaires industriels ainsi que par les interprofessions. Ces plaquettes ont servi de support de formation pour les opérateurs afin de leur permettre de bien identifier ces défauts sur les carcasses de volailles. Cette caractérisation était un préalable à l'étude de ces défauts dans les abattoirs français qui comprend l'évaluation de leur prévalence sur les lots de poulets de chair et l'identification des facteurs d'élevage et d'abattage impliqués dans l'apparition de ces défauts.

ABSTRACT

Characterisation of broiler carcasses defects noticeable at slaughter

Several muscular defaults are observed in poultry production. They affect fillets without being visible before animal's slaughter and can touch batches having good zootechnical performances. These defaults can have for consequence a withdrawal of fillets intended for sale or transformation. The main defaults of filets are white striping, wooden breast, "spaghettis" filets and Oregon disease. Brochures were realised with three levels of gravity of each of these defaults to allow operators to identify them. Brochures were realised and validated by all the industrial partners as well as by professional consortium. This characterisation was a prerequisite in the study of these defects in the French slaughterhouses, which includes evaluation of their prevalence and identification of breeding and slaughtering factors involved in emergence of these defaults.

INTRODUCTION

Différents défauts de carcasses sont observés depuis 5-6 ans dans la filière de production de volailles de chair. Certains de ces défauts sont connus depuis longtemps mais une recrudescence a été constatée ces dernières années (Oregon disease) alors que d'autres n'ont été détectés que récemment (muscle spaghetti). Ces défauts ne sont pas visibles avant l'abattage des animaux et peuvent toucher des lots ayant de bonnes performances zootechniques à l'élevage. Les conséquences de ces différents défauts se font sentir au maillon transformation où les filets incriminés peuvent être écartés du processus de fabrication, du fait de leur mauvaise qualité technologique.

Ces défauts sont pour le moment mal définis par les abattoirs en France. Cependant leur origine semble être une conséquence d'une part des techniques d'élevage utilisées et d'autre part de l'évolution génétique des animaux qui ont maintenant des vitesses de croissance très fortes et des rendements en filets très importants. Les leviers d'action pour maîtriser ces défauts se situent donc au maillon élevage même si les conséquences ne sont visibles qu'à l'abattoir, une fois que les animaux sont plumés, éviscérés voire découpés.

Au cours de l'été et l'automne 2015, la caractérisation des défauts white striping, wooden breast, oregon disease et filets spaghettis a été réalisée par l'ITAVI et l'INRA pour les productions de poulets de chair standard, semi-lourde et lourde. L'objectif de notre étude était d'élaborer et proposer des outils permettant de caractériser les différents défauts (référentiel visuel), la gravité/sévérité de ces défauts (grille de notation) pour ensuite former les opérateurs à une caractérisation en routine permettant à chaque abattoir de disposer d'un outil de suivi et de progrès. Cette caractérisation était également un préalable à l'étude de ces défauts dans les abattoirs français qui comprend l'évaluation de leur prévalence sur les lots de poulets de chair et l'identification des facteurs d'élevage et d'abattage impliqués dans l'apparition de ces défauts.

1. MATERIELS ET METHODES

La caractérisation des défauts a été réalisée en deux étapes. La première a consisté en une synthèse bibliographique qui a permis de mettre en lumière les spécificités de chaque défaut. La seconde a permis la constitution d'une banque d'image de chaque défaut, réalisée sur des échantillons prélevés dans différents abattoirs français.

Des supports visuels ont été réalisés dans le cadre de cette étude, en se basant sur les images collectées dans les abattoirs français. Pour ce faire, une dizaine de lots de poulets standard, semi-lourds et lourds ont été analysés dans différents abattoirs français. Pour réaliser les référentiels, les images collectées par nos soins, pour chaque défaut ont été annotées à l'aide des

données issues de la bibliographie et de nos propres observations.

Sur les référentiels visuels, différents niveaux de gravité ont été définis pour chacun de ces défauts afin de permettre aux opérateurs de bien les identifier. Le critère « Normal » correspond à un filet ou une aiguillette ne présentant pas de défaut, le critère « Modéré » à un filet ou une aiguillette où les premiers signes du défaut sont visibles et le critère « Sévère » lorsque le filet ou l'aiguillette est fortement atteint sur toute sa surface. Ces référentiels visuels ont été validés par l'ensemble des partenaires industriels ainsi que par les interprofessions.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. White striping

Les données bibliographiques indiquent que ce défaut est caractérisé par la présence sur les filets de stries blanches parallèles aux fibres musculaires (Kuttappan *et al.*, 2009). Les observations histologiques mettent en évidence des fibres en dégénérescence et atrophiées associées à une perte de stries transversales, une variabilité accrue de la taille des fibres, l'apparition de vacuoles et de fibres lysées, la présence de cellules marqueurs d'inflammation (neutrophiles, macrophages, lymphocytes T) et des fibres en régénération (Kuttappan *et al.*, 2013a). Les filets les plus sévèrement atteints par le white striping sont plus larges et plus épais que les filets normaux (Kuttappan *et al.*, 2009). Ils ont des teneurs en eau, lipides et collagène supérieures et des teneurs en protéines totales, myofibrillaires et sarcoplasmiques inférieures à celles des filets normaux ce qui leur confèrent une médiocre qualité nutritionnelle (Kuttappan *et al.*, 2012b ; Petracci *et al.* 2014 ; Mudalal *et al.*, 2014 ; Soglia *et al.*, 2016). L'indice de jaune de ces filets est également plus élevé (Kuttappan *et al.*, 2013b). Les filets très sévèrement atteints de white striping présentent un pH ultime et des pertes à la cuisson plus élevés que les filets normaux (Petracci *et al.*, 2013 ; Trocino *et al.*, 2015). Par ailleurs, les filets atteints de white striping possèdent une mauvaise capacité de rétention en eau, ce qui est préjudiciable pour les préparations marinées (Tijare *et al.*, 2016).

L'origine de ce défaut reste méconnue, mais est probablement multifactorielle. La fréquence du white striping est plus élevée chez les poulets de souche lourde et présentant de forts rendements en filets (Kuttappan *et al.*, 2009 ; Petracci *et al.*, 2013 ; Petracci *et al.* 2014 ; Lorenzi *et al.*, 2014). Elle est également plus importante chez les mâles, et les poulets présentant une vitesse de croissance rapide, nourris avec des aliments riches en énergie et présentant à l'abattage des poids vifs ou des âges élevés (Bauermeister *et al.* 2009 ; Kuttappan *et al.*, 2012b ; Kuttappan *et al.*, 2013b ; Meloche *et al.*, 2014). La fréquence du white striping dans les abattoirs industriels a été peu évaluée. Chez des poulets de souches commerciales mais élevés en conditions

expérimentales, cette fréquence peut atteindre 50% (Kuttappan *et al.*, 2012a, Kuttappan *et al.*, 2012b). En Italie, sur 28 000 filets analysés et issus de 56 lots de poulets de poids vif moyen abattus en conditions industrielles, Petracci *et al.* (2013) ont observé une fréquence de 12%. Au Brésil, sur 2 512 carcasses analysées, 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. En France, la prévalence de ce défaut n'a jamais été évaluée.

Le référentiel visuel a été réalisé à partir des photos que nous avons prises dans les abattoirs français et de la synthèse bibliographique citée ci-dessus (Figure 1).

2.2. Wooden breast

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). Très souvent, ces zones sont recouvertes d'un liquide clair et visqueux et présentent des pétéchies (petites taches en forme de points, habituellement de couleur rouge violacé). A ce jour, il n'y a pas de données publiées sur l'étiologie et la fréquence de ce défaut, néanmoins, il n'atteint pas d'autres muscles squelettiques. Il a été par ailleurs montré que ce défaut est fortement corrélé à la présence de white striping (Russo *et al.*, 2015). De plus, il semblerait que les souches de poulets à vitesse de croissance rapide et à fort rendement en filet seraient plus sensibles à ce défaut (Mudalal *et al.*, 2014). Des carences en vitamine E et sélénium ou des infections virales comme la bronchite infectieuse pourraient également être impliquées (Sihvo *et al.*, 2013). Une récente étude sur la caractérisation de l'expression des gènes suggère un changement du type de fibres dans les filets affectés avec une hypoxie localisée, la présence de stress oxydatif et l'accumulation de calcium intracellulaire (Mutryn *et al.*, 2015). De même que pour le white striping, la prévalence de ce défaut reste inconnue en France jusqu'à présent.

Le référentiel visuel a été réalisé à partir des photos que nous avons prises dans les abattoirs français et de la synthèse bibliographique citée ci-dessus (Figure 2).

2.3. Filets spaghettis

Les filets spaghettis se caractérisent par une déstructuration importante des fibres musculaires qui se détachent les unes des autres en filaments. Ce défaut n'a pas fait l'objet à ce jour de description dans la littérature mais il est mentionné par les professionnels des abattoirs, en particulier pour les poulets lourds.

Le référentiel visuel a été réalisé à partir des photos que nous avons prises dans les abattoirs français annotées de nos propres observations (Figure 3).

2.4. Aiguillettes vertes ou « Oregon disease »

Ce défaut 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 depuis environ 30 ans (Siller *et al.*, 1985). En 2006, la fréquence de ce défaut dans les abattoirs industriels italiens avait été estimée à 0,84% chez les poulets pesant plus de 3 kg (Bianchi *et al.*, 2006). En Pologne, cette fréquence peut varier de 0,02 à 1,90% (Kijowski *et al.*, 2014). Ce défaut est plus fréquent chez les poulets à forte vitesse de croissance et chez les mâles (Lien *et al.*, 2011). Il semblerait que la sélection pour un développement accru des muscles pectoraux ait modifié aussi leur système de vascularisation et le flux sanguin. Chez des poulets de souche lourde, le muscle *Pectoralis minor* (aiguillette) est comprimé par le muscle *Pectoralis major* (filet) contre l'os du bréchet. De plus, ces animaux élevés en conditions standards ont une activité locomotrice et musculaire réduite. 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 *et al.*, 1985). La transformation de la coloration rouge en coloration verte est due au catabolisme de l'hémoglobine (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 et l'augmentation au niveau sanguin de l'activité enzymatique de la créatine kinase. De même que pour le white striping et le wooden breast, il n'existe pas de données de prévalence en France.

Le référentiel visuel a été réalisé à partir des photos que nous avons prises dans les abattoirs français et de la synthèse bibliographique citée ci-dessus (Figure 4).

CONCLUSION

Ces plaquettes ont servi de support de formation pour les opérateurs en abattoir afin de leur permettre de bien identifier ces défauts sur les carcasses de volailles. Leur réalisation était un préalable à l'étude de ces défauts dans les abattoirs français qui comprend l'évaluation de leur prévalence sur les lots de poulets de chair et l'identification des facteurs d'élevage et d'abattage impliqués dans l'apparition de ces défauts dans le cadre d'un projet financé par FranceAgriMer. Pour ce faire, 150 lots de poulets de production standard, semi-lourde et lourde seront suivis sur un an de production dans plusieurs abattoirs français. Pour chacun des lots, la fréquence d'apparition et la gravité des 4 défauts seront évaluées en se basant sur les plaquettes. De plus, les données d'élevage (fiches d'élevages, courbes de croissance

précises, formules alimentaires et durées de distribution précises, souche ou croisement utilisé, densité maximale, détassage, type de sol et de litière, météo...) et les données d'abattage (fiches d'Information sur la Chaîne Alimentaire ou ICA, rendement carcasse et filet des lots suivis...) seront collectées afin de définir les facteurs impliqués dans le déterminisme de ces différents défauts. Les premiers résultats issus du suivi d'une quarantaine de lots, montrent que les filets des souches de poulets de production standard et semi lourde (1,9 à 2,3 kg) sont touchés par ces défauts musculaires. Le white striping atteint la totalité des lots suivie et la proportion de filets atteints par ce défaut est comprise entre 33 à 90

%. Le wooden breast est détecté dans 98 % des lots et affecte 10 à 70 % des filets. La proportion de filets spaghetti est loin d'être négligeable avec 65 % des lots touchés au sein desquels la part de filets affectés peut atteindre 20 %. Par ailleurs, il a été constaté que certains filets pouvaient être atteints simultanément par plusieurs de ces défauts, et tous lots confondus, cette proportion est en moyenne de 15 %.

REMERCIEMENTS

Ce projet a été mené grâce au concours financier du CIPC et de FranceAgriMer et l'aide de plusieurs partenaires industriels de l'abattage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bauerrmeister, 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.
- Bianchi, M. Petracci, M., Franchini, A., Cavani C., 2006. Poult. Sci. 85 : 1843-1846.
- Ferreira, T.Z., Casagrande, R.A., Vieira, S.L., Driemeier, D., Kindlein, L., 2014. J. Appl. Poult. Res. 23 : 1-6.
- 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., 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., Brewer, V.B., Mauromoustakos, A., Mac Kee, S.R., Emmert, J.L., Meullenet, J.F., Owens, C.M., 2013b. Poult. Sci. 92 : 811-819.
- 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. Appl. Poult. Res. 21 (3) : 556-56
- Lorenzi, M.; Mudalal, S.; Cavani, C.; Petracci, M., J. 2014. Appl. Poult. Res, 23(4) : 754-758
- Meloche, K.J., Dozier, W.A., Bilgili, S.F., 2014. Proceedings of XIV WPSA European Poultry Conference, Stavanger (Norway), 23-27/06/14 : 4 p
- Mudalal, S., Babini, E., Cavani, C., Petracci, M., 2014. Poult. Sci. 93 : 2108-2116.
- Mutryn, M. F.; Brannick, E.M.; Fu, W.; Lee, W. R.; Abasht, B. 2015. BMC Genomics, 16
- 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 (1) : 179-183.
- Russo, E., Drigo, M., Longoni, C., Pezzotti, R., Fasoli, P., Recordati, C., 2015 Poult. Sci, 94(8) : 1843-1848
- Sihvo, H.K., Immonen, K., Puolanne, E., 2013. Vet. Pathol. 51(3):619-23
- Siller, W.G., 1985. Poult. Sci. 64 : 1591-1595.
- Soglia, F., 2016. Poult. Sci. 95(3) : 651-9.
- Tijare, V. V.; Yang, F. L.; Kuttappan, V. A.; Alvarado, C. Z.; Coon, C. N.; Owens, C. M. 2016. Poult. Sci, 95(9) 2167:2173
- Trocino, A.; Piccirillo, A.; Birolo, M.; Radaelli, G.; Bertotto, D.; Filiou, E.; Petracci, M.; Xiccato, G., 2015. Poult. Sci, 94(12) : 2996-3004

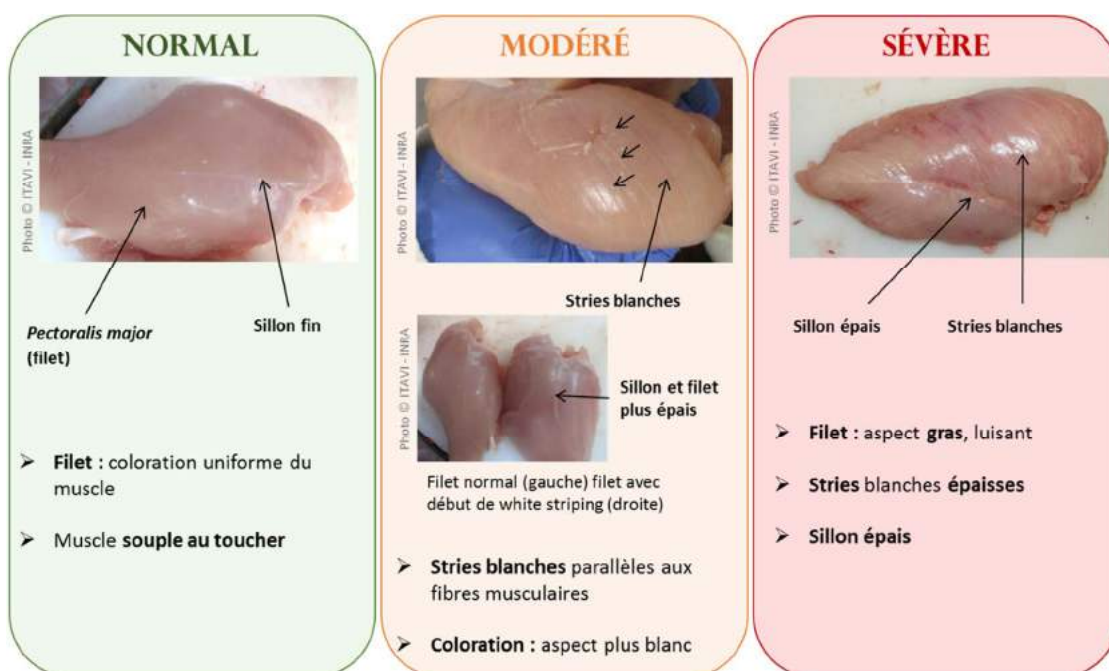


Figure 1 : Référentiel visuel réalisé pour le défaut white striping

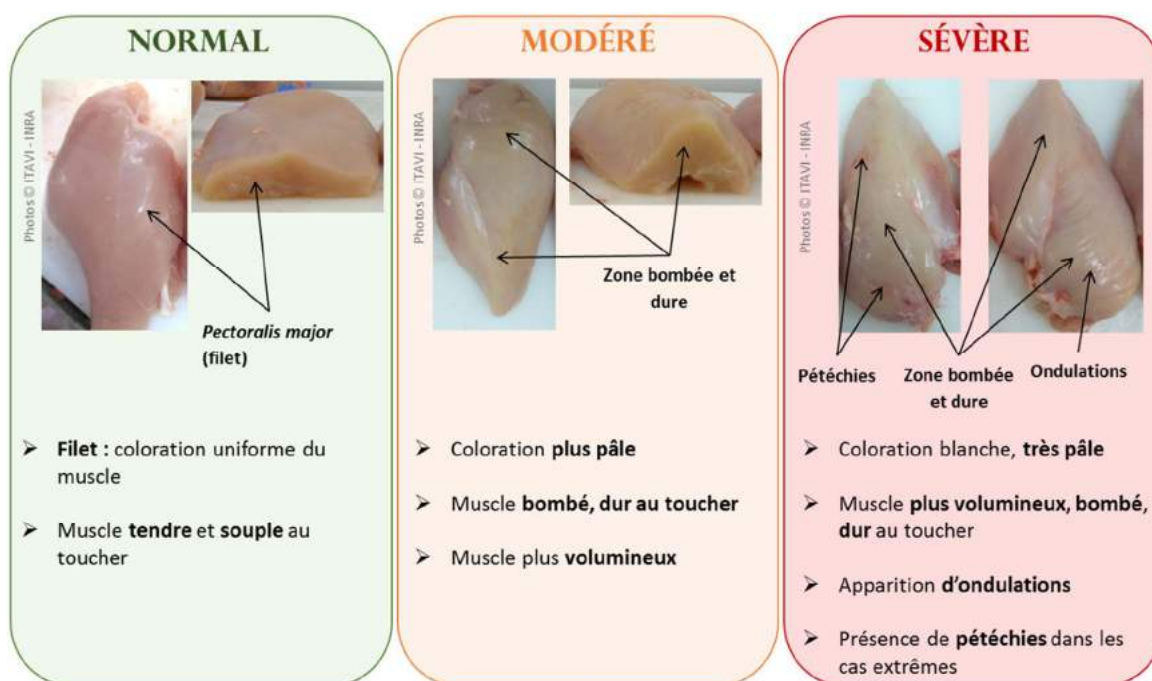


Figure 2 : Référentiel visuel réalisé pour le défaut wooden breast

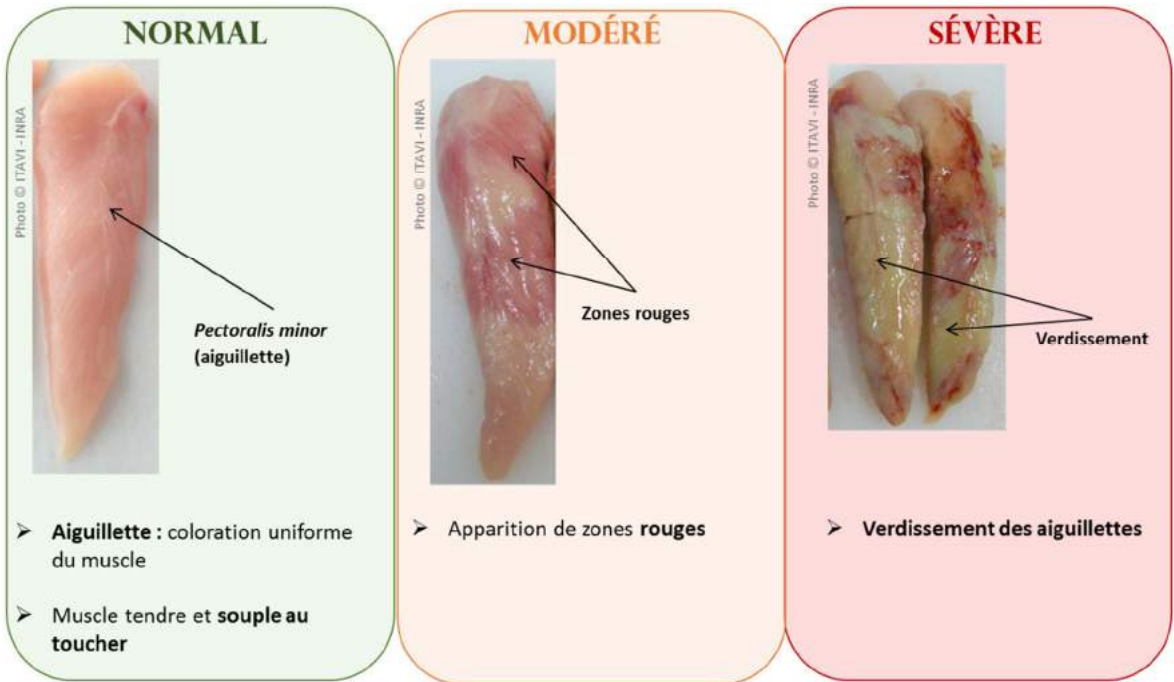


Figure 3 : Référentiel visuel réalisé pour le défaut aiguillettes vertes

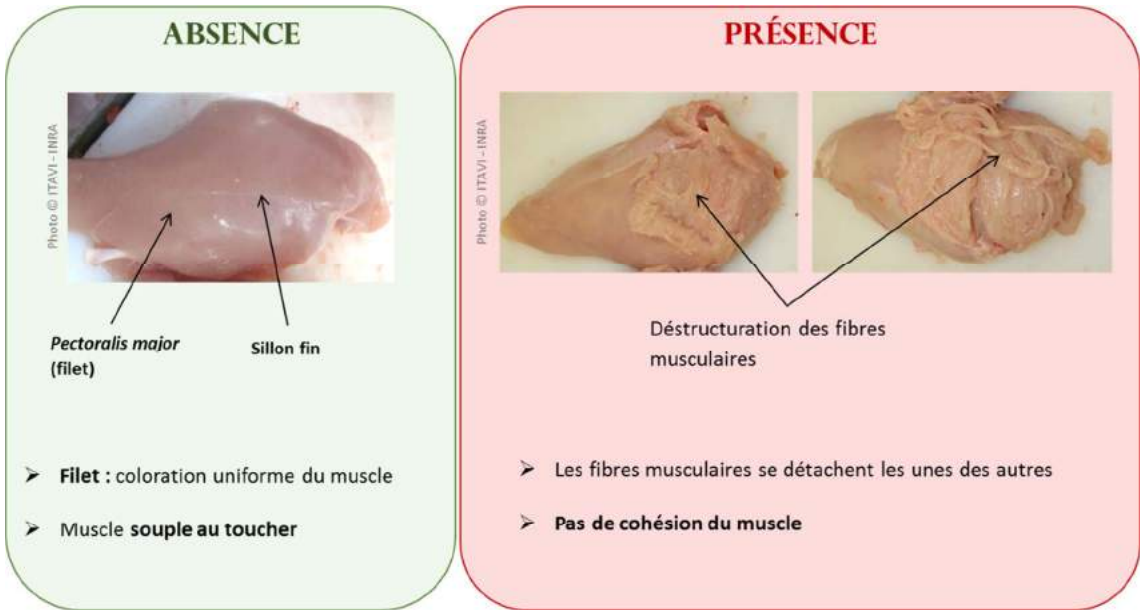


Figure 4 : Référentiel visuel réalisé pour le défaut muscle spaghetti



BOURIN Marie¹



CARACTERISATION DE DEFAUTS MUSCULAIRES PRESENTS SUR LES FILETS DE POULETS DE CHAIR

Contexte

Observation depuis peu de **différents défauts musculaires** dans la filière de production de poulets de chair qui induisent des pertes économiques :

➤ **Défauts non visibles avant l'abattage** des animaux → peuvent toucher des lots avec de bonnes performances zootechniques à l'élevage.

➤ Origine des défauts semble **liée aux techniques d'élevage et à la sélection génétique des animaux** → vitesses de croissance élevées et rendements en filets très importants

Matériel et méthode

La caractérisation des défauts a été réalisée en deux étapes :

- Synthèse bibliographique qui a permis de mettre en lumière les spécificités de chaque défaut
- Constitution d'une banque d'image de chaque défaut, réalisée sur des échantillons prélevés dans différents abattoirs français pour concevoir les référentiels visuels

Objectif de l'étude

Proposer une grille de caractérisation des défauts musculaires

Résultats

White striping	Wooden Breast
Description : stries blanches sur les filets, parallèles aux fibres musculaires. Conséquences au niveau du filet : ✓ Augmentation des teneurs en eau, lipides, collagène et diminution des teneurs en protéines totales ✓ Augmentation du pH ultime et des pertes à la cuisson Population cible : poulets mâles de souche lourde à forts rendements en filets, et vitesse de croissance rapide, ayant une alimentation riche en énergie, et des poids vifs ou des âges élevés à l'abattage.	Description : zones du filet présentant une texture plus dure, un aspect plus bombé et plus pâle qui sont souvent recouvertes d'un liquide clair et visqueux, présence de pétéchies. Population cible : souches de poulets à vitesse de croissance rapide et à fort développement musculaire. Ce défaut apparaît très souvent associé au « white striping »
NORMAL Pectoralis major (filet) Silon fin ➤ Filet : coloration uniforme du muscle ➤ Muscle souple au toucher	NORMAL Pectoralis major (filet) ➤ Filet : coloration uniforme du muscle ➤ Muscle tendre et souple au toucher
MODÉRÉ Stries blanches Silon et filet plus épais ➤ Stries blanches parallèles aux fibres musculaires ➤ Coloration : aspect plus blanc	MODÉRÉ Zone bombée et dure ➤ Coloration plus pâle ➤ Muscle bombé, dur au toucher ➤ Muscle plus volumineux
SÉVÈRE Silon épais Stries blanches ➤ Filet : aspect gras, luisant ➤ Stries blanches épaissies ➤ Silon épais	SÉVÈRE Pétéchies Zone bombée et dure Ovulation ➤ Coloration blanche, très pâle ➤ Muscle plus volumineux, bombé, dur au toucher ➤ Apparition d'ondulations ➤ Présence de pétéchies dans les os extrêmes

Muscle spaguetti	Aiguillettes vertes
Description : déstructuration importante des fibres musculaires qui se détachent les unes des autres en filaments. Actuellement non décrit dans la littérature → mentionné par les professionnels des abattoirs, en particulier pour les poulets lourds.	Description : nécrose des aiguillettes décrite pour la première fois en 1968 (myopathie dégénérative chez la dinde). Visible depuis 30 ans chez les poulets à vitesse de croissance rapide Origine : activité musculaire intense des pectoraux entraîne une compression des artères thoraciques entre le filet et l'os du bréchet → diminution du flux sanguin et de l'apport d'oxygène → apparition de lésions nécrotiques
ABSENCE Pectoralis major (filet) Silon fin ➤ Filet : coloration uniforme du muscle ➤ Muscle souple au toucher	NORMAL Pectoralis major (aiguillette) ➤ Aiguillette : coloration uniforme du muscle ➤ Muscle tendre et souple au toucher
PRÉSENCE Déstructuration des fibres musculaires ➤ Les fibres musculaires se détachent les unes des autres ➤ Pas de cohésion du muscle	MODÉRÉ Zones rouges ➤ Apparition de zones rouges
	SÉVÈRE Verdissement ➤ Verdissement des aiguillettes

Perspectives

- Référentiels visuels ayant servi de support de formation pour les opérateurs en abattoir
- Une étude est en cours dans les abattoirs français afin :
 - ✓ D'évaluer leur prévalence sur 150 lots de poulets de chair de production standard, semi-lourde et lourde
 - ✓ identifier des facteurs d'élevage et d'abattage impliqués dans l'apparition de ces défauts (collecte des données d'élevage et des données d'abattage).



Financiers



INTERET DE L'ASSOCIATION DE POLYPHENOLS ET DE VITAMINE E POUR AMELIORER LA QUALITE DE LA VIANDE DE VOLAILLE.

Bébin Karine ⁽¹⁾, Gardan-Salmon D. ⁽¹⁾ et Panheleux-Lebastard Marina ⁽¹⁾,

⁽¹⁾ CCPA, Z.A. Nord Est du Bois de Teillay, 35150 Janzé, France

kbebin@groupe-ccpa.com

RESUME

La consommation des viandes de volaille se tourne de plus en plus vers les produits de découpe et transformés. L'aptitude à la conservation et à la transformation de la viande devient donc un axe majeur de recherche pour répondre à cette demande. Dans cette étude, nous avons mesuré les effets de l'apport d'une association de vitamine E (alpha-tocophérol acétate) et de polyphénols (G3) comparée à un témoin négatif sans ajout d'antioxydants (G1) et à un témoin positif avec vitamine E (G2) sur l'oxydation et les pertes en eau de viande de poulets. Chaque régime a été distribué à 4 parquets de 36 poulets Ross PM3 (144 poulets / régime) de 21 à 42 jours, les phases de démarrage (0-10j) et croissance (10-21j) étant communes. A 42 jours, 20 poulets par groupe ont été abattus pour les mesures de qualité de viande. La sensibilité à l'oxydation de la viande est diminuée en présence de vitamine E (G2) et de l'association d'antioxydants (G3) ($P < 0,001$). L'analyse des valeurs TBARS dans la cuisse montre des écarts significatifs en faveur des groupes G2 et G3. En parallèle, la coloration de la viande (note b, Minolta) est supérieure pour le groupe avec association de polyphénols (G3) comparé à G1 et G2 ($P < 0,05$). Les qualités technologiques ont été appréciées par les mesures de pertes en eau sur frais et à la cuisson des filets. L'association de polyphénols (G3) diminue les pertes en eau par exsudat et après cuisson par rapport aux groupes G1 et G2. En conclusion, l'association de différentes molécules antioxydantes (vitamine E et polyphénols) permet d'améliorer l'aspect et la conservation de la viande (couleur et sensibilité à l'oxydation) ainsi que la qualité technologique (pertes en eau) avec également un intérêt économique. En effet, le coût de la supplémentation dans l'aliment réalisé à partir d'une liste de prix été 2016, exprimé en base 100, donne la hiérarchie suivante : G1= 0, G2= 100 et G3= 74. Le retour sur investissement calculé sur la base de la vente des filets (moins de pertes en eau) est de 10 pour 1.

ABSTRACT

Association of polyphenols and vitamin E to improve the poultry meat quality

The consumption of poultry meat is increasingly turning to cut-up and further processed products. Thus improving conservation and meat processing ability are major concerns of investigation to better meet the market need. In this study, we investigated the effect of a combination of vitamin E (or alpha-tocopherol acetate) + polyphenols (G3) compared to a negative control with no added antioxidant (G1) and a positive control with vitamin E (G2) on oxidation susceptibility and drip losses of chicken meat. Each specific diet was distributed to 4 pens of 36 chickens Ross PM3 (144 chickens / diet) from 21 to 42 days. The start-up (0-10d) and growing (10-21d) diets were similar for the 3 groups. At 42 days, 20 chickens per group were slaughtered for meat quality measurements. Meat oxidation was decreased in the presence of vitamin E (G2) and the combination with polyphenols (G3) ($P < 0.001$). TBARS value in the leg was significantly decreased in groups G2 and G3. Meat colour (b* value, Minolta) was higher for the group with polyphenol combination (G3) compared to G1 and G2 (respectively 18 versus 16.2 and 16.1; $P < 0.05$). Meat technological quality was assessed by drip loss measurement, before and after cooking the fillets. Both criteria were lower in G3 compared to the other groups. In conclusion, the combination of different antioxidant molecules (vitamin E and polyphenols) improved meat appearance and storage ability (colour and oxidation susceptibility) as well as its technological quality (drip loss). Taking prices of summer 2016, the supplementation cost was (based on the 100 scale): G1= 0, G2= 100 et G3= 74. The return on investment based in the sale of fillets (lower drip loss) was estimated to be 10:1.

INTRODUCTION

La consommation des viandes de volaille se tourne de plus en plus vers les produits de découpe et transformés (Taconet et Magdelaine, 2009). L'aptitude à la conservation et à la transformation de la viande devient donc un axe majeur de recherche pour répondre à cette demande.

En effet, il existe des variations importantes de couleur de la viande, très préjudiciables pour les professionnels de la découpe (Gigaud et al., 2006 ; 2007). Des corrélations réalisées au sein de différentes études, ont montré un lien fort entre le pH ultime (pHu), la couleur (luminance (L*)) et les rendements à la transformation quelle que soit la souche (Gigaud et al., 2009).

Chez la dinde, ces problèmes de couleur sont encore plus importants. Bourrin et al. (2015) ont également mis en évidence un lien entre la couleur et le pHu. Certains auteurs supposent, comme en poulet (Le Bihan-Duval et al., 2013), qu'une viande à pHu acide a une plus forte sensibilité à l'oxydation et donc à la décoloration.

L'ajout d'antioxydants dans l'aliment comme la vitamine E (Volcj et al., 2011) ou des extraits végétaux tels que polyphénols de raisin (Iqbal et al., 2015), de thé (Wu et al., 2014) ou des huiles essentielles (Yesilbag et al., 2011 ; Džinić et al., 2012) permet de réduire la peroxydation des acides gras de la viande de volailles.

Si l'effet de ces antioxydants sur la peroxydation des acides gras a déjà été étudiée, l'objectif de notre étude est de comparer les effets de la vitamine E seule ou associée avec des extraits végétaux sur les différentes mesures de qualité de viande (sensibilité à l'oxydation, couleur, pertes en eau) afin de réduire le coût de supplémentation.

1. MATERIEL ET METHODES

1. Animaux et alimentation

L'essai est mené sur 432 poulets mâles Ross PM3 élevés de 1 à 42 jours en 12 parquets de 36. A 1 jour, les animaux sont répartis en 3 lots en fonction de leur poids. Les poulets reçoivent les mêmes aliments entre 1 et 21 jours. De 21 à 42 jours, le 1^{er} lot reçoit un aliment Témoin (G1). Les 2 autres lots reçoivent des aliments enrichis avec 200 ppm de vitamine E (ou alpha-tocophérol) (G2) ou avec une association de 100 ppm vitamine E (ou alpha-tocophérol) et de polyphénols (8.7 mg/kg d'équivalent acide gallique, méthode Folin-Ciocalteu) (MEGA® Protect, CCPA) (G3).

Les teneurs en énergie métabolisable, protéines et matières grasses sont identiques entre les 3 régimes pour chaque stade. Tous les aliments contiennent des pigments au même taux pour apporter une coloration minimale aux poulets.

2. Mesures et analyses

2.1. Abattage

A 42 jours, 5 poulets représentatifs du poids moyen du parquet sont sélectionnés (soit 20 poulets par groupe). Les animaux sont pesés individuellement puis abattus, plumés et vidés, conservés en chambre froide (4°C) pendant 24 h.

24h après abattage, la couleur a été mesurée avec un spectro-colorimètre Minolta (L* (luminance), a*(rouge), b* (jaune)) sur le dos avec peau, sur une des cuisses avec peau et sur un des filets sans peau, avec le calcul de l'index composite (= moyenne des 3 mesures pour chaque paramètre).

Les carcasses sont pesées puis découpées. Le rendement carcasse est alors calculé ainsi que les rendements en filets et cuisses-pilons. Des mesures de pHu sur les filets ont été effectuées avec un pHmètre (Mettler Toledo).

Un filet et une cuisse par animal sont envoyés au laboratoire ARTEMIS (Janzé, France) pour mesurer les pertes en eau par exsudat et après cuisson des filets et de la peroxydation des matières grasses de la cuisse (indice TBARS).

2.2. Pertes en eau

A réception, les filets sont pesés puis placés dans une barquette avec buvard. Ils sont ensuite conservés en chambre froide à +4°C pendant 7 jours. Les filets sont alors repesés et les pertes en eau sur frais sont estimées par différence de poids et exprimées en pourcentage.

Les filets sont parés et pesés, mis sous vide, plongés dans un bain-marie à 85°C pendant 15 minutes. Les filets cuits sont refroidis (15 min à 20°C) et pesés. Les pertes en eau après cuisson sont alors calculées par différence de poids en et exprimées en pourcentage.

2.3. Sensibilité à l'oxydation de la viande

A réception, 10 cuisses avec peau par groupe sont congelées à -18°C. Les mesures d'oxydation des acides gras sont réalisées après décongélation (+20°C pendant 4 h) par la méthode du TBARS (méthode spectrométrique, mesure du malondialdéhyde (MDA)) en cinétique de 0 à 180 minutes (méthode adaptée de Mourot et al., 2009).

3. Traitement statistique

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

En ce qui concerne la peroxydation des acides gras, la relation entre TBARS et le temps a été linéarisée en utilisant le log népérien du temps et en transformant $t=0$ en $t=1$.

Le modèle statistique est un modèle de régression à coefficients aléatoires (Brady T. West, 2007) réalisé par la procédure MIXED de SPSS 19.

2. RESULTATS

1. Rendements, pHu et pertes en eau

A 42 jours, le poids des animaux ainsi que le rendement carcasse et des morceaux sont identiques pour tous les groupes. De plus, aucune différence significative n'est mise en évidence sur le pHu des filets (Tableau 1).

Les résultats de pertes en eau montrent une diminution significative avec le mélange d'antioxydants G3 (Figure 1). En effet, les pertes en eau après 7 jours de conservation à 4°C sont inférieures de 1.18 et 0.66 points pour G3 (mélange d'antioxydants) par rapport à G1 et G2 respectivement. De même, les pertes en eau après cuisson sont diminuées de 0.86 et 1.32 points avec G3 par rapport à G1 et G2 respectivement.

2. Coloration

La mesure de coloration en 3 points de la carcasse (dos, cuisse et filet) (Tableau 2) montre une augmentation de l'intensité de jaune (b^*) de 15.9% sur les cuisses et de 9.8% sur l'index composite en faveur de G3 par rapport au G1.

3. Peroxydation des acides gras de la viande

La cinétique de peroxydation des acides gras de la viande montre une interaction temps x groupe. En effet, la pente de 0 à 30 min est plus prononcée pour le G1 que G2 et G3 avec antioxydants. Après 30 min, les pentes sont identiques entre groupes. L'analyse montre également une différence significative de niveau de MDA. La peroxydation des acides gras est inférieure en présence d'antioxydants (G2 et G3) (figure 2) par rapport à G1. La peroxydation étant identique entre G2 et G3, ce résultat confirme la bonne équivalence du pouvoir antioxydant entre la vitamine E (G2) et le mélange d'antioxydants (vitamine E + polyphénols G3).

DISCUSSION

Notre étude n'a pas permis de mettre en évidence de différence de pHu des filets tout comme Wu et al. (2014) et Voljc et al. (2011) qui n'ont pas montré d'impact de la vitamine E ou autres extraits végétaux sur le pHu des filets de poulets.

Très peu d'études montrent des effets de la nutrition des poulets sur les pertes en eau par exsudat et après cuisson de la viande. Nos résultats de pertes en eau sur frais (exsudat) confirment le faible effet de la vitamine E -apportée seule- sur ce critère, comme Voljc et al. (2013) mais montrent l'intérêt d'une association d'antioxydants (vitamine E et polyphénols). L'association d'antioxydants liposolubles et hydrosolubles semble avoir une meilleure efficacité sur la protection des membranes cellulaires, diminuant ainsi les pertes en eau. Les résultats de pertes en eau après cuisson sont également favorables à l'association d'antioxydants. La bibliographie montre des corrélations entre les valeurs de pHu et de rendement à la transformation (Gigaud et al., 2009) mais pas d'effet de la nutrition des volailles sur ce critère.

En ce qui concerne la couleur de la viande, notre étude ne met pas en évidence de modification de la luminance, critère corrélé au pHu (Gigaud et al., 2009), mais une augmentation de l'intensité de jaune a été observée avec l'apport de l'association d'antioxydants, comme Voljc et al. (2011) avec l'apport de tanins. Les pigments apportés dans l'alimentation peuvent être utilisés à des fins de protection de l'organisme en cas période de stress. Dans ce cadre, l'apport d'antioxydants supplémentaires permet d'épargner les pigments pour la protection de l'organisme et de mieux se déposer.

Les mesures d'oxydation de la viande confirment l'intérêt de l'apport d'antioxydants en général pour une meilleure protection des lipides (Wu et al., 2011 ; Voljc et al., 2011 ; 2013) pouvant préserver la coloration de la viande comme le suggère Berri et al. (2014). Notre étude valide l'efficacité de protection des acides gras de la viande vis-à-vis du processus de peroxydation, cette protection étant équivalente entre une dose forte de vitamine E et une dose plus modeste mais associée avec des extraits végétaux.

CONCLUSIONS

En conclusion, l'association de différentes molécules anti-oxydantes (vitamine E et polyphénols) permet d'améliorer l'aspect et la conservation de la viande (couleur et sensibilité à l'oxydation) ainsi que la qualité technologique (pertes en eau). De plus, cette association a un intérêt économique non négligeable. En effet, le coût des apports supplémentaires réalisé à partir d'une liste de prix été 2016, exprimé en base 100 pour l'apport de Vitamine E seule, donne la hiérarchie suivante : G1= 0, G2= 100 et G3= 74. Le retour sur investissement calculé sur la base de la vente des filets cuits (moins de pertes en eau) est de 10 pour 1.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Brady T. West, Kathleen B. Welch, Andrezej T. Galecki, 2007, Linear Mixed Models, Chapman & Hall/CRC
- Bourin M., Baéza E., Mika A., Godet E., Chartrin P., Maudouit A., Berri C., 2015, 11^{ème} Journées de la Recherche Avicole et des palmipèdes à foie gras, 25 et 26 mars, Tours, France, 1122-1127
- Džinić N., Petrović Lj., Jokanović M., Tomović V., Okanović Dj., Tasić T., Ikonić P.; 2012; 58th International Congress of Meat Science and Technology, 12-17th Août, Montreal, Canada.
- Gigaud V., Debut M., Berri C., Le Bihan-Duval E., Travel A., Bordeau T., 2006. Viandes et Produits Carnés. JSMTV, 4 et 5 octobre, Clermont Ferrand, France, 213-214
- Gigaud V., Geffard A., Berri C., Le Bihan-Duval E., Travel A., Bordeau T., 2007 ; XVIII European Symposium on the Quality of Poultry Meat, 2-5 septembre, Prague, Tchéquie, 113-114.
- Gigaud V., Le Bihan-Duval E., Berri C., 2009, 8^{èmes} Journée de la Recherche Avicole., 25 et 26 mars, Saint Malo, France, 124-131
- Iqbal I., Kamran Z., Sultan J.I., Ali A., Ahmad S., Shahzad M.I., Ahsan U., Ashraf S., Sohail M.U. ; 2015, J. Appl. Poult. Res. 24:127-134
- Le Bihan-Duval E. Chabault M., Boulay M., Baéza E., Berry C., 2013. XV Egg Meat Symposia, Bergamo, Italy, 15-19 septembre, WPSJ, 69 suppl,
- Mourou J., Arturo-Schaan M., Bebin K., Briens C.; 2011, 14^{èmes} Journée de la Recherche Cunicole, 22 et 23 novembre, Le Mans, France, 93-96.
- Taconet A.E., Magdelaine P., 2009, 8^{èmes} Journée de la Recherche Avicole, 25 et 26 mars, Saint Malo, France, 14
- Voljč M., Frankič T., Levart A., Nemec M., Salobir J. ; 2011, Poultry Science, 90, 1478-1488
- Voljč M., Levart A., Žgur S., Salobir J, 2013 British Poultry Science Vol. 54, No. 1, 144-156,
- Wu C., Wen Z.X, Leng Y.M, Zhou, 2014, Animal Feed Science and Technology 194, 131-135
- Yesilbag D., Eren M., Agel H., Kovanlikaya A. and Balci F., 2011, British Poultry Science, 52 (4), 472- 482

Tableau 1. Effet d'une supplémentation alimentaire en antioxydant sur les rendements en découpe et le pHu des filets de poulets abattus à 42 jours (n = 20)

	G1	G2	G3	SEM	p
Poids vif (g)	3053.41	3020.82	3059.86	25.35	0.510
Rendement Carcasse (%)	67.98	67.60	67.46	0.32	0.485
Rendement Filet (%)	20.22	19.73	19.38	0.3	0.142
Rendement Cuisse (%)	22.34	22.58	22.47	0.2	0.677
pH ultime	5.71	5.69	5.66	0.022	0.195

G1 = lot témoin non supplémenté en antioxydant ; G2 = Lot supplémenté avec 200 ppm vitamine E ; G3 = Lot supplémenté avec 100 ppm vitamine E et polyphénols.

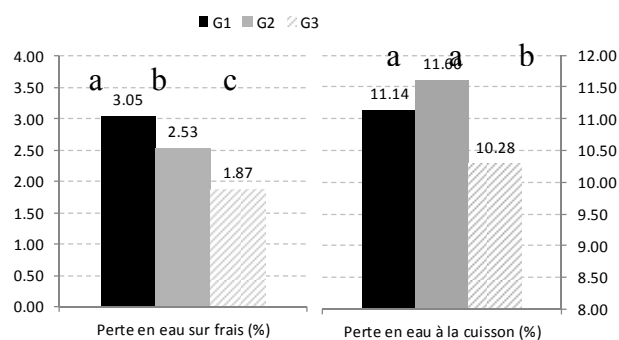
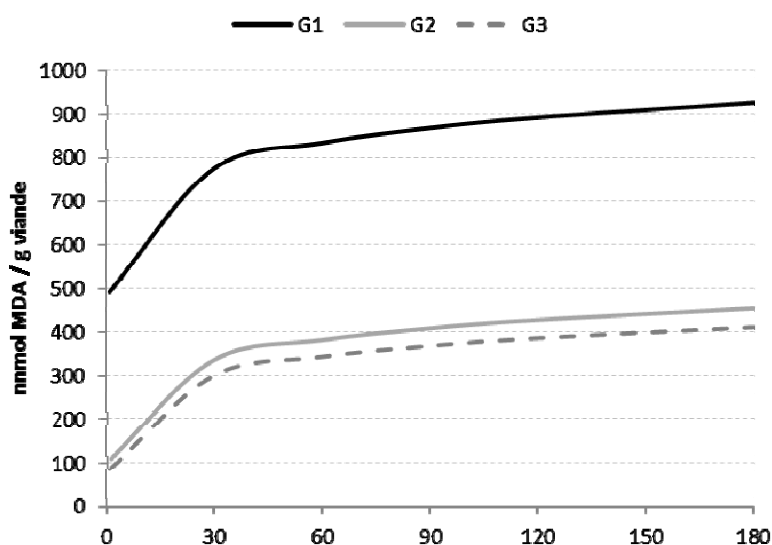


Figure 1. Effet d'une supplémentation alimentaire en antioxydant sur les pertes en eau par exsudat et après cuisson des filets (n = 20) *** P<0,001

Tableau 2. Effet d'une supplémentation alimentaire en antioxydant sur la couleur de la viande (n = 20)

	G1	G2	G3	SEM	p
Dos					
Luminance (L*)	73.24	73.59	74.15	0.350	0.200
Rouge (a*)	3.18	3.54	2.67	0.350	0.217
Jaune (b*)	16.98	17.31	18.92	0.780	0.183
Cuisse					
Luminance (L*)	75.10	76.30	75.39	0.430	0.126
Rouge (a*)	0.53	0.88	0.96	0.204	0.300
Jaune (b*)	12.86 b	13.27 b	15.29 a	0.740	0.052
Filet					
Luminance (L*)	74.48	74.15	74.38	0.340	0.778
Rouge (a*)	2.77	2.63	2.04	0.300	0.203
Jaune (b*)	18.72	17.69	19.68	0.860	0.272
Index composite (moyenne Dos/Cuisse/Filet)					
Luminance (L*)	74.27	74.68	74.64	0.250	0.448
Rouge (a*)	2.16	2.35	1.89	0.176	0.185
Jaune (b*)	16.19 b	16.09 b	17.96 a	0.650	0.008

G1 = lot témoin non supplémenté en antioxydant ; G2 = Lot supplémenté avec 200 ppm vitamine E ; G3 = lot supplémenté avec 100 ppm vitamine E et polyphénols

Figure 2. Effet d'une supplémentation alimentaire en antioxydant sur la peroxydation des AG (nmol MDA/ g de viande) dans la cuisson de poulet (n = 10) *** p<0,001

EFFET DU MOMENT D'ACQUISITION DES SPECTRES PROCHE INFRAROUGE SUR LA QUALITE DE PREDICTION DU TAUX DE LIPIDES ET DU TAUX DE FONTE DES FOIES

**Deneufbourg Chloé¹, Manse Hélène¹, Céline Bravo¹, Bernadet Marie-Dominique²,
Morisson Mireille¹, Bonnefont Cécile MD¹**

¹ *GenPhyse, Université de Toulouse, INRA, INPT, ENVT, 31326 CASTANET-TOLOSAN*

² *INRA UEFG, 1076 Route de Haut Mauco, 40280 Benquet, France*

cecile.bonnefont@ensat.fr

RÉSUMÉ

Pour caractériser la composition biochimique des tissus animaux, la spectrométrie proche infrarouge (SPIR) est de plus en plus utilisée. Des études précédentes sur le foie gras ont montré la capacité de prédire le taux de lipides et le taux de fonte. L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet du moment d'acquisition des spectres sur la qualité de prédiction de ces deux paramètres. Des spectres infrarouges ont été acquis deux fois sur les mêmes foies gras, en post éviscération (PE) et en post refroidissement (PEPR). Le taux de fonte à la cuisson (n=182) et le taux de lipides (n=125) ont été mesurés. Chacun des groupes de spectres PE et PEPR ont été séparés en deux jeux de données, un jeu de calibration (2/3 des échantillons) et un jeu de validation afin d'établir des équations de prédiction de la composition des foies. Les deux jeux de calibration ainsi que les deux jeux de validation ont aussi été regroupés afin d'établir une équation de prédiction globale.

Les équations développées avec les spectres acquis en post éviscération permettent de prédire le taux de fonte et le taux de lipides des foies dont les spectres ont été acquis au même moment post-mortem, mais ne permettent pas de prédire ces grandeurs pour des spectres acquis en post refroidissement. Des résultats similaires ont été obtenus sur les spectres en post refroidissement. En outre, les équations développées sur l'ensemble des spectres disponibles ont une qualité de prédiction équivalente à celles citées précédemment. Ainsi, il est possible de rassembler des spectres acquis à différents moments post mortem et de faire une seule équation afin de prédire soit le taux de lipides des foies, soit leur taux de fonte.

ABSTRACT

Effect of time acquisition of near infrared spectra on the quality of the prediction of fatty liver lipid content and melting rate

Near infrared spectroscopy (NIRS) is more and more used to characterize the biological composition of animal tissues. Previous studies established that NIRS can predict the lipid content of fatty livers and their melting rate. This study aims at analyzing the effect of time acquisition of the spectra on the quality of the predictions of these two parameters. NIR spectra were both measured on the same fatty livers, in post evisceration (PE) and post cooling (PEPR). The melting rate (n=182) and the lipid content (n=125) were measured. Each of the spectra groups PE and PEPR were divided into two datasets, a calibration dataset (2/3 of the samples) and a validation dataset to develop prediction equation of the liver composition. Both calibration datasets and both validation datasets were pooled to develop a global prediction equation.

The equations developed with the spectra acquired in post evisceration can predict the melting rate and the lipid content of livers whose spectra were acquired at the same post mortem moment, but cannot predict these parameters on livers whose spectra were acquired in post cooling. Similar results were obtained with spectra acquired on post cooling livers. The equations developed on pooled spectra have a prediction quality equivalent to the previous ones. Spectra acquired at different post-mortem moments can be pooled together to develop a unique equation so as to predict either the melting rate or the lipid content.

INTRODUCTION

Afin d'évaluer la composition et la qualité des foies gras, différentes analyses biochimiques sont réalisées (matière sèche, taux de protéines et de lipides...). Cependant, celles-ci nécessitent de prélever un échantillon, ce qui entraîne une dévalorisation notable du produit. En outre, ces méthodes analytiques de référence sont complexes à mettre en œuvre, coûteuses, chronophages et polluantes (utilisation de produits chimiques). La spectrométrie proche infrarouge (SPIR) représente une alternative intéressante pour la détermination de la nature ou de la composition des échantillons, notamment lorsqu'il y a beaucoup d'échantillons à analyser. En effet, cette méthode rapide permet, entre autres, d'analyser plusieurs constituants en une seule mesure et de préserver l'intégrité des échantillons. Elle a déjà été mise en œuvre pour caractériser la composition des tissus d'animaux et notamment la teneur en matière grasse de la viande de bœuf (Mourot et al., 2013), de porc (Pérez-Marín et al., 2007), de lapin (Zomeño et al., 2011), de poulet (Zhou et al., 2012), de canard (Bastianelli, et al. 2008) ainsi que le foie gras de canard et d'oie (Molette et al., 2001 ; Marie-Etancelin et al., 2010). Concernant le foie gras plus particulièrement, Bastianelli et al. (2011) ont montré que l'acquisition des spectres en laboratoire, après broyage des échantillons, permettait d'obtenir des performances d'étalonnage meilleures que l'acquisition des spectres en surface des foies. Lors d'essais précédents dans notre laboratoire (non montrés), les spectres PIR ont été acquis soit sur des foies après leur éviscération à chaud, soit sur des foies après leur refroidissement. L'effet du moment d'acquisition des spectres sur la qualité de prédiction n'a pas été encore étudié. L'objectif de ce travail est donc de connaître le moment optimal d'acquisition des spectres afin d'améliorer la qualité de prédiction du taux de fonte à la cuisson des foies et de leur taux de lipides.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et analyses des foies

Un lot de 182 canards mulards mâles et femelles a été élevé et gavé à la ferme expérimentale de l'INRA d'Artiguères (INRA-UEPFG, France ; projet MetEpic, Cornuez et al. 2015). Les échantillons de foies gras ont été prélevés et congelés dans de l'azote liquide, puis conservés à -80°C jusqu'à leur analyse. Le taux de fonte a été déterminé sur l'ensemble des échantillons. Pour ce faire, un morceau de 60 g de foie a été stérilisé, en boîte de fer sertie, à 105°C pendant 65 minutes. Le taux de lipides a été mesuré sur un

sous-groupe de 125 échantillons avec une extraction à froid au chloroforme-méthanol (Folch et al., 1957).

1.2. Acquisition des spectres PIR et analyses

Les données spectrales ont été collectées en réflectance (R) dans les régions du visible et du PIR (350-2500 nm, pas de 1 nm) avec un spectromètre portable LabSpec® 5000 (ASD Inc., Boulder (CO), USA) équipé d'un module de contact. Deux acquisitions successives des spectres ont été réalisées sur les mêmes foies : juste après l'éviscération à chaud des canards (spectres « *post* éviscération - PE ») et après refroidissement du foie en chambre froide à 4°C durant 6 h (spectres « *post* éviscération et *post* refroidissement PEPR »). Respectivement six et quatre spectres ont été acquis sur toute la surface du foie et enregistrés en absorbance ($A = \log 1/R$).

Le traitement des spectres et le développement des équations de prédiction ont été réalisés avec le logiciel WinISI (version 4.6.8, FOSS Analytical A/S, Hilleroed, Danemark). Les analyses ont été réalisées sur le spectre moyen de chaque échantillon. La fenêtre spectrale étudiée a été réduite à 650-2350 nm afin d'éliminer le bruit sur les valeurs extrêmes.

Les spectres PE ont été divisés aléatoirement afin de construire un jeu de calibration contenant deux tiers des données et un jeu de validation (le tiers restant). Des jeux de données contenant les mêmes échantillons ont été établis pour les spectres PEPR. Afin de tester, l'efficacité des prédictions dans des conditions variables, les jeux de calibration des spectres acquis sur les foies juste après l'éviscération à chaud ou après refroidissement des foies (PE et PEPR) ont été rassemblés pour former le jeu de calibration avec tous les spectres (Tous). Ce groupe est donc composé de deux répétitions de chaque échantillon de foie l'une avec le spectre PE et l'autre avec le spectre PEPR. Le jeu de validation Tous a été composé de façon identique en regroupant les jeux de validation PE et PEPR.

Des analyses en composantes principales ont été réalisées afin de comparer les groupes d'échantillons. Plusieurs prétraitements mathématiques ont été testés afin d'optimiser la qualité de prédiction du taux de fonte et du taux de lipides des foies. Seul le meilleur prétraitement est présenté ici. Les équations de prédiction ont été établies par régression partielle des moindres carrés (mPLS du logiciel WinISI) après transformation des données par une Standard Normal Variate and Detrend (SNVD) avec une dérivée première et un lissage de 10 (1,10,10,1). Ces équations ont été établies avec les jeux de calibration PE, PEPR et Tous. Des validations croisées ont été effectuées afin d'estimer la robustesse des équations de prédiction. Les erreurs standards de calibration (SEC), erreurs standards de validation croisée (SECV), le coefficient de corrélation R^2 et la variance expliquée (1-VR, la Variance Résiduelle) ont été déterminés pour chacun des modèles de prédiction. Plus le SECV est proche du SEC et plus il est petit,

meilleure est la prédiction. Plus le R^2 et le 1-VR sont élevés, meilleur est le modèle. Les équations obtenues ont été appliquées aux trois jeux de validation (PE, PEPR et Tous). L'erreur standard de la prédiction (SEP) a été déterminée, elle permet d'estimer la qualité de la prédiction du modèle sur un jeu de données séparé. Plus la SEP est proche de la SECV, meilleure est la qualité de prédiction du modèle. On notera $SEP_{PEPR/PE}$ la SEP du jeu de validation PE obtenue avec l'équation développée avec le jeu de calibration PEPR. Lors de la régression, les échantillons considérés comme atypiques (valeur critique « T » $\geq 3,5$) ont été retirés du modèle.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les statistiques descriptives des taux de fonte et taux de lipides des foies des groupes de calibration et de validation sont présentées dans le Tableau 1. Pour le taux de fonte, les moyennes et écart-types sont de $33,4 \pm 15,7 \%$ et $33,5 \pm 14,9 \%$ dans les jeux de calibration et de validation et pour le taux de lipides, ils sont respectivement de $55,9 \pm 4,0 \%$ et de $54,9 \pm 4,2 \%$. Les jeux de données sont donc bien représentatifs de l'ensemble des données.

Des ACP réalisées sur les spectres PE, PEPR et tous les spectres n'ont pas montré de séparation entre les spectres des foies des mâles et des femelles (non montré), ainsi, par la suite, le facteur sexe n'est pas pris en compte.

L'ACP représentant les spectres acquis sur les foies en *post* éviscération et *post* refroidissement montre une superposition des deux groupes (Figure 1).

Les équations de prédiction du taux de fonte et du taux de lipides ont été réalisées avec un modèle mPLS de Winisi et un prétraitement mathématique SNVD (1,10,10,1). Les caractéristiques des équations de prédiction développées avec les spectres PE, les spectres PEPR et tous les spectres pour prédire le taux de fonte et le taux de lipides sont présentées respectivement dans les tableaux 2 et 3.

Pour le taux de fonte, l'équation développée à partir des spectres acquis sur les foies en *post* éviscération (PE) donne les meilleurs résultats, car la variance expliquée est la plus grande (86,9%), le coefficient de corrélation est maximal (0,921) et l'erreur standard de la validation croisée est la plus petite (5,729) (Tableau 2). Les performances de l'équation développée sur les spectres acquis sur les foies après refroidissement sont moins bonnes, la variance expliquée n'est que de 74,4% et le SECV est supérieur de 1,7 point (Tableau 2) et celles de l'équation développée sur tous les spectres quel que soit le moment d'acquisition sont intermédiaires. Une étude précédente réalisée sur des spectres acquis sur des foies gras juste après leur éviscération à froid à 24h *post-mortem*, ont montré des performances légèrement meilleures que celles sur les spectres acquis après refroidissement, mais moins bonnes que celles sur les spectres acquis juste après

une éviscération à chaud des foies ($SEC = 5,69$, $R^2 = 0,85$ et $SECV = 6,52$; Marie-Etancelin et al. 2014).

L'application des équations de prédiction du taux de fonte développée avec les spectres PE sur des spectres PE indépendants (jeux de validation PE) montre que la prédiction est de bonne qualité ($SEP_{PE/PE} = 8,977$ et $SEP_{PE/PE} - SECV_{PE} = 3,248$; Tableau 2). Il en est de même pour l'équation développée sur les spectres PEPR ($SEP_{PEPR/PEDR} = 8,651$ et $SEP_{PEPR/PEDR} - SECV_{PEDR} = 1,168$). Les courbes des valeurs prédites du taux de fonte en fonction des valeurs mesurées sont présentées sur la figure 2 (A et B). La pente de la droite tracée avec les valeurs PE est plus proche de 1 (0,83) que celle réalisée avec les valeurs PEPR (0,74). L'équation Tous développée avec les spectres PE et PEPR améliore la prédiction du taux de fonte des foies dont les spectres ont été acquis après refroidissement ($SEP_{Tous/PEPR} = 7,518$ et $SEP_{Tous/PEPR} - SECV_{Tous} = 1,098$) mais dégrade légèrement la prédiction du taux de fonte des foies dont les spectres ont été acquis après éviscération ($SEP_{Tous/PE} = 9,016$ et $SEP_{Tous/PE} - SECV_{Tous} = 2,596$). La prédiction du taux de fonte atteignait une SEP de 7,12 et une valeur de SEP-SECV de 0,6 dans l'étude de Marie-Etancelin et al. (2014), ce qui est meilleur que nos résultats mais les effectifs dans les jeux de calibration et de validation étaient bien supérieurs.

En revanche, lorsque l'équation de prédiction du taux de fonte établie à partir des foies PE est appliquée sur des spectres PEPR, la SEP est 1,5 fois plus élevée par rapport à celle obtenue sur des spectres PE ($SEP_{PE/PEPR} = 18,397$ et $SEP_{PE/PE} = 8,977$; Tableau 2), ce qui montre une forte dégradation de la prédiction du modèle. Cette dégradation est encore plus marquée (multipliée par 2,1) pour l'utilisation de l'équation de prédiction des spectres PEDR pour prédire des valeurs sur des spectres PE ($SEP_{PEDR/PE} = 18,678$ et $SEP_{PEPR/PEDR} = 8,651$; Tableau 2).

En ce qui concerne le taux de lipides, la meilleure équation de prédiction est obtenue avec le jeu de calibration PE ($R^2 = 0,883$, 1-VR = 77,3%, $SECV = 1,860$; Tableau 3). L'application de cette équation sur les spectres du jeu de validation PE montre que la prédiction est de bonne qualité ($SEP_{PE/PE} = 2,325$ et $SEP_{PE/PE} - SECV_{PE} = 0,465$; Tableau 2). De même, la prédiction du taux de lipides avec les spectres PEPR sur les spectres PEPR est bonne ($SEP_{PEPR/PEDR} = 2,638$ et $SEP_{PEPR/PEDR} - SECV_{PEDR} = 0,665$).

De même que pour le taux de fonte, l'équation développée avec tous les spectres améliore légèrement la prédiction du taux de lipides des spectres PEPR ($SEP_{Tous/PEPR} = 2,532$ et $SEP_{Tous/PEPR} - SECV_{Tous} = 0,403$) mais dégrade légèrement celle des spectres PE ($SEP_{Tous/PE} = 2,491$ et $SEP_{Tous/PE} - SECV_{Tous} = 0,369$).

Dans la même étude que Marie-Etancelin et al. (2014), Bastianelli et al. (2011) ont étudié la prédiction du taux de lipides avec des spectres acquis sur des foies gras juste après leur éviscération à froid à 24h *post-mortem*. Ils ont montré des performances

proches de celles présentées ici ($SEC = 2,07$, $R^2 = 0,89$ et $SECV = 2,24$; Bastianelli et al. 2011).

En revanche l'équation développée sur les spectres PE ne permet pas une bonne prédiction des spectres PEPR (SEP multipliée par 5,7 ; ($SEP_{PE/PEPR} = 13,221$ et $SEP_{PE/PE} = 2,325$; Tableau 2), et l'équation développée sur les spectres PEPR n'apporte pas des résultats satisfaisants pour la prédiction des spectres PE ($SEP_{PEDR/PE} = 4,035$ et $SEP_{PEPR/PEDR} = 2,638$; Tableau 3).

Les courbes des valeurs prédites du taux de lipides en fonction des valeurs mesurées sont présentées sur la figure 2 (D,E,F). La pente de la droite tracée avec les valeurs PE est plus proche de 1 (0,81) que celle réalisée avec les valeurs PEPR (0,64).

CONCLUSION

Cette étude confirme que la spectrométrie proche infrarouge permet de prédire le taux de fonte et le taux de lipides des foies gras. Mais elle montre que le moment d'acquisition des spectres influence les résultats obtenus. En effet, les équations, établies à

partir de spectres acquis avant ou après le refroidissement des foies permettent une bonne prédiction du taux de fonte et du taux de lipides pour des spectres acquis dans les mêmes conditions. Pour le taux de lipides, la prédiction est meilleure avec les spectres acquis sur des foies chauds après leur éviscération. En revanche, les équations de prédiction du taux de fonte ou du taux de lipides, établies sur des spectres de foies après éviscération, ne permettent pas une bonne prédiction de la composition des foies, dont les spectres ont été acquis sur des foies après refroidissement, et vice-versa.

L'étude montre qu'il est possible d'analyser de façon conjointe des spectres qui ont été acquis sur des foies encore chauds après leur éviscération et sur des foies déjà refroidis.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Aurélie Tircazes-Secula, UMR GenPhySE, pour la gestion des échantillons.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bastianelli, D., Fernandez X., Bernadet MD., Manse H., Bonnal L., Marie-Etancelin C., 2011. Proceedings of the 15th International Conference on Near Infrared Spectroscopy: 13–20 may 2011, Cape Town, 328-330.
- Bastianelli, D., Bonnal L., Chartrin P., Bernadet MD., Marie-Etancelin C., Baéza E., 2008. 8^e JRPF2008, Arcachon, France, 161-164.
- Cornuez A., Bernadet MD., Cobo E., Mercierand F., Le Bourhis C., Lessire M., Martin X., Pitel F., Bonnefont CMD., Brun JM., Morisson M., 2015, 11^e JRA-JRPF2015, 25-26 mars 2015, Tours, 424-428.
- Folch J., Lees M., Sloane Stanley GH., 1957. J. Biol. Chem., (226), 497–509.
- Marie-Etancelin, et al., 2010. 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig, Allemagne.
- Marie-Etancelin C., Vitezica ZG., Bonnal L., Fernandez X., Bastianelli D., 2014. GSE, (46) 38.
- Molette, C., Berzaghi P., Dalle Zotte A., Rémignon H., Babilé R., 2001. Poult. Sci., (80), 1625-1629.
- Mourou BP., Gruffat D., Durand D., Chesneau G., Mairesse G., Andueza D., 2013. Nutrition clinique et métabolisme, (27), S45.
- Pérez-Marín, D., Garrido-Varo A., De Pedro E., Guerrero-Ginel JE., 2007. Chemometrics and intelligent laboratory systems, (87), 241-246.
- Zhou, LJ., Wu H., Li JT., Wang ZY., Zhang LY., 2012. Meat Sci., (90), 658-664.
- Zomeño, C., Hernandez P., Blasco A., 2011. World Rabbit Science, (19), 203-208.

Tableau 1. Statistiques descriptives du poids de foie, du taux de fonte et du taux de lipides pour les 3 jeux de données : calibration, validation et de l'ensemble des données.

	Poids foie			Taux fonte			Taux lipides		
	Calibration n=121	Validation n=61	Ensemble n=182	Calibration n=121	Validation n=61	Ensemble n=182	Calibration n= 89	Validation n=36	Ensemble n=125
Minimum	321	328	321	6,1	6,3	6,1	47,0	44,6	44,6
Maximum	779	740	779	58,5	61,6	61,6	64,1	61,9	64,1
Moyenne	528	533	530	33,4	33,5	33,5	55,9	54,9	55,6
Ecart-type	90	110	97	15,7	14,9	15,4	4,0	4,2	4,1

Tableau 2. Caractéristiques des équations de prédiction du taux de fonte obtenues sur les jeux de calibration (post éviscération [PE], post refroidissement [PEPR] et sur la combinaison de ces deux jeux [Tous]) et appliquées à chacun des trois jeux de validation (PE, PEPR et Tous).

	Calibration					Validation - SEP		
	Effectif	SEC	R ²	SECV	1-VR	Jeu Val. PE (n=61)	Jeu Val. PEPR (n=61)	Jeu Val. Tous (n=122)
Equation PE	112/121	4,460	0,921	5,729	0,869	8,977	18,397	14,475
Equation PEPR	119/121	6,433	0,835	7,483	0,744	18,678	8,651	14,555
Equation Tous	230/242	5,548	0,875	6,420	0,832	9,016	7,518	8,301

SEC : erreur standard de la calibration ; R² : coefficient de corrélation ; SECV : erreur standard de la validation croisée ; 1-VR : variance expliquée par le modèle ; SEP : erreur standard de la prédiction.

Tableau 3. Caractéristiques des équations de prédiction du taux de lipides obtenues sur les jeux de calibration (post éviscération [PE], post refroidissement [PEPR] et sur la combinaison de ces deux jeux [Tous]) et appliquées à chacun des trois jeux de validation (PE, PEPR et Tous).

	Calibration					Validation - SEP		
	Effectif	SEC	R ²	SECV	1-VR	Jeu Val. PE (n=36)	Jeu Val. PEPR (n=36)	Jeu Val. Tous (n=72)
Equation PE	88/89	1,344	0,883	1,860	0,773	2,325	13,221	9,492
Equation PEPR	85/89	1,728	0,797	1,973	0,732	4,035	2,638	3,409
Equation Tous	175/178	1,760	0,797	2,129	0,701	2,491	2,532	2,512

Figure 1. ACP de l'ensemble des spectres acquis après l'éviscération des foies (croix bleues) et après leur refroidissement (carrés verts)

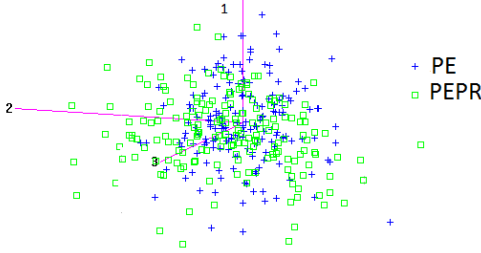
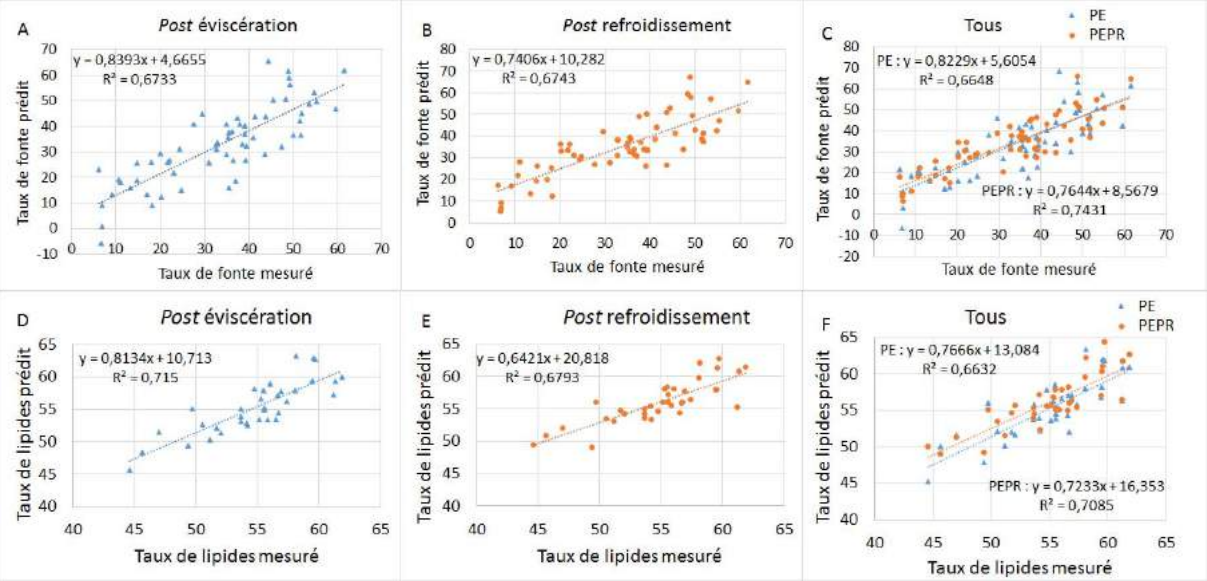


Figure 2. Représentations graphiques des valeurs prédites en fonction des valeurs mesurées pour le taux de fonte (A, B et C) et pour le taux de lipides (D, E et F) à partir de spectres acquis sur les foies post éviscération (A et D), sur les foies post refroidissement (B et E) et sur l'ensemble des foies (C et F).



EFFET DU MOMENT D'ACQUISITION DES SPECTRES PROCHE INFRAROUGE SUR LA QUALITÉ DE PRÉDICTION DU TAUX DE LIPIDES ET DU TAUX DE FONTE DES FOIES GRAS

C. Deneufbourg¹, H. Manse¹, C. Bravo¹, MD. Bernadet², M. Morisson¹ et CMD Bonnefont¹

¹ GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, INPT, ENVT, 31326 CASTANET-TOLOSAN

² INRA UEPFG, 1076 route de Haut-Mauco, 40280 BENQUET

Auteur correspondant : cecile.bonnefont@ensat.fr

Contexte et objectif

Afin d'évaluer la composition et la qualité des foies gras, des analyses biochimiques sont réalisées. Néanmoins, celles-ci nécessitent, entre autres, de prélever un échantillon ce qui entraîne une dévalorisation notable du produit. La spectrométrie proche infrarouge (SPIR) représente une alternative intéressante face à ces méthodes analytiques de référence qui sont complexes à mettre en œuvre, coûteuses, chronophages et polluantes.

L'objectif de cette étude était de déterminer le **moment d'acquisition des spectres proche infrarouge (PIR)** permettant d'obtenir la **meilleure prédiction des taux de lipides et de fonte des foies gras**.

Matériels et méthodes

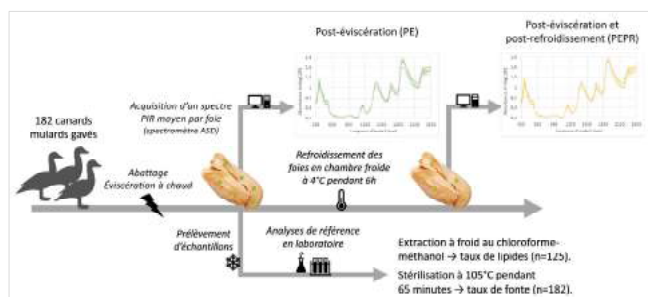


Figure 1. Méthodologie d'acquisition des spectres proche infrarouge et d'analyse des échantillons de foies gras.

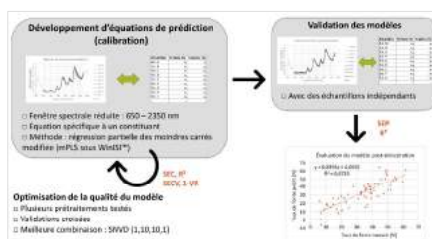


Figure 2. Méthodologie du développement des modèles de prédiction.

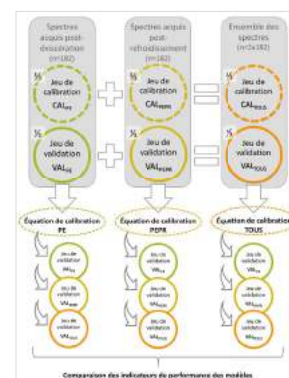


Figure 3. Méthodologie des différents tests effectués pour évaluer les performances des équations de prédiction.

Résultats

Tableau 1. Statistiques descriptives du poids de foie, du taux de fonte et du taux de lipides pour les trois jeux de données : ensemble des données, calibration et validation.

	Poids foie			Taux fonte			Taux lipides		
	Calibration n=121	Validation n=61	Ensemble n=182	Calibration n=121	Validation n=61	Ensemble n=182	Calibration n= 89	Validation n=36	Ensemble n=125
Minimum	321	328	321	6,1	6,3	6,1	47,0	44,6	44,6
Maximum	779	740	779	58,5	61,6	61,6	64,1	61,9	64,1
Moyenne	528	533	530	33,4	33,5	33,5	55,9	54,9	55,6
Ecart-type	90	110	97	15,7	14,9	15,4	4,0	4,2	4,1

Tableau 2. Indicateurs de performance des modèles de prédiction du taux de fonte obtenus sur les jeux de calibration (PE, PEPR et Tous) et appliqués à chacun des trois jeux de validation (PE, PEPR et Tous).

	Calibration					Validation - SEP		
	Effectif	SEC	R ²	SECV	1-VR	Jeu Val. PE (n=61)	Jeu Val. PEPR (n=61)	Jeu Val. Tous (n=122)
Equation PE	112/121	4,460	0,921	5,729	0,869	8,977	18,397	14,475
Equation PEPR	119/121	6,433	0,835	7,483	0,744	18,678	8,651	14,555
Equation Tous	230/242	5,548	0,875	6,420	0,832	9,016	7,518	8,301

SEC : erreur standard de la calibration ; R² : coefficient de corrélation ; SECV : erreur standard de la validation croisée ; 1-VR : variance expliquée par le modèle ; SEP : erreur standard de la prédiction.

Tableau 3. Indicateurs de performance des modèles de prédiction du taux de lipides obtenus sur les jeux de calibration (PE, PEPR et Tous) et appliqués à chacun des trois jeux de validation (PE, PEPR et Tous).

	Calibration					Validation - SEP		
	Effectif	SEC	R ²	SECV	1-VR	Jeu Val. PE (n=36)	Jeu Val. PEPR (n=36)	Jeu Val. Tous (n=72)
Equation PE	88/89	1,344	0,883	1,860	0,773	2,325	13,221	9,492
Equation PEPR	85/89	1,728	0,797	1,973	0,732	4,035	2,638	3,409
Equation Tous	175/178	1,760	0,797	2,129	0,701	2,491	2,532	2,512

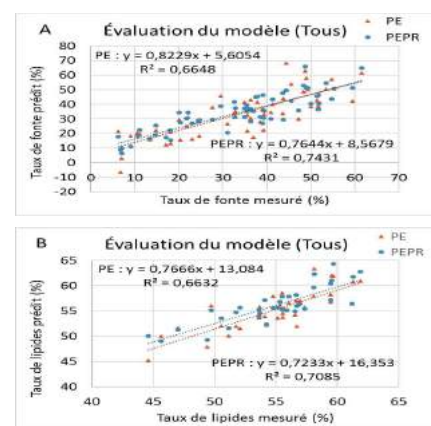


Figure 4. Valeurs prédites en fonction des valeurs mesurées pour le taux de fonte (A) et le taux de lipides (B) avec des spectres acquis avant et après refroidissement (Tous).

Conclusion

Cette étude montre que les équations, développées avec les spectres acquis sur les foies avant leur refroidissement, permettent une **prédiction satisfaisante des taux de lipides et de fonte** pour les échantillons dont les spectres ont été acquis dans les mêmes conditions. En revanche, leurs performances sur les échantillons dont les spectres ont été acquis après refroidissement des foies sont jugées insuffisantes. Des résultats analogues ont été obtenus avec les équations établies à partir des spectres sur les foies après leur refroidissement.

Les résultats obtenus mettent en avant qu'il est également **possible de prédire les valeurs des caractéristiques étudiées, aussi bien sur des foies encore chauds après l'éviscération que déjà refroidis, à partir d'une même équation** à condition que celle-ci ait été développée avec des spectres acquis avant et après refroidissement des foies gras.

INTEGRATION DE DONNEES « OMIC » ET COMPREHENSION DES MECANISMES SOUS-JACENTS A LA PRODUCTION DE FOIE GRAS

François Yoannah¹, Liaubet Laurence¹, Molette Caroline², Vignal Alain¹, Marty-Gasset Nathalie¹, Marie-Etancelin Christel¹

¹INRA GenPhySE, Chemin de Borde Rouge, BP 52 627, 31 326 CASTANET-TOLOSAN Cedex – FRANCE,

²EURALIS, Bois de Marmajou, 65 700 MAUBOURGUET - FRANCE

Christel.marie-etancelin@inra.fr

RÉSUMÉ

Un programme de détection de QTL d'intérêts du canard mulard a conduit à l'identification de 80 QTL phénotypiques et de 176 pQTL d'abondances protéiques quantifiées dans le foie gras. Afin de donner sens à cette masse de résultats, nous avons en premier lieu testé l'existence de QTL pléiotropiques entre une abondance protéique et un phénotype lorsque ces 2 QTL étaient co-localisés sur le génome, à l'aide du logiciel CLIPtest : parmi les 66 co-localisations observées, nous avons conclu à la possible existence d'un QTL pléiotropique pour 16 cas et pour 21 cas à 2 QTLs distincts mais liés. La réalisation de graphiques d'inférence à l'aide du logiciel Gephi a permis de visualiser les résultats. Ainsi le taux de fonte du foie gras est régulé par un QTL pléiotropique qui impacte simultanément 2 spots distincts de l'alpha-énolase, ce qui met en évidence sur le chromosome 15 un locus impliqué dans la régulation de la voie glycolytique. Sur le chromosome 7, un QTL affectant conjointement le poids de la cuisse et l'apolipoprotéine A1 a été mis en évidence, confirmant le rôle central de cette protéine dans le transport et le stockage des lipides. Le QTL pléiotropique du chromosome Z associe la protéine GLUD1 et le taux de glucose sanguin après un repas de gavage, le gène *GLUD1* modulant l'absorption hépatique du glucose par le foie via la production d'insuline. Aucun de ces 16 QTLs pléiotropiques ne met en œuvre un cis-QTL, confirmant la complexité des régulations métaboliques jouant sur un phénotype.

ABSTRACT

“Omics” data integration and understanding of underlying mechanisms of fatty liver production traits.

A QTL program in mule ducks for fatty liver led to the identification of 80 phenotypic QTLs and 176 pQTL of protein abundances in fatty liver. In order to give meaning to these numerous results, we first tested the hypothesis of pleiotropic QTLs between a protein and a phenotype when the 2 traits presented QTLs co-localized on the genome, using the CLIPtest software: among the 66 co-locations observed, we concluded of 16 possible pleiotropic QTLs and, for 21 cases, of 2 distinct but linked QTLs. Building graphs of inference using the Gephi software made possible to visualize the results. Thus the melting rate of liver is regulated by a pleiotropic QTL which simultaneously impacts two distinct alpha-enolase's spots, which demonstrate that a locus on chromosome 15 participates in the regulation of the glycolytic pathway. On chromosome 7, a QTL affecting both the thigh weight and the apolipoprotein A1 was identified, confirming the central role of this protein in the transport and storage of lipids. The pleiotropic QTL of the Z chromosome associates the GLUD1 protein and the blood glucose level after force-feeding, the *GLUD1* gene modulating the hepatic absorption of the glucose by the liver via insulin production. None of these 16 pleiotropic QTLs were cis-QTL, confirming the complexity of metabolic regulation of the phenotype.

INTRODUCTION

Les approches dites « omics » - qu'elles concernent les protéines, les métabolites ou les transcrits – sont des approches « haut débit » produisant un grand nombre de mesures pour un seul et même tissu. Couplées avec des détections de QTL impliquant des centaines de marqueurs, ces méthodes d'analyses conduisent à l'identification d'un grand nombre de zones du génome d'intérêt, et nous confrontent à la difficulté d'interprétation de cette masse de résultats.

A partir de données de protéome du foie gras, nous allons montrer comment, parmi tous les QTL protéomiques co-localisés sur le génome avec des QTL de caractères d'intérêts des animaux, nous allons pouvoir distinguer ceux où 2 QTL proches mais distincts influencent les 2 caractères, de ceux où les 2 caractères sont influencés par le même QTL, que l'on qualifie de pléiotropique.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Données disponibles : QTL phénotypiques et protéomiques identifiés

Le dispositif animal se compose de 294 canards mulards gavés issus de 3 familles F1 de canards communs. Ces animaux ont été caractérisés par 49 caractères zootechniques allant de la croissance, à la réaction au stress, du métabolisme hépatique durant le gavage à l'aptitude au gavage et la qualité des produits (foies gras et magrets). Pour chacun de ces canards mulards, 326 spots de protéines solubles présentes dans les foies gras ont été quantifiés à l'aide d'électrophorèses bidimensionnelles et identifiés par spectrométrie de masse (Francois et al., 2015).

Une première détection de QTL uni-caractère portant sur les 49 caractères zootechniques d'une part et les 326 abondances protéiques d'autre part, a permis d'identifier 80 QTL phénotypiques et 176 QTL protéomiques au seuil de 5 % au niveau du chromosome. Lorsque les QTL uni-caractères co-localisent dans un même intervalle de confiance, les caractères correspondants ont été associés 2 à 2 (un caractère zootechnique avec un spot protéique) et des détections de QTL bi-caractères ont été effectuées : 290 analyses bi caractères protéome-phénomène de détections de QTL ont été entreprises et 66 détections bi-caractères dont le niveau de significativité était supérieur à celui du QTL le plus significatif en uni-caractère ont été retenus.

1.2. Carte génétique

La population commune, *i.e.* les 98 canes BC -mères des 294 canards mulards- et leurs 29 ascendants, a été

génomotypée à l'aide d'un jeu de 334 marqueurs (278 SNP et 56 microsatellites) répartis en 28 groupes de liaisons positionnés sur 28 chromosomes différents du canard commun (*Anas Platyrhynchos* -APL).

1.3. Analyse statistique : tests de la pléiotropie

Afin de distinguer entre 1 QTL pléiotropique (un seul et même locus impactant 2 phénotypes) et 2 QTL liés (2 locus très proches, qui sont très corrélés, impactant 2 phénotypes) parmi les 66 détections bi-caractères significatives, nous avons mis en œuvre le CLIP-test (pour Close Linkage versus Pleiotropism) proposé par David et al. (2013). Ce test considère que sous l'hypothèse (H0) de pléiotropie la forme des effets des marqueurs dans la zone génomique d'intérêt doit être similaire pour les 2 caractères tandis qu'elle doit être différente sous l'hypothèse (H1) de QTL proches et liés.

1.4. Analyses graphiques

Pour aider à l'interprétation des résultats du CLIP-test, des graphes d'inférence ont été réalisés à l'aide du logiciel Gephi (Bastian et al., 2009). Les liens protéome-phénomène pour lesquels un effet pléiotropique est supposé sont épaissis dans le graphe pour les différencier des liens dus à 2 QTL liés.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Pléiotropie

Parmi les 66 détections de QTL bi-caractères pour lesquelles le CLIP-test a été mis en œuvre, 29 n'ont pas convergé, l'hypothèse de QTL pléiotropique a été rejetée pour 21 bi-caractères pour lesquels nous avons conclu l'existence de 2 QTL liés et très proches. Au final, 16 couples « phénomène – protéome » sont supposés être sous dépendance partielle d'un seul QTL pléiotropique. En particulier pour le foie gras, c'est le cas pour le taux de fonte et 2 spots distincts d'alpha-éolase sur APL15, la luminance du foie et le glutamate déshydrogénase (GLUD1) sur le chromosome APL6, l'indice de jaune du foie et la peroxyrédoxine 4 sur APL22. Le poids de la cuisse semble être modulé de façon pléiotropique avec l'apolipoprotéine A1 sur le chromosome APL7, et le pH ultime du muscle avec 2 protéines -l'ATP synthase sous unité bêta et la triose phosphate isomérase- sur APLZ. Des QTL pléiotropiques sont aussi détectés avec les paramètres sanguins durant le gavage : le taux de glucose sanguin en début de gavage avec d'une part l'hydrolase 3-hydroxyisobutyryl-CoA sur APL10 et d'autre part la glutamate déshydrogénase sur APLZ ; enfin le taux de cholestérol en début de gavage et la sulfurtransférase 3-mercaptopyruvate sur APL15.

2.2. Intégration des données

Afin d'illustrer les résultats de détections bi-caractères obtenus et de nous aider à leur interprétation, une représentation graphique des interactions a été construite (Figure 1).

Sur le chromosome APL15 (Figure 1B), nous avons cartographié plusieurs QTL et pQTL autour du marqueur SNP266, dont un QTL relatif au taux de fonte (MR) et 2 pQTL relatifs à l'alpha-énolase (ENO1) et à la protéine chaperone CCT7. L'étude conjointe du taux de fonte et de la protéine CCT7 montre qu'ils sont régulés par 2 QTL très proches mais néanmoins disjoints. A l'inverse, le taux de fonte et les 2 spots d'ENO1 (spots 112 et 124) sont contrôlés par 2 QTL pléiotropiques que l'on suppose être un seul et même QTL puisque le CLIPtest effectué sur ces 2 spots conjointement ne rejette pas la pléiotropie (résultats non présentés). Ce faisceau de résultats suggère l'existence d'un locus sur le chromosome APL15 impliqué dans la régulation de la voie glycolytique. Pour affiner ce résultat, il serait intéressant d'étudier le gène *LMF1* (Lipoprotein maturation factor 1, Peterfy, 2012) chez le canard : en effet, chez le poulet le marqueur SNP266 se situe dans la partie intronique du gène *LMF1* et la protéine qu'il code est impliquée dans la maturation des lipoprotéines avant qu'elles ne quittent les cellules hépatiques.

Un QTL pléiotropique apparait comme co-régulant le poids de la cuisse (TSW) et l'apolipoprotéine A1 (APOA1) sur le chromosome 7 (Figure 1F). Cette protéine est connue pour jouer un rôle dans la conformation des HDL (High Density Lipoprotein), qui transportent le cholestérol des tissus périphériques vers le foie. Chez le poulet, les publications rapportent principalement des liens entre APOA1 et la quantité de gras abdominal (Resnyk et al. 2013, Bourneuf et al. 2006). Ainsi, de nombreux QTLs liés au gras abdominal ont été identifiés sur le chromosome GGA7, chromosome du poulet homologue d'APL7 du canard (Wang et al. 2012). Par ailleurs, Lagarrigue et al. (2000) ont montré que les poulets d'une lignée grasse présentaient significativement plus de d'ARNm d'APOA1 que les oiseaux de la lignée maigre. Sur ce modèle animal mâle, ces auteurs considèrent que cette protéine a un rôle de transport mais aussi de stockage des lipides chez les oiseaux. Dans notre cas, les muscles de la cuisse n'étant pas dissociés de la peau et du gras sous-cutané, nous suggérerons que le lien APOA1 et poids de la cuisse provient de différences de gras stockés en sous-cutané lors du gavage. Ainsi, bien que nous n'ayons identifié aucun QTL pour le gras abdominal sur APL7, nos résultats sont cohérents avec le fait qu'APOA1 joue un rôle important dans l'exportation des lipides.

Sur le chromosome APLZ, un QTL supposé pléiotropique a été identifié comme régulant à la fois

le niveau de glucose sanguin en début de gavage et la glutamate déshydrogénase (Figure 1F). La protéine GLUD1 n'est pas directement impliquée dans la voie métabolique des lipides mais intervient dans le cycle de Krebs en participant à la synthèse du citrate, nécessaire à la synthèse des lipides. Chez l'homme, une mutation du gène GLUD1 conduit au syndrome d'hyperinsulinémie/d'hyperammoniémie (Rahman et al., 2015). La modification du gène induit l'augmentation de la production d'insuline par les cellules du pancréas, ce qui accroît l'absorption du glucose par le foie. Ce mécanisme de régulation se produisant naturellement après chaque repas, un QTL affectant simultanément l'abondance de la protéine GLUD1 et le taux de glucose sanguin après le repas est très plausible.

Parmi les 16 QTLs bi-caractères pour lesquels un effet pléiotropique peut être supposé, aucun ne se situe à une position chromosomique proche de celle du gène codant la protéine. Contrairement à ce que Consoli et al. (2002) suggèrent, cette approche ne permet pas d'identifier directement le gène candidat.

L'interprétation de ces QTL pléiotropiques est clairement plus complexe : la variation génétique affecte probablement un gène qui modifie une voie de signalisation ou métabolique impactant la protéine pour laquelle le pQTL a été trouvé. De plus, la faible densité de notre carte génétique (334 marqueurs seulement) et la relative pauvreté de l'annotation du génome du canard ne permet pas de formuler des hypothèses robustes pour les différents QTLs pléiotropiques identifiés.

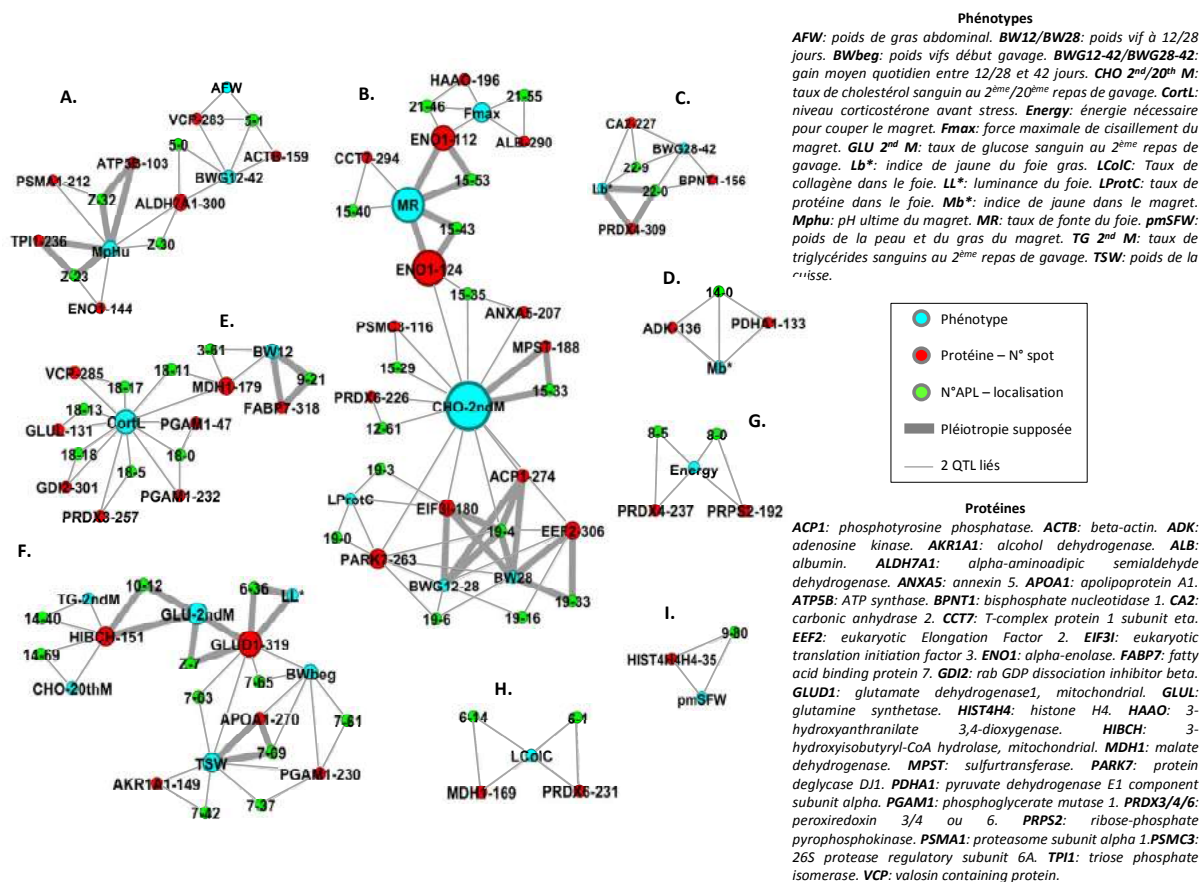
Néanmoins, l'association caractères et protéines pour lesquels le QTL pléiotropique était très significatif (taux de fonte et ENO1 sur APL15 ; Poids de la cuisse et APOA1 sur APL7 ; taux de glucose sanguin et glutamate déshydrogénase sur APLZ) a permis de donner des premières explications très cohérentes sur les voies métaboliques impactées.

CONCLUSION

Grâce à l'analyse conjointe des QTL phénotypiques et protéomiques et à l'identification des locus à effet pléiotropiques, cette étude a mis en exergue certains mécanismes métaboliques impliqués dans les variations génétiques de caractères d'intérêts du canard mulard gavé, tels que le taux de fonte et la glycolyse ou le poids de cuisse et le transport des lipides. A l'inverse, l'identification de mécanismes métaboliques pertinents impliqués dans les variations génétiques de caractères d'intérêts du canard mulard gavé valide en partie notre approche de recherche de QTL et pQTL pléiotropiques.

Les foies gras de ces mêmes canards ayant été caractérisés par des analyses du transcriptome et du métabolome, une nouvelle intégration de toutes ces données « omics » permettra de confirmer ou infirmer les voies métaboliques décrites ci-dessus.

Figure 1. L'inférence graphique réalisée à partir des 21 couples de QTL liés et 16 QTL pléiotropiques permet d'obtenir 9 graphes soulignant des mécanismes métaboliques impliqués dans les variations génétiques de caractères d'intérêts



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bastian M., et al., 2009. Int. AAAI Conf. Weblogs Social Media. <https://gephi.org/publications/gephi-bastian-feb09.pdf>.
- Bourneuf, E., et al., 2006. Gene., 372, 162-170
- Consoli L., et al., 2002. Plant Mol. Biol., (48), 575.
- David I., et al., 2013. Heredity, (110), 232.
- François Y., et al., 2015. JRAFG
- Lagarrigue S., et al. 2000. Genet. Sel. Evol., (32), 205.
- Peterfy, M. 2012. Biochim Biophys Acta 1821, 790–794
- Rahman S.A., et al., 2015. J. Mol. Endocr., 54(2), 119.
- Resnyk C.W., et al. 2013. BMC Genomics, 14:557.
- Wang S.Z., et al., 2012. Genet. Mol. Res., 11(2), 956.



INTÉGRATION DE DONNÉES « OMIC » ET COMPRÉHENSION DES MÉCANISMES SOUS-JACENTS À LA PRODUCTION DE FOIE GRAS

Y. François, L. Liaubet, C. Molette, A. Vignal, N. Marty-Gasset, C. Marie-Etancelin

Les approches 'omics' couplées à des détectations de QTL impliquant plusieurs centaines de marqueurs conduisent à l'identification d'un grand nombre de zones du génome d'intérêts, et nous confrontent à la difficulté d'interpréter de telles masses de résultats.

A partir de données de protéome du foie gras, nous allons montrer comment - parmi tous les QTL protéomiques jugés co-localisés sur le génome avec des QTL de caractères zootechniques des canards- nous allons pouvoir distinguer ceux qui sont pléiotropiques de ceux qui sont modulés par 2 QTL proches et liés. Nous montrerons également comment schématiser l'ensemble de ces résultats pour leurs donner sens.

Méthodes mises en œuvre

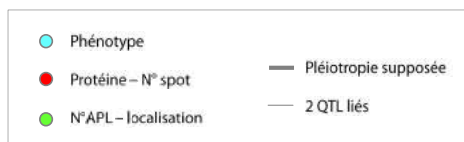
- Identification des QTL phénotypiques et protéomiques co-localisés (n=290)
- Détection de QTL bi-caractères phéno-protéome et identification des QTL significatifs (n=66)
- Test de la pléiotropie versus de la liaison à l'aide du ClipTest (David et al., 2013)

16 couples phéno-protéome supposés pléiotropiques &

21 couples phéno-protéome influencés par 2 QTL liés mais distincts

- Réalisation des graphes d'inférences représentant ces 37 couples "phéno-protéome" à l'aide du logiciel Gephi

Graphes d'inférences



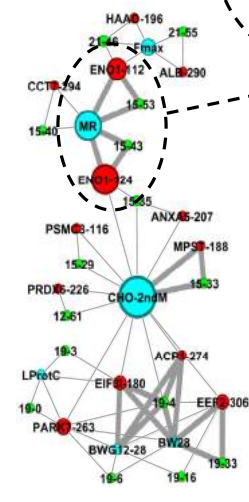
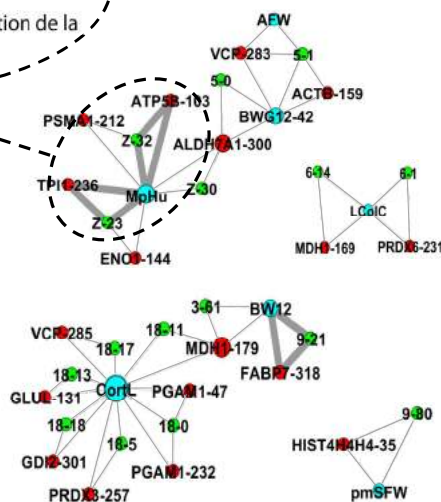
2 QTL pléiotropiques sur APLZ
entre le pH ultime du magret et
l'ATP synthétase et la triose-phosphate isomérase

2 locus disjoints impliqués dans la régulation de la
qualité du magret

QTL pléiotropique sur APL15
entre le taux de fonte et 2 spots d'apha-énolase

Locus impliqué dans la régulation de la glycolyse
Gène *LMF1* (Lipoprotein maturation factor 1)
potentiel gène candidat
(positionnement du locus chez le poule:)

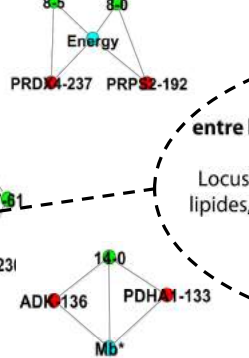
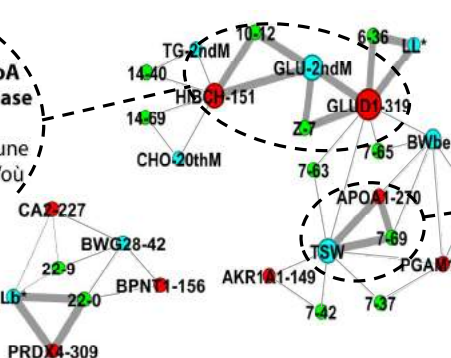
Phénotypes
AFW: poids de gras abdominal. BW12/BW28: poids vif à 12/28 jours. BWbeg: poids vif début gavage. BWG12-42/BWG28-42: gain moyen quotidien entre 12/28 et 42 jours. CHO 2^{ème}/20^{ème} M: taux de cholestérol sanguin au 2^{ème}/20^{ème} repas de gavage. CortL: niveau corticostérone avant stress. Energy: énergie nécessaire pour couper le magret. Fmax: force maximale de cisaillement du magret. GLU 2^{ème} M: taux de glucose sanguin au 2^{ème} repas de gavage. Lb*: indice de jaune du foie gras. LColC: Taux de collagène dans le foie. LL*: luminance du foie. LProtC: taux de protéine dans le foie. Mb*: indice de jaune dans le magret. Mphu: pH ultime du magret. MR: taux de fonte du foie. pmSFW: poids de la peau et du gras du magret. TG 2^{ème} M: taux de triglycérides sanguins au 2^{ème} repas de gavage. TSW: poids de la cuisse.



Protéines
ACPT: phosphotyrosine phosphatase. ACTB: beta-actin. ADK: adenosine kinase. AKR1A1: alcohol dehydrogenase. ALB: albumin. ALDH7A1: alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase. ANXAS: annexin 5. APOA1: apolipoprotein A1. ATP5B: ATP synthase. BPN1: bisphosphatase nucleotidase 1. CA2: carbonic anhydrase 2. CCT7: T-complex protein 1 subunit eta. EEF2: eukaryotic Elongation Factor 2. EIF3I: eukaryotic translation initiation factor 3. ENO1: alpha-enolase. FABP7: fatty acid binding protein 7. GDI2: rab GDP dissociation inhibitor beta. GLUD1: glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial. GLUL: glutamine synthetase. HIST4H4: histone H4. HAAO: 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase. HIBCH: 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial. MDH1: malate dehydrogenase. MPST: sulfuryltransferase. PARK7: protein deglycase D11. PDHA1: pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha. PGAM1: phosphoglycerate mutase 1. PRDX3/4/6: peroxiredoxin 3/4 ou 6. PRPS2: ribose-phosphate pyrophosphokinase. PSMAT1: proteasome subunit alpha 1. PSMC3: 26S protease regulatory subunit 6A. TPI1: triosephosphate isomérase. VCP: valosin containing protein.

2 QTL pléiotropiques
régulant le glucose sanguin
- APL10 avec l'hydrolase 3 hydroxy coA
- APLZ avec la glutamate déshydrogénase

La modification du gène *GLUD1* génère une
régulation de la production d'insuline d'où
une modification de l'absorption
du glucose par le foie



QTL pléiotropique sur APL7
entre le poids de la cuisse et l'apolipoprotéine A1

Locus impliqué dans le transport et le stockage des
lipides, d'où le lien entre l'engraissement sous-cutané
de la cuisse et APOA1.
Nombreux locus sur GGA7 impliqués
dans la variabilité du gras abdominal
chez le poulet.

- Premières identifications de voies métaboliques contribuant à la variation génétique d'un caractère.

- Aucun QTL pléiotropique en position « cis » c'est-à-dire dans la même zone génomique du gène codant la protéine.

- Complexité des modes de régulation : la variation génétique affecte probablement un gène qui modifie une voie métabolique impactant la protéine pour laquelle le pQTL a été trouvé.

IMPACT DES PRINCIPALES FUSARIOTOXINES EN MONO ET MULTI-CONTAMINATION SUR LES PERFORMANCES, LA SANTE ET LA QUALITE DES PRODUITS CHEZ LE CANARD AU COURS DU GAVAGE

Peillod Céline^a, Laborde Marie^a, Travel Angélique^a, Mika Amandine^a, Bailly Jean Denis^b, Cleva Didier^c, Boissieu Cyril^c, Le Guennec Jean^d, Albaric Olivier^e, Labrut Sophie^e, Froment Pascal^f, Lepivert Gurvan^g, Marengue Eric^g, Tardieu Didier^h, Guerre Philippe^h

^aITAVI, Centre INRA Val de Loire, 37380 NOUZILLY, France;

^bUniversité de Toulouse, INP, ENVT, UMR Toxalim, F-31076 TOULOUSE, France;

^cChêne Vert Conseil, Z Bellevue II – 35220 CHATEAUBOURG, France;

^dFinalab, 4 bis rue Th. Botrel, BP 351, 22603 LOUDÉAC Cedex, France;

^eONIRIS, Site de la Chantrerie, BP 40706, 44307 NANTES Cédex 3, France;

^fEquipe GCR INRA – PRC - UMR INRA - CNRS - UFR - 37380 NOUZILLY, France;

^gLABOCEA, 7 rue du Sabot, CS 30054, Zoopole, 22440 PLOUFRAGAN, France;

^hUniversité de Toulouse, INP, ENVT, UR Mycotoxicologie, F-31076 TOULOUSE, France.

travel@itavi.asso.fr

RÉSUMÉ

L'objectif était de comparer l'impact zootechnique et sanitaire du déoxynivalénol (DON), des fumonisines (FBs) et de la zéaralénone (ZEA) et d'évaluer leur niveau de persistance à l'état résiduel dans les produits comestibles, suite à une mono ou multi-contamination chez le canard lors d'une exposition chronique en phase de gavage. Les mycotoxines ont été obtenues par culture de souches fongiques toxigènes et incorporées dans des gélules distribuées aux canards, permettant de constituer les groupes suivants : lot DON (5 mg/kg), lot FBs (20 mg/kg), lot ZEA (0,5 mg/kg) et lot multi-contaminé (5 mg/kg DON + 20 mg/kg FBs + 0,5 mg/kg ZEA) ; les canards du lot témoin recevaient des gélules contenant de la farine exempte de mycotoxines. Ces gélules ont été administrées au cours des 21 repas (2 repas/jour), en milieu de gavage, à 80 canards (MMG x PKL) de 12 semaines répartis entre les 5 groupes. L'analyse des performances a révélé, sur le lot multi-contaminé, une diminution significative ($P < 0,05$) de la croissance sans diminution notable de la prise d'aliment. A J70, l'analyse de sang n'a révélé aucune différence significative entre lots sur la biochimie plasmatique de routine et différents marqueurs de stress oxydatif. Seule une élévation significative du rapport sphinganine/sphingosine, chez les animaux exposés aux FBs par rapport aux animaux non exposés, a été observée dans le plasma, sans différence entre canards mono- ou multi-exposés. La recherche de résidus a révélé des teneurs plus élevées en FB1 dans le foie que dans les muscles, et l'absence d'effet interactif de la multi-contamination sur la persistance de ce composé.

ABSTRACT - Impact of fusariotoxins in mono and multi-contamination on performance, health and product quality in duck

The aim of this study was to compare zootechnical and health impact of deoxynivalenol (DON), fumonisins (FBs) and zearalenone (ZEN) and to assess their residual persistence level in edible tissues, following a mono or multi-contamination of ducks during chronic exposure in the gavage phase. The mycotoxins were obtained by culturing toxinogenic fungal strains and incorporated in capsules distributed to ducks, to constitute the following groups: DON group (5 mg / kg), FBs group (20 mg / kg), ZEN group (0.5 mg / kg) and a multi-contaminated group (5 mg/kg DON + 20 mg/kg FBs + 0.5 mg/kg ZEN); Ducks of control group received capsules containing flour free of mycotoxins. These capsules were given during 21 meals (2 meals/day), during the maize distribution, to 80 ducks (MMG x PKL), 12 weeks aged, divided into 5 groups. Performance analysis revealed a significant ($P < 0.05$) decrease in growth in the multi-contaminated group without significant decrease in feed intake. At day 70, blood analysis showed no significant difference between groups on routine plasma biochemistry and various markers of oxidative stress, except an elevation of sphinganine/sphingosine ratio in plasma for animals exposed to FBs compared to unexposed, without difference between single or multi-contaminated groups. The search for residues revealed higher levels of FB1 in the liver than in the muscles, and no interactive effect of multi-contamination on the persistence of this contaminant.

INTRODUCTION

Bien que les volailles soient considérées comme plus résistantes aux mycotoxines que d'autres espèces animales, leur santé et/ou performances peuvent être altérées selon les modalités d'exposition. Les effets d'une mono-contamination de l'aliment par une mycotoxine à forte dose sont bien connus (Afssa, 2009). Cependant, en cas de contamination naturelle des matières premières, les multi contaminations à faible dose se révèlent fréquentes dans les aliments. Or, peu de travaux se sont intéressés aux conséquences sur les performances, la santé et le transfert de résidus, d'une ingestion chronique et simultanée de plusieurs mycotoxines sur les volailles, comme le rappelle Metayer et al. (2017).

C'est pourquoi, dans le cadre du projet CASDAR MYCOVOL nous avons caractérisé les modalités de transfert des trois fusariotoxines les plus répandues en France (DON, FBs et ZEA) vers les produits avicoles (poulet, dinde et canard).

Dans le présent article sont présentés les résultats spécifiques au canard, pour lequel nous avons comparé l'impact zootechnique et sanitaire du DON, FBs et ZEA consommés individuellement ou en association, aux teneurs maximales recommandées pour les volailles. Leurs niveaux de persistance dans les produits destinés au consommateur humain ont été caractérisés. Cette étude apporte des éléments de réponse aux questions suivantes : Le transfert est-il comparable lors d'une mono ou multi contamination ? Selon la matrice considérée ? Existe-t-il des marqueurs biologiques spécifiques pour évaluer l'exposition des dindes aux fusariotoxines ?

Les résultats des travaux réalisés chez le poulet et chez la dinde sont présentés respectivement par Metayer et al. (2017) et Travel et al. (2017).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Exposition des canards à gaver

Les mycotoxines nécessaires à l'expérimentation ont été obtenues par culture de souches fongiques toxigènes dans des conditions préalablement identifiées comme optimales pour la synthèse (Duverger et al., 2011). Les FBs ont été produites par culture sur maïs concassé (aw : 0,99) pendant 4 semaines à 25°C de *Fusarium verticillioides* (souche L12). Le DON et la ZEA ont été produits par culture pendant 4 semaines avec les souches de *F. graminearum* I159 et I171 respectivement sur blé à 23°C et riz à 21°C. Le matériel de culture produit a été séché à 90°C pendant 3h, broyé et tamisé (maille 0,6 mm) et incorporé après dosage par technique LC-MS/MS dans des gélules spécifiques pour le lot DON (5mg/kg), le lot FBs (20 mg FB1+FB2/kg), le lot ZEA (0,5 mg/kg) et le lot multi-contaminé (DON, FBs et ZEA respectivement à 5, 20 et 0,5 mg/kg).

Quatre-vingt canards (MMG x PKL) de 12 semaines ont été sélectionnés sur leur poids à partir d'un effectif de 250 canards élevés selon les pratiques habituelles. Les animaux ont été répartis en 5 lots expérimentaux. Du maïs de gavage, exempt de mycotoxines, a été distribué aux animaux, selon la pratique habituelle sur 21 ou 22 repas, avec 2 repas/jour.

Pour les canards, les quantités de mycotoxines distribuées ont été calculées pour chaque repas, en tenant compte de la quantité d'aliment administrée lors du gavage telle que prévue dans le plan d'alimentation. L'objectif était de réaliser 5 niveaux d'exposition correspondant à: un lot témoin, un lot équivalent 5mg DON/kg aliment, un lot équivalent 20 mg FBs/kg aliment, un lot équivalent 0,5 mg ZEA/kg aliment et un lot multi-contaminé (équivalent respectifs de DON, FBs et ZEA de 5, 20 et 0,5 mg/kg aliment). L'exposition a été réalisée via l'administration aux animaux, des gélules en milieu de repas. Le poids de chacune a été maintenu constant en complétant si nécessaire avec de la farine blanche. Les lots exposés aux fumonisines et à la zéaralénone ont reçu 1 gélule par repas, celui exposé au déoxynivalénol, 2 gélules par repas et enfin, le lot exposé aux 3 toxines a reçu 4 gélules par repas. Les animaux témoins ont reçu 1 gélule par repas contenant de la farine blanche non contaminée.

1.2. Suivi, prélèvements et analyses

La croissance a été enregistrée en début et fin de phase de gavage, les repas sautés étaient notés.

A l'issue des 21 ou 22 repas, et après 8h de jeûne, des prélèvements de sang ont été effectués à la veine jugulaire sur tubes secs ou tubes héparinés, centrifugés 10 minutes à 3000g à 4°C en vue de la détermination des paramètres hématologiques, biochimiques et de marqueurs de stress oxydatif (Zbib et al., 2014). Les animaux ont été euthanasiés par élévation des cervicales puis exsanguination et autopsiés.

Les lésions macroscopiques ont été enregistrées selon une grille lésionnelle. Les principaux organes (cœur, foie, rate, thymus, pancréas, reins, amygdales caecales, bourses de Fabricius et testicules) ont été pesés et les organes du tractus digestif (gésier, proventricule, duodénum, jéjunum, iléon et caeca) ont été vidés puis pesés. La longueur des segments digestifs a été mesurée. Les lésions microscopiques du foie, des reins, des amygdales caecales, des caeca, de la rate et de la bourse de Fabricius ont été recherchées par histologie classique. Une caractérisation de la morphométrie intestinale (duodénum, jéjunum et iléon) avec dénombrement des cellules à mucus a été effectuée. Le muscle pectoral droit (moitié) et foie (1/4) ont été homogénéisés puis congelés à -20°C pour dosage des concentrations en sphinganine (Sa) et sphingosine (So) et de la recherche de résidus.

Le dosage de Sa et So a été effectué par HPLC-Fluo (Tran et al., 2006). La recherche de DON, FBs et ZEA a été effectuée par technique LC-MS/MS et les métabolites de la ZEA ont été quantifiés par HPLC-Fluo (Kolf-Clauw et al., 2007). Plus de 1600 échantillons ont ainsi été générés pour analyses.

2. RESULTATS

2.1. Performances zootechniques

En fin de période de gavage, les résultats montrent que l'ingestion de DON, FBs ou ZEA seules, aux teneurs que nous avons définies et dans nos conditions d'élevage, n'ont pas significativement affecté les performances de croissance, ni l'efficacité alimentaire des canards. En revanche, une diminution significative ($P < 0,05$) a été observée sur la croissance et le gain de poids dans le lot multi-contaminé sans effet significatif sur la consommation d'aliment. Ce qui s'est traduit par une diminution significative de l'efficacité alimentaire dans ce lot (Figure 1).

2.2. Autopsie et analyse histologique

Des différences significatives ($P < 0,05$) entre lots ont été observées sur le poids du duodénum et des reins, et la longueur du jéjunum, principalement impacté dans le lot multi contaminé (Figure 2). Aucune différence significative n'a été observée sur le poids relatif (% du poids vif) du pancréas, rate, cœur, proventricule, gésier, jéjunum, iléum et *caecum* des canards, lors des mono ou multi contaminations. Les observations des lésions macroscopiques réalisées par les vétérinaires au moment de l'autopsie ou microscopiques observées par histologie, n'ont révélé aucune lésion spécifique chez les lots mono-contaminés (DON, FBs ou ZEA). La multi-contamination n'a pas provoqué de lésions macro ou microscopiques en comparaison des résultats obtenus dans le lot témoin et les lots mono contaminés.

2.3. Biochimie plasmatique, hématologie, marqueurs hépatiques

L'ingestion individuelle de DON, FBs ou ZEA par les canards, n'a induit aucune différence significative ($P > 0,05$) concernant les marqueurs biochimiques sanguins (protéines totales, cholestérol, activité des phosphatases alcalines totales (PAL) et de l'alanine aminotransférase (ALAT), lactate déshydrogénase (LDH)) ni des marqueurs plasmatiques et hépatiques de stress oxydatif (malondialdéhyde (MDA), activité de la catalase (CAT), de la superoxyde dismutase (SOD) de la glutathion réductase et de la glutathion peroxydase et quantité de glutathion total et réduit). Nos résultats ont montré, chez le canard, que l'ingestion simultanée des 3 fusariotoxines n'a pas modifié la réponse de ces marqueurs comparativement au lot témoin et aux lots mono contaminés.

L'étude des marqueurs hématologiques n'a pas révélé de différence significative entre les 5 lots concernant les érythrocytes, leucocytes, hétérocytes, éosinophiles, basophiles, lymphocytes, monocytes et l'hémoglobine.

Le niveau de sphingosine (So) hépatique des canards était équivalent entre lots alors qu'une élévation significative de la sphinganine (Sa) a induit une élévation significative du rapport Sa/So pour les canards exposés aux FBs et multicontaminés, sans différence significative entre ces deux lots (Figure 3).

2.4. Teneurs résiduelles en fusariotoxines dans les tissus

Les teneurs en DON dans le foie et le muscle se sont révélées inférieures à la limite de détection (LD = 0,2 µg/kg) quel que soit le groupe considéré.

Les teneurs en FBs dans les foies et muscles d'animaux non exposés aux FBs étaient inférieures à la limite de détection (LD FB1 = 3 µg/kg) alors que des teneurs quantifiables étaient retrouvées dans les lots FBs et multicontaminés sans différence significative entre ces deux lots (Tableau 1).

Seuls 4 échantillons de foie sur 14 issus du lot ZEA contenaient des teneurs détectables en alpha-zéaralénol libre (LD α -ZEA = 0,1 µg/kg). Il n'a pas été possible d'analyser les teneurs de ces toxines dans les foies par HPLC-Fluo en raison d'interférences matricielles au cours du processus d'extraction.

3. DISCUSSION ET CONCLUSION

Cet essai a révélé l'absence d'effet individuel du DON, des FBs et de la ZEA sur les performances et la santé des canards en gavage aux doses respectives de 5, 20 et 0,5 mg/kg d'aliment. Ces résultats diffèrent de ceux précédemment observés dans la littérature (Bailly et al., 2015 ; Magnin et al., 2015) pour cette espèce lors d'exposition aux fumonisines (baisse de performances régulièrement observées) mais sont néanmoins en accord avec les recommandations européennes. Les différences de toxicité observées chez le canard lors d'exposition aux fumonisines pourraient éventuellement être attribuées au mode d'exposition des animaux (gélules). Ce travail a montré peu (indice de consommation) ou pas d'effet additif, synergique et antagoniste sur les performances et la santé des canards en gavage aux valeurs limites réglementaires pour le DON, les FBs et la ZEA, dans nos conditions standardisées d'élevage et d'exposition.

L'effet observé sur le métabolisme des sphingolipides dans les lots ingérant des FBs est en accord avec les données de Tardieu et al. (2004) chez le canard et ceux obtenus par notre équipe pour le poulet et la dinde (Métayer et al., 2017 ; Travel et al., 2017). Ces résultats confirment la possible utilisation du rapport Sa/So en tant que biomarqueur spécifique et précoce d'exposition des volailles aux FBs, son élévation

précédant l'apparition de signes toxiques dans toutes les espèces où il a été évalué (Shephard et al., 2007). La multi-contamination n'a pas modifié le rapport Sa/So, comparativement aux lots mono contaminés par des FBs.

L'absence de résidus de DON dans les foies et les muscles est en accord avec les données de la bibliographie, cette toxine étant principalement sulfo-conjuguée dans les espèces aviaires (Guerre, 2015). Les teneurs en FBs observées dans les foies sont cohérentes avec des données antérieures au même niveau d'exposition (Tardieu et al., 2009). Les muscles se révèlent moins contaminés que les foies, ce qui va dans le sens des différents travaux réalisés à des niveaux supérieurs d'exposition (Guerre, 2015).

Bien que des interférences au cours de l'extraction de la ZEA et de ses métabolites aient été observées lors de l'analyse par HPLC-Fluo, les très faibles teneurs des formes libres retrouvées lors de l'analyse par LC-

MS/MS suggèrent que cette toxine n'est que très faiblement présente dans les foies de canards gras.

Cette étude révèle pour la première fois, chez le canard, que la multi contamination n'a pas eu d'impact sur les teneurs résiduelles en FBs dans les muscles et les foies, ni sur la hiérarchie de contamination des matrices, comparativement à une mono exposition avec 20 mg FBs/kg.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été conduit dans le cadre de l'UMT BIRD associant l'ITAVI et l'INRA sur des projets de recherche appliquée. Les partenaires du projet tiennent à remercier le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (CASDAR AAP 2012) pour son concours financier au projet MYCOVOL, ainsi que le RMT Quasaprove qui a apporté son soutien lors de la genèse et de la réalisation du projet.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Afssa, 2009. Rapport RCCP-Ra-Mycotoxines. pp308
 Bailly JD., Magnin M., Travel A., Guerre P., 2015. In: Actes des 11èmes JRA- JRFG, 25-26/03/2015, 462-475.
 Duverger F., Bailly S., Querin A., Pinson-Gadais L., Guerre P. Et Bailly J.D., 2011. Rev. Méde. Vét., 162(2), 93-97.
 Guerre P., 2015. Toxins, 7(6), 2289-2305.
 Kolf-Clauw M., Ayouni F., Tardieu D., Guerre P., 2007. Rev. Méd. Vét., 158(10), 504-508.
 Magnin, M., Travel, A., Bailly, J. D., Guerre, P. 2015. In: Actes des 11èmes JRA- JRFG, 25-26/03/2015, 476-502.
 Metayer J.P., Travel A., Mika A., Bailly J.D., Cleva D., Boissieu C., Le Guennec J., Froment P., Albaric O., Labrut S., Le Bourhis C., Lepivert G., Marengue E., Tardieu D., Guerre P., 2017. In: Actes des 12èmes JRA- JRFG, 5-6/04/2017, in press.
 Shephard G.S., Westhuizen L., Sewram V., 2007. Food Addit. Contam., 24, 1196-1201.
 Tardieu D, Bailly JD, Benard G, Tran TS, Guerre P., 2004. Poult. Sc., 83(8), 1287-1293.
 Tardieu D., Bailly JD., Benlashehr I., Auby A., Jouglar JY., Guerre P., 2009. Chem Biol Interact. 182(2-3):239-44.
 Tran S.T., Tardieu D., Auvergne A., Bailly J.D., Babilé R., Durand S., Benard G., Guerre P., 2006. Chem Biol Interact., 160(1), 41-50.
 Travel A., Metayer J.P., Mika A., Bailly J.D., Cleva D., Boissieu C., Le Guennec J., Albaric O., Labrut S., Le Bourhis C., Lepivert G., Marengue E., Tardieu D., Guerre P., . In: Actes des 12èmes JRA- JRFG, 5-6/04/2017, in press.
 Zbib N., Repussard, C., Tardieu D., Priymenko N., Domange C., Guerre P., 2014. Journ. Anim. Sc., 2014, 92 (11) : 5112 - 5123.

Figure 1. Données de gain de poids (g), de consommation d'aliment (g) et d'efficacité alimentaire des canards au cours du gavage et en fonction des mycotoxines reçues

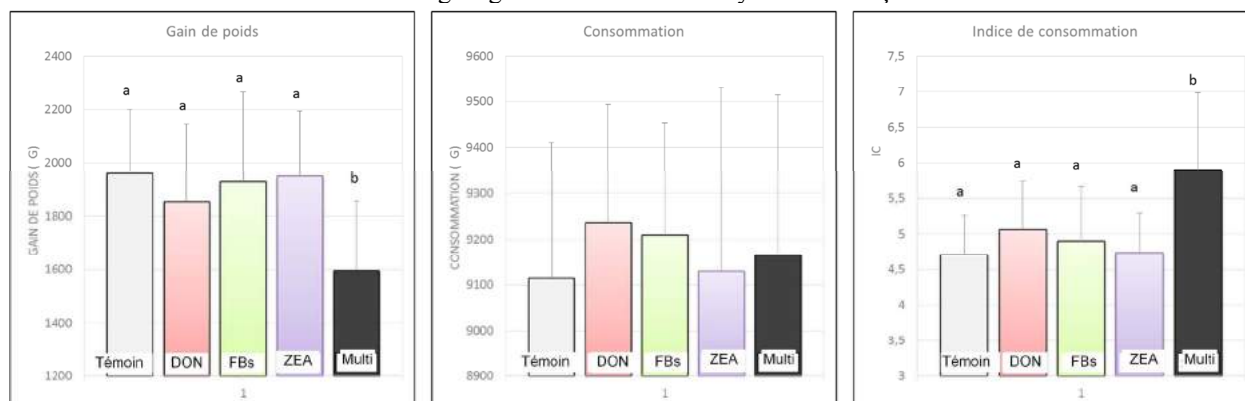


Figure 2. Longueur du jéjunum (cm), poids du duodénum (g) et des reins (g) prélevés sur les canards en fonction des mycotoxines reçues

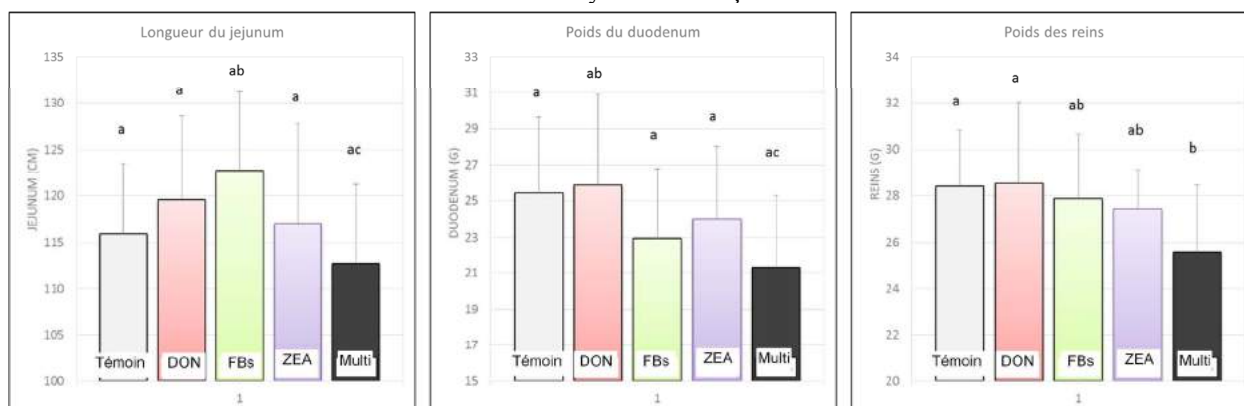


Figure 3. Concentration en sphinganine (mM), en sphingosine (mM) et ratio sphinganine/ sphingosine calculé à partir des prélèvements hépatiques des canards en fonction des mycotoxines reçues

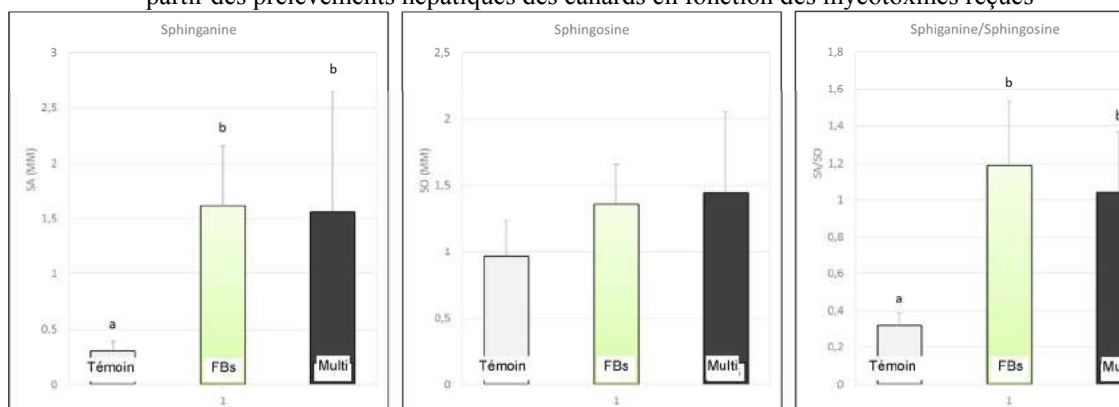


Tableau 1. Teneurs résiduelles en fumonisines (moyennes +/- écart-type, en µg FB1/kg) dans le foie et le muscle de canards exposés en phase de gavage pendant 11j soit 22 repas.

Aliment/Matrice	Témoins	FBs	Multi-contaminé
Foie	<1	10,2 +/- 2,1	11,4 +/- 3
Muscle	2,1+/-0,9	2,1 +/- 1,1	2 +/- 1

Impact des principales fusariotoxines en mono et multi-contamination sur les performances, la santé et la qualité des produits chez le canard au cours du gavage

Contexte

Mycotoxines = métabolites fongiques toxiques
Fréquence Fusariotoxine ++ : DON, FBs et ZEA
Aliments Volaille= Contamination possible
Effets mono exposition bien caractérisés mais QUID des effets Σ Don+FBs+ZEA ??

Objectif de l'étude

Comparer l'**impact zootechnique et sanitaire** des fusariotoxines, aux teneurs maximales réglementées/recommandées, en **contamination unique et en mélange** chez le canard au cours du gavage et d'évaluer leur **niveau de persistance** dans les produits destinés à la consommation

Matériel et méthode

Les mycotoxines

- DON, FBs, ZEA
- Partiellement purifiées
- Limites réglementaires
 - 5 ppm DON
 - 20 ppm FBs
 - 0,5 ppm ZEA

Production de toxines



N=16 canards x 5 lots

EXPOSITION

- mono et multi mycot
- 5 tt : T-/Don/FBs/Zea/Multi (gélules)
- Exposition en gavage (21 ou 22 repas)
- Jeûne (8h) avant abattage

Résidus



Suivi performances et Recherche de biomarqueurs

macro et micro lésions, histo, biochimie sg, stress ox, Sa/So, fertilité

Résultats

Données Zootechniques

DON = FBs = ZEA = Témoin > Multi
Pour la croissance et l'efficacité alimentaire

Autopsies et analyses histologiques

DON = FBs = ZEA = Témoin = Multi
Pour le poids des organes et pour les lésions macros et microscopiques, quel que soit l'organe
Mais poids des reins Multi < Témoin = DON

Biochimie plasmatique, hématologie, marqueurs hépatiques

DON = FBs = ZEA = Témoin = Multi
Pour les marqueurs biochimiques sanguins (prot. tot, chol., ac. urique, PAL, ALAT, LDH), les marqueurs plasmatiques et hépatiques de stress oxydatif (MDA, act. CAT, SOD, GPX) et les marqueurs hématologiques (erythrocyt., hémoglob., leucoc., hétéroc., éosinoph., basoph., lymphoc.)

FBs=Multi> Témoin pour Sa/So

Sa/So=Biomarqueur spécifique et précoce d'exposition des volailles aux FBs et Pas d'effet de la multi-contamination

Teneurs résiduelles en DON

DON Foie / Muscle et Multi Foie / Muscle < LD
Quid des sulfoconjugués (non recherchés)

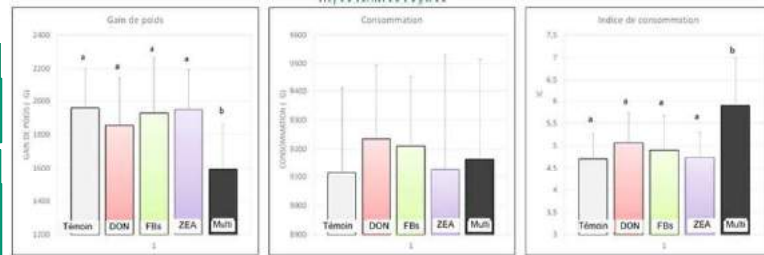
Teneurs résiduelles en FBs

FBs Muscle et Multi Muscle < LD
FBs Foie= Multi Foie > FBs Muscle= Multi Muscle

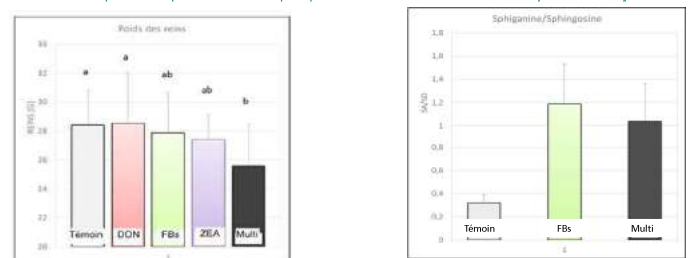
Teneurs résiduelles en ZEA

Seuls 4/14 échantillons de foies du lot ZEA contenaient des teneurs détectables en α-zéaralénol libre => Dosage par HPLC-Fluo impossible en raison d'interférences matricielles au cours du processus d'extraction.

Données de gain de poids, de consommation d'aliment et d'efficacité alimentaire des canards en fonction des mycotoxines reçues



Poids du duodénum et des reins prélevés et ratio sphinganine / sphingosine calculé à partir des prélèvements hépatiques des canards en fonction des mycotoxines reçues



Teneurs résiduelles en fumonisinés dans le foie et le muscle de canards exposés en phase de gavage (11j soit 22 repas)

Aliment/Matrice	Témoin	FBs	Multi-contaminé
Foie (µgFB1/kg)	<1	10,2 +/- 2,1	11,4 +/- 3
Muscle (µgFB1/kg)	2,1+/-0,9	2,1 +/- 1,1	2 +/- 1

Conclusions

Cette étude révèle pour la première fois chez le canard en gavage l'absence d'interaction entre DON, FBs et ZEA sur l'ensemble des paramètres étudiés, y compris la persistance à l'état résiduel de ces toxines et de leurs métabolites dans les foies et muscles.



LABORDE Marie^a,
TRAVEL Angélique^a,
MIKA Amandine^a,
BAILLY Jean Denis^b,
CLEVA Didier^c,
BOISSIEU Cyril^c,
LE GUENNEC Jean^d,
ALBARIC Olivier^e,
LABRUT Sophie^e,
FROMENT Pascal^f,
LEPIVERT Gurvan^g,
MARENGUE Eric^g,
TARDIEU Didier^b,
GUERRE Philippe^b

^aITAVI PARIS

^bUniv. de Toulouse, INP, ENVT, TOULOUSE

^cChêne Vert Conseil, CHATEAUBOURG,

^dFinalab, LOUDÉAC,

^eONIRIS, NANTES,

^fINRA NOUZILLY,

^gLABOCEA, PLOUFRAGAN

Financiers



Etude co-financée par le CASDAR (projet 1177)

Partenaires



IMPACT DES PRINCIPALES FUSARIOTOXINES EN MONO ET MULTI-CONTAMINATION SUR LES PERFORMANCES, LA SANTE ET LA QUALITE DES PRODUITS CHEZ LA DINDE DE CHAIR

Travel Angélique^a, Metayer Jean Paul^b, Mika Amandine^a, Bailly Jean Denis^c, Cleva Didier^d, Boissieu Cyril^d, Le Guennec Jean^e, Albaric Olivier^f, Labrut Sophie^f, Le Bourhis Céleste^g, Lepivert Gurvan^h, Marengue Eric^h, Tardieu Didierⁱ, Guerre Philippeⁱ

^aITAVI, Centre INRA Val de Loire, 37380 NOUZILLY, France;

^bARVALIS-Institut du Végétal, Station expérimentale, 91720 BOIGNEVILLE, France

^cUniversité de Toulouse, INP, ENVT, UMR Toxalim, F-31076 TOULOUSE, France;

^dChêne Vert Conseil, Z Bellevue II – 35220 CHATEAUBOURG, France;

^eFinalab, 4 bis rue Th. Botrel, BP 351, 22603 LOUDÉAC Cedex, France;

^fONIRIS, Site de la Chantrerie, BP 40706, 44307 NANTES Cédex 3, France;

^gPEAT, INRA Centre Val de Loire - 37380 NOUZILLY, France;

^hLABOCEA, 7 rue du Sabot, CS 30054, Zoopole, 22440 PLOUFRAGAN, France;

ⁱUniversité de Toulouse, INP, ENVT, UR Mycotoxicologie, F-31076 TOULOUSE, France.

travel@itavi.asso.fr

RÉSUMÉ

L'objectif était de comparer l'impact zootechnique et sanitaire du déoxynivalénol (DON), des fumonisines (FBs) et de la zéaralénone (ZEA) et d'évaluer leur niveau de persistance à l'état résiduel dans les produits comestibles, suite à une mono ou multi-contamination chez la dinde de chair lors d'une exposition chronique (J56-J70). Les mycotoxines ont été obtenues par culture de souches fongiques toxigènes et incorporées aux aliments expérimentaux pour obtenir un lot DON (5 mg/kg), un lot FBs (20 mg/kg), un lot ZEA (0,5 mg/kg) et un lot multi-contaminé (5 mg/kg DON + 20 mg/kg FBs+ 0,5 mg/kg ZEA) ; l'aliment du lot témoin ne contenait pas de mycotoxines. Ces aliments ont été individuellement distribués à 70 animaux répartis entre les 5 lots. L'exposition aux mycotoxines n'a pas significativement altéré les performances zootechniques des dindes. A J70, l'analyse de sang n'a révélé aucune différence significative entre lots sur la biochimie plasmatique de routine et différents marqueurs de stress oxydatif. Seule une élévation significative du rapport sphinganine/sphingosine chez les animaux exposés aux FBs par rapport aux animaux non exposés a été observée dans le plasma et le foie, sans différence entre dindes recevant l'aliment mono- ou multi-contaminé. La recherche de résidus a révélé des teneurs plus élevées en FB1 et ZEA (formes libres et conjuguées) dans le foie que dans les muscles, et l'absence d'effet interactif de la multi-contamination sur la persistance de ces composés.

ABSTRACT - Impact of fusariotoxins in mono and multi-contamination on performance, health and product quality in turkey

The aim of this study was to compare zootechnical and health impact, and residues in edible tissues of deoxynivalenol (DON), fumonisins (FBs) and zearalenone (ZEN) in single and multi-contamination in turkey for a chronic exposure (56 to 70 days of age). The mycotoxins were obtained by culturing toxigenic fungal strains and incorporated into the experimental feeds to obtain a DON diet (5 mg / kg), a FBs diet (20 mg / kg), ZEN diet (0.5 mg / kg) and a multi-contaminated diet (5 mg/kg DON + 20 mg/kg FBs+ 0,5 mg/kg ZEN), whereas the control diet did not contain mycotoxins. These feeds were individually distributed to 70 animals affected to the 5 groups. Exposure to mycotoxins did not significantly impact the zootechnical performance of turkeys. At day 70, blood analysis revealed no significant difference among groups on routine plasma biochemistry and various markers of oxidative stress, except an elevation of sphinganine/sphingosine ratio (plasma and liver) for animals exposed to FBs compared to unexposed, without difference between single or multi-contaminated groups. The search for residues revealed higher levels of FB1 and ZEN (free and conjugated forms) in the liver than in the muscles, and no interactive effect of multi-contamination on the persistence of these contaminants.

INTRODUCTION

Bien que les volailles soient considérées comme plus résistantes aux mycotoxines que d'autres espèces animales, leur santé et/ou performances peuvent être altérées selon les modalités d'exposition. Les effets d'une mono-contamination de l'aliment par une mycotoxine à forte dose sont bien connus (Afssa, 2009). Cependant, en cas de contamination naturelle des matières premières, les multi contaminations à faible dose se révèlent fréquentes dans les aliments. Or, peu de travaux se sont intéressés aux conséquences sur les performances, la santé et le transfert de résidus, d'une ingestion chronique et simultanée de plusieurs mycotoxines sur les volailles, comme le rappelle Metayer et al. (2017).

C'est pourquoi, dans le cadre du projet CASDAR MYCOVOL nous avons caractérisé les modalités de transfert des trois fusariotoxines les plus répandues en France (DON, FBs et ZEA) vers les produits avicoles (poulet, dinde et canard). Dans le présent article sont présentés les résultats spécifiques à la dinde de chair, pour laquelle nous avons comparé l'impact zootechnique et sanitaire du DON, des FBs et de la ZEA consommés individuellement ou en association, aux teneurs maximales recommandées pour les volailles. Leurs niveaux de persistance dans les produits destinés au consommateur humain ont été caractérisés. Cette étude apporte des éléments de réponse aux questions suivantes : Le transfert est-il comparable lors d'une mono- ou multi-contamination ? Selon le tissu considéré ? Existe-t-il des marqueurs biologiques spécifiques pour évaluer l'exposition des dindes aux fusariotoxines ?

Les résultats des travaux réalisés chez le poulet et chez le canard sont présentés respectivement par Metayer et al. (2017) et Peillod et al. (2017).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Exposition des dindes de chair

Les mycotoxines nécessaires à l'expérimentation ont été obtenues par culture de souches fongiques toxigènes dans des conditions préalablement identifiées comme optimales pour la synthèse (Duverger et al., 2011). Les FBs ont été produites par culture sur maïs concassé (aw : 0,99) pendant 4 semaines à 25°C de *Fusarium verticilloides* (souche L12). Le DON et la ZEA ont été respectivement produits par culture pendant 4 semaines avec les souches de *F. graminearum* I159 et I171 sur blé à 23°C et riz à 21°C. Le matériel de culture produit a été séché à 90°C pendant 3h, broyé et tamisé (maille 0,6 mm) et incorporé après dosage par technique LC-MS/MS à 5 aliments expérimentaux (base maïs – soja) pour obtenir un lot témoin, un lot DON (5 mg/kg), un lot FBs (20 mg /kg du total

FB1+FB2), un lot ZEA (0,5 mg/kg) et un lot multi-contaminé (DON, FBs et ZEA respectivement à 5, 20 et 0,5 mg/kg).

Soixante-dix dindes de chair (Grade Maker mâles) ont été élevées en cages individuelles de 0 à 55 jours d'âge avec un aliment démarrage (J0-J27) puis un aliment croissance 1 (J28-J55) suivants les recommandations habituelles et indemnes de mycotoxines (< 80 µg de DON, < 20 µg de FBs, <50 µg de ZEA /kg). Puis, chacun des 4 aliments expérimentaux contenant les mycotoxines et l'aliment témoin (protéines = 21 % et EM = 3125 kcal/kg) a été distribué individuellement à 14 dindes de 56 à 70 jours d'âge.

1.2. Suivi, prélèvements et analyses

Les performances de croissance ont été enregistrées de J28 à J56 préalablement à l'exposition puis de J56 à J70 lors de l'exposition.

A J70, après 8h de jeûne, des prélèvements de sang ont été effectués à la veine jugulaire sur tubes secs ou héparinés, centrifugés 10 minutes à 3000g à 4°C en vue de la détermination des paramètres hématologiques, biochimiques et de marqueurs du stress oxydatif (Zbib et al., 2014). Les animaux ont été euthasés par élongation des cervicales puis exsanguination et autopsiés.

Les lésions macroscopiques ont été enregistrées selon une grille lésionnelle. Les principaux organes (cœur, foie, rate, thymus, pancréas, reins, amygdales caecales, bourses de Fabricius et testicules) ont été pesés et les organes du tractus digestif (gésier, proventricule, duodénum, jéjunum, iléon et *caeca*) ont été vidés puis pesés. La longueur des segments digestifs a été mesurée. Les lésions microscopiques du foie, des reins, des amygdales caecales, des caeca, de la rate et de la bourse de Fabricius ont été recherchées par histologie classique. Une caractérisation de la morphométrie intestinale (duodénum, jéjunum et iléon) avec dénombrement des cellules à mucus a été effectuée. Le muscle pectoral droit (moitié) et le foie (totalité) ont été homogénéisés puis congelés à -20°C pour dosage des concentrations en sphinganine (Sa) et sphingosine (So) et la recherche de résidus. Le dosage de Sa et So a été effectué par HPLC-Fluo (Tran et al., 2006). La recherche de DON, FBs et ZEA a été effectuée par technique LC-MS/MS et les métabolites de la ZEA ont été quantifiés par HPLC-Fluo (Kolf-Clauw et al., 2007). Plus de 1600 échantillons ont ainsi été générés pour les analyses.

2. RESULTATS

2.1. Performances zootechniques

A J70, aucune différence significative ($P > 0,05$) entre lots n'a été observée sur le poids vif, la consommation d'aliment (Figure 1), le gain moyen quotidien (GMQ) et l'indice de consommation (IC)

des dindes (données non présentées). Ces résultats indiquent que l'ingestion de 5 mg DON/kg, 20 mg FBs/kg ou 0,5 mg ZEA/kg, dans nos conditions d'élevage, n'ont pas significativement impacté les performances de croissance, ni l'efficacité alimentaire des dindes. De plus, les animaux ayant reçu, aux mêmes concentrations, l'association des trois fusariotoxines, ont montré des performances de croissance et efficacité alimentaire comparables aux dindes du lot Témoin et également des lots mono-contaminés.

2.2. Autopsie et analyse histologique

Aucun effet lésionnel des mycotoxines distribuées individuellement, n'a été mis en évidence au niveau macroscopique ou microscopique chez la dinde, quel que soit l'organe. Ces mono-expositions n'ont pas généré de différence significative ($P > 0,05$) sur le poids spécifique et le poids relatif (% du poids vif) des foies, pancréas, reins, rates, cœur, proventricule, duodénum, gésier, jéjunum, iléum et *caecum*, comparativement au lot témoin (Figure 2). La multi-contamination n'a pas provoqué de lésions macro ou microscopiques, ni modifié les poids des organes en comparaison des résultats obtenus dans le lot témoin et les lots mono contaminés.

2.3. Biochimie plasmatique, hématologie, marqueurs hépatiques

L'ingestion individuelle de DON, FBs ou ZEA par les dindes, n'a induit aucune différence significative ($P > 0,05$) concernant les marqueurs biochimiques sanguins (protéines totales, cholestérol, activité des phosphatases alcalines totales (PAL) et de l'alanine aminotransférase (ALAT), lactate déshydrogénase (LDH)) ni des marqueurs plasmatiques et hépatiques de stress oxydatif (malondialdéhyde (MDA), activité de la catalase (CAT), de la superoxyde dismutase (SOD), de la glutathion réductase et de la glutathion peroxydase et quantité de glutathion total et réduit). Nos résultats ont montré, chez la dinde, que l'ingestion simultanée de trois fusariotoxines n'a pas modifié la réponse de ces marqueurs comparativement au lot témoin et aux lots mono contaminés.

L'étude des marqueurs hématologiques n'a pas révélé de différence significative entre les 5 lots concernant les érythrocytes, hémoglobine, leucocytes, hétérocytes, éosinophiles, basophiles, lymphocytes, alors qu'une élévation significative de la concentration en monocytes ($P = 0,044$) a été observée chez les dindes exposées aux FBs en comparaison des dindes exposées au DON (Figure 3).

Le niveau de sphingosine (So) hépatique était équivalent entre lots alors qu'une élévation significative de la sphinganine (Sa) a induit une augmentation significative du rapport Sa/So pour les dindes exposées aux FBs et multi-contaminées,

sans différence significative entre ces deux lots (Figure 3).

2.4. Teneurs résiduelles en fusariotoxines dans les tissus

Les teneurs en DON dans le foie et le muscle se sont révélées inférieures à la limite de détection (LD = 0,2 µg/kg) quel que soit le groupe considéré.

Les teneurs en FBs dans les foies et muscles d'animaux non exposés aux FBs étaient inférieures à la LD (LD FB1 = 3 µg/kg) alors que des teneurs quantifiables ont été retrouvées dans les lots FBs et multicontaminés sans différence significative entre ces deux lots (Tableau 1).

Les teneurs en ZEA dans les foies et muscles d'animaux non exposés à la ZEA étaient inférieures à la LD (LD ZEA = 0,1 µg/kg) alors que des teneurs quantifiables en ZEA et alpha-zéaralénol (LD α -ZEA = 0,1 µg/kg), libres et conjugués, étaient retrouvées dans les foies mais pas dans les muscles des lots ZEA et multicontaminés sans différence significative entre ces deux lots (Tableau 2). Les teneurs en zéaralénols et β -zéaralénone étaient inférieures à la LD dans les foies et muscles.

3. DISCUSSION ET CONCLUSION

Cet essai a révélé l'absence d'effet individuel du DON, des FBs et de la ZEA sur les performances et la santé des dindes en croissance aux doses respectives de 5, 20 et 0,5 mg/kg d'aliment. Pour la dinde, ces résultats sont en accord avec les données bibliographiques disponibles pour cette espèce et confirment les maxima recommandés en Europe pour ces toxines dans l'alimentation des volailles (Bailly et al., 2015 ; Magnin et al., 2015). Ce travail a montré l'absence d'effet additif, synergique et antagoniste sur les performances et la santé des dindes en croissance aux valeurs limites réglementaires pour le DON, les FBs et la ZEA, dans nos conditions standardisées d'élevage et d'exposition.

L'effet observé sur le métabolisme des sphingolipides dans les lots ingérant des FBs est en accord avec les données de Grenier et al. (2015) pour le poulet et ceux obtenus par notre équipe pour le poulet et le canard (Métayer et al., 2017 ; Peillod et al., 2017). Ces résultats confirment la possible utilisation du rapport Sa/So en tant que biomarqueur spécifique et précoce d'exposition des volailles aux FBs, son élévation précédant l'apparition de signes toxiques dans toutes les espèces où il a été évalué (Métayer et al., 2017 ; Shephard et al., 2007). La multi-contamination n'a pas modifié le rapport Sa/So, comparativement aux lots mono contaminés par des FBs.

L'absence de résidus de DON dans les foies et les muscles de dindes est en accord avec les données de la bibliographie, cette toxine étant principalement

sulfo-conjuguée dans les espèces aviaires (Guerre, 2015). Les teneurs en FBs observées dans les foies sont cohérentes avec des données antérieures au même niveau d'exposition (Tardieu et al., 2008). Ces teneurs sont voisines de celles observées au même niveau d'exposition chez le poulet (Metayer et al., 2017 et Tardieu et al., 2008). Les muscles se révèlent moins contaminés que les foies, ce qui va dans le sens des différents travaux réalisés à des niveaux supérieurs d'exposition (Guerre, 2015).

L'analyse des teneurs résiduelles en ZEA et ses métabolites confirme que cette toxine est principalement réduite en α -ZEA, dont les propriétés xéno-oestrogéniques sont supérieures à celles de la ZEA. Comme dans notre étude sur le poulet (Metayer et al., 2017), ZEA et α -ZEA sont également retrouvés dans les tissus sous formes conjuguées, en accord avec les données de la littérature chez la volaille (Guerre, 2015, Kolf-Clauw et al., 2008). La signification toxicologique pour l'Homme et l'animal, de ces formes conjuguées est débattue. Chez l'animal, les métabolites conjugués sont généralement considérés comme peu toxiques, mais leur hydrolyse après ingestion conduit à la libération des formes libres (Guerre, 2015).

Cette étude révèle pour la première fois, chez la dinde, que la multi contamination n'a pas eu d'impact sur les teneurs résiduelles en FBs et ZEA dans les muscles et les foies, ni sur la hiérarchie de contamination des matrices, comparativement à une mono exposition avec 20 mg/kg de FBs ou 0,5 mg/kg de ZEA.

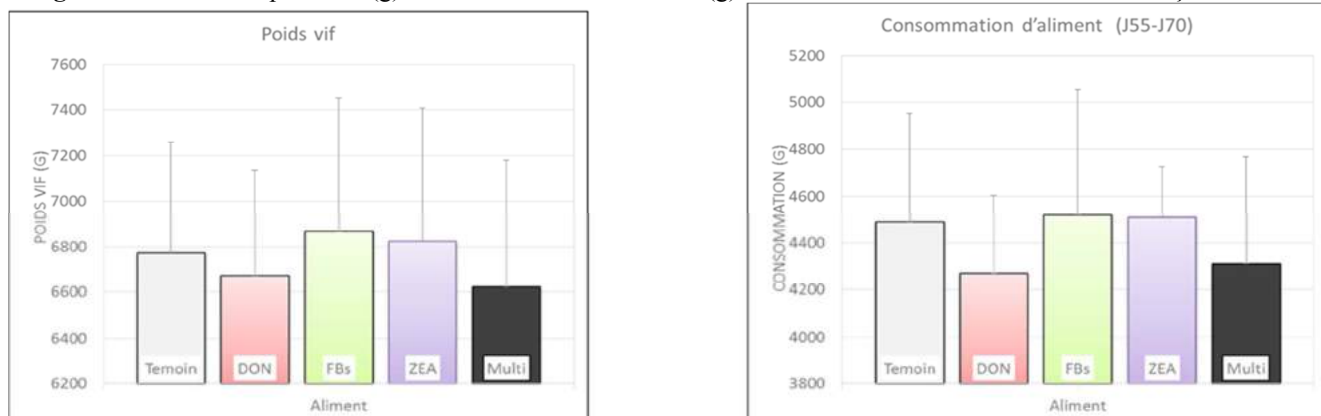
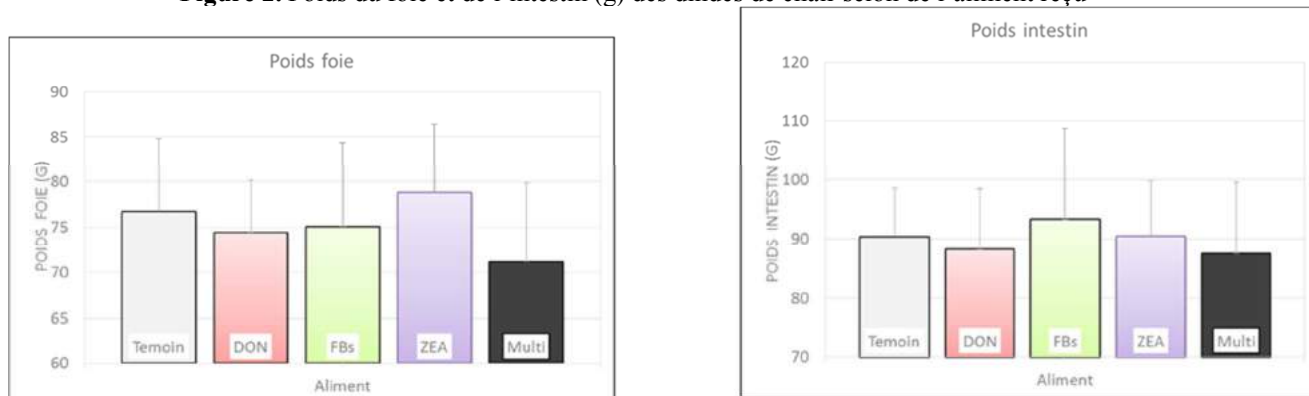
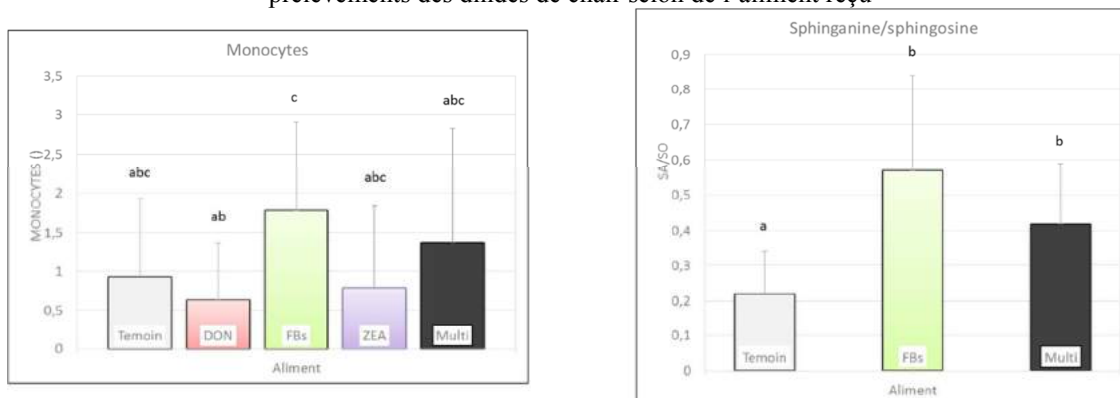
Ces résultats et ceux obtenus également sur le poulet (Metayer et al., 2017) et le canard (Peillod et al., 2017) suggèrent que ces mycotoxines agissent indépendamment et qu'il serait inutile de tester les nombreuses combinaisons possibles mycotoxine (FBs, ZEA) x doses pour en évaluer les effets.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été conduit dans le cadre de l'UMT BIRD associant l'ITAVI et l'INRA sur des projets de recherche appliquée. Les partenaires du projet tiennent à remercier le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (CASDAR AAP 2012) pour son concours financier au projet MYCOVOL, ainsi que le RMT Quasaprove qui a apporté son soutien lors de la genèse et de la réalisation du projet.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Afssa, 2009. Rapport RCCP-Ra-Mycotoxines. pp308
- Bailly JD., Magnin M., Travel A., Guerre P., 2015. In: Actes des 11èmes JRA- JRFG, 25-26/03/2015, 462-475.
- Duverger F., Bailly S., Querin A., Pinson-Gadais L., Guerre P. Et Bailly J.D., 2011. Rev. Méde. Vét., 162(2), 93-97.
- Grenier B., Schwartz-Zimmermann H.E., Caha S., Moll W.D., Schatzmayr G. et Applegate T.J., 2015. Toxins, 7(4), 1253-1272.
- Guerre P., 2015. Toxins, 7(6), 2289-2305.
- Kolf-Clauw M., Ayouni F., Tardieu D., Guerre P., 2007. Rev. Méd. Vét., 158(10), 504-508.
- Kolf-Clauw M., Ayouni F., Tardieu D., Guerre P., 2008. Food Chem. Tox., 46(5), 1467-1473.
- Magnin, M., Travel, A., Bailly, J. D., Guerre, P. 2015. In: Actes des 11èmes JRA- JRFG, 25-26/03/2015, 476-502.
- Metayer J.P., Travel A., Mika A., Bailly J.D., Cleva D., Boissieu C., Le Guennec J., Froment P., Albaric O., Labrut S., Le Bourhis C., Lepivert G., Marengue E., Tardieu D., Guerre P., 2017. In: Actes des 12èmes JRA- JRFG, 5-6/04/2017, in press.
- Peillod C., Laborde M., Travel A., Mika A., Bailly J.D., Cleva D., Boissieu C., Le Guennec J., Albaric O., Labrut S., Le Bourhis C., Lepivert G., Marengue E., Tardieu D., Guerre P., . In: Actes des 12èmes JRA- JRFG, 5-6/04/2017, in press.
- Shephard G.S., Westhuizen L., Sewram V., 2007. Food Addit. Contam., 24, 1196-1201.
- Tardieu D., Bailly JD., Skiba F., Grosjean F., Guerre P., 2008. Food Chem. Toxic., 46(9), 3213-3218.
- Tran S.T., Tardieu D., Auvergne A., Bailly J.D., Babilé R., Durand S., Benard G., Guerre P., 2006. Chem Biol Interact., 160(1), 41-50.
- Zbib N., Repussard, C., Tardieu D., Priymenko N., Domange C., Guerre P., 2014. Journ. Anim. Sc., 2014, 92 (11) : 5112 - 5123.

Figure 1. Données de poids vif (g) et consommation d'aliment (g) des dindes de chair selon de l'aliment reçu**Figure 2.** Poids du foie et de l'intestin (g) des dindes de chair selon de l'aliment reçu**Figure 3.** Monocytes plasmatiques (%) et ratio sphinganine / sphingosine hépatique calculés à partir des prélèvements des dindes de chair selon de l'aliment reçu**Tableau 1.** Teneurs résiduelles en fumonisines B1 (moyennes +/- écart-type, en µg FB1/kg) dans le foie et le muscle de dindes exposées 15 j de J56 à -J70.

Aliment/Matrice	Témoin	FBs	Multi-contaminé
Foie	<1	52,9 +/- 12,7	56,2 +/- 8,6
Muscle	<1	15,6 +/- 15,4	19,2 +/- 17,5

Tableau 2. Teneurs résiduelles en ZEA et alpha-zéaralénol (α-ZEA), libres et conjugués (moyennes +/- écart-type, en µg/kg) dans le foie de dindes exposées 15 j de J56 à J70.

Aliment/Foie	Témoin	ZEA	Multi-contaminé
ZEA libre	<0,2	0,21 +/- 0,21	0,22 +/- 0,24
α-ZEA libre	<0,2	0,53 +/- 0,46	0,8 +/- 0,93
ZEA conjugué	<0,2	0,98 +/- 0,57	1,34 +/- 1,32
α-ZEA conjugué	<0,2	1,70 +/- 0,91	1,35 +/- 1,04

TRAVEL Angélique^a

Impact des principales fusariotoxines en mono et multi-contamination sur les performances, la santé et la qualité des produits chez la dinde de chair

Contexte

Mycotoxines = métabolites fongiques toxiques

Fréquence Fusariotoxine ++ : DON, FBs et ZEA

Aliments Volaille= Contamination possible

Effets mono exposition bien caractérisés mais QUID des effets Σ Don+FBs+ZEA ??

Objectif de l'étude

Comparer l'**impact zootechnique et sanitaire** des fusariotoxines, aux teneurs maximales réglementées/recommandées, en **contamination unique et en mélange** chez la dinde de chair et d'évaluer leur **niveau de persistance** dans les produits destinés à la consommation

Matériel et méthode

Les mycotoxines

- DON, FBs, ZEA
- Partiellement purifiées
- Limites réglementaires
 - 5 ppm DON
 - 20 ppm FBs
 - 0,5 ppm ZEA

Production de toxines



Elev cage
N=14 dindons *5 traitmt

EXPOSITION

- mono et multi mycot
- 5 tt : T-/Don/FBs/Zea/Multi
- Exposition de J55 à J70
- Jeûne (8h) avant abattage

Résidus



Suivi performances et Recherche de biomarqueurs

macro et micro lésions, histo, biochimie sg, stress ox, Sa/So, fertilité

Résultats

Données Zootechniques

DON = FBs = ZEA = Témoin = Multi

Pour la croissance, la consommation d'aliment, le Gain Moyen Quotidien et l'efficacité alimentaire

Autopsies et analyses histologiques

DON = FBs = ZEA = Témoin = Multi

Pour le poids des organes et pour les lésions macros et microscopiques, quel que soit l'organe

Biochimie plasmatique, hématologie, marqueurs hépatiques

DON = FBs = ZEA = Témoin = Multi

Pour les marqueurs biochimiques sanguins (prot. tot, chol., ac.urique, PAL, ALAT, LDH), les marqueurs plasmatiques et hépatiques de stress oxydatif (MDA, act. CAT, SOD, GPX) et les les marqueurs hématologiques (erythrocyt., hémoglob., leucoc., hétéroc., éosinoph., basoph., lymphoc.)

⇒ DON≠FBs pour monocytes

FBs=Multi> Témoin pour Sa/So

Sa/So=Biomarqueur spécifique et précoce d'exposition des volailles aux FBs et Pas d'effet de la multi-contamination

Teneurs résiduelles en DON

DON Foie / Muscle et Multi Foie / Muscle < LD
Quid des sulfoconjugués (non recherchés)

Teneurs résiduelles en FBs

FBs Muscle et Multi Muscle < LD
FBs Foie= Multi Foie> FBs Muscle= Multi Muscle

Teneurs résiduelles en ZEA

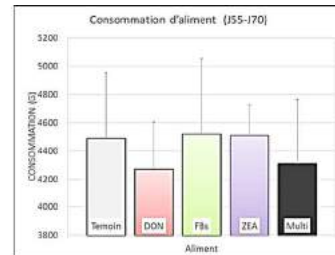
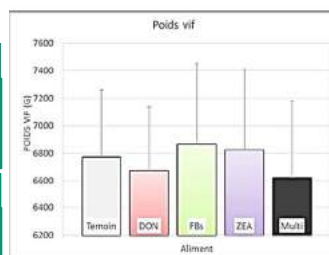
Zéaralénols, β-Zéa Foie / Muscle < LD

Zéa 1/c et α-Zéa 1/c Muscle < LD

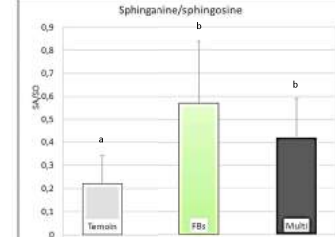
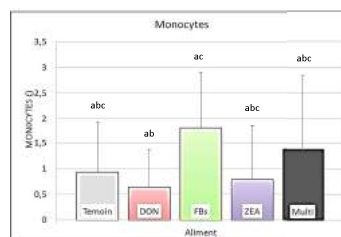
Zéa Foie = Multi Foie

Avec α-Zéa conj > Zéa conj > α-Zéa libre > Zéa libre

Données de poids vif (g) et consommation d'aliment (g) des dindes de chair en fonction de l'aliment reçu



Quantité de monocytes plasmatiques et ratio sphinganine / sphingosine hépatique calculés à partir des prélèvements des dindes de chair en fonction de l'aliment reçu



Teneurs résiduelles en fumonisines dans le foie et muscle de dindes exposées 15j (J56-J70)

Aliment/Matrice	Témoin	FBs	Multicontaminé
Foie (µgFB1/kg)	<1	52,9 +/- 12,7	56,2 +/- 8,6
Muscle (µgFB1/kg)	<1	15,6 +/- 15,4	19,2 +/- 17,5

Teneurs résiduelles en zéaralénone dans le foie de dindes exposées 15j (J56-J70)

Aliment/Foie	Témoin	ZEA	Multicontaminé
ZEA libre (µg/kg)	<0,2	0,21 +/- 0,21	0,22 +/- 0,24
α-ZEA libre (µg/kg)	<0,2	0,53 +/- 0,46	0,8 +/- 0,93
ZEA conjuguée (µg/kg)	<0,2	0,98 +/- 0,57	1,34 +/- 1,32
α-ZEA conjugué (µg/kg)	<0,2	1,70 +/- 0,91	1,35 +/- 1,04

Conclusions

La recherche de résidus a révélé des teneurs plus élevées en FBs et ZEA (formes libres et conjuguées) dans le foie que dans les muscles, et l'absence d'effet interactif de la multi-contamination sur la persistance de ces composés, tout comme sur les autres critères étudiés

METAYER Jean Paul^b,
MIKA Amandine^a,
BAILLY Jean Denis^c,
CLEVA Didier^d,
BOISSIEU Cyril^d,
LE GUENNEC Jean^e,
ALBARIC Olivier^f,
LABRUT Sophie^f,
LE BOURHIS Céleste^g,
LEPIVERT Gurvan^h,
MARENGUE Eric^h,
TARDIEU Didier^c,
GUERRE Philippe^c

Financiers



Etude co-financée par le CASDAR (projet 1177)

Partenaires



ESSAI DE CONSERVATION DE PROVENTRICULES DE POULET, SALES OU NON, INCISES OU NON, PAR SECHAGE SOUS VIDE PARTIEL

Benyahia-Krid Ferial Aziza¹, Aïssaoui-Zitoun Ouarda¹, Harkati Amani¹, Boughellout Halima¹, Adoui Faïza¹, Siar El-Hocine¹, Zikiou Abdellah² et Zidoune Mohammed Nasereddine¹

¹*Laboratoire de Recherche en Nutrition et Technologie Alimentaire (L.N.T.A.) :
Equipe : Transformation et Élaboration des produits Agro-alimentaires (TEPA).*

¹*Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA).
Université des frères Mentouri, Constantine 1, Route Ain El Bey, CONSTANTINE-25000,
Algérie.*

²*Centre de Biotechnologie, Division Biotechnologie Alimentaire,
CONSTANTINE, 25 000, Algérie
ferialaziza@yahoo.fr*

RÉSUMÉ

La présure ne couvre qu'approximativement 30% de la production fromagère à l'échelle mondiale car la disponibilité des caillottes de veaux de lait devient limitée (FAO, 2015). Ce manque a suscité la recherche de succédanés d'origines animale, végétale ou microbienne. Parmi les enzymes de remplacement d'origine animale, la pepsine de poulet. Des proventricules de poulet entiers ou incisés en quatre parties ou incisés en lamelles, sans ou avec salage préalable, et répartis en six différents lots d'étude, ont été séchés sous vide partiel (47°C, 800 mbar). Les effets de l'incision ou non des proventricules ainsi que l'adjonction ou non du sel, et de la durée de stockage des proventricules séchés, sur l'activité coagulante des extraits de pepsine (exprimés en équivalents Unités Présure), ont été étudiés. Les activités résiduelles de la pepsine extraite des six lots, déterminées juste après l'opération de séchage, et exprimant le rendement relatif à l'état frais, sont comprises entre 50 % pour les proventricules coupés en quatre et séchés sans l'ajout de sel et 18% relevées pour les proventricules coupés en lamelles avec ajout de sel. Après 54 jours de stockage, l'activité résiduelle était relativement distincte pour les proventricules coupés en quatre sans ajout de sel : 35,5% et pour les proventricules en lamelles avec ajout de sel de 4,7 %. Le sel semble avoir provoqué une grande perte en activité au cours du salage. De plus, l'effet de l'incision combiné au sel a montré une perte en activité remarquable. Durant la période de stockage l'activité coagulante résiduelle de la pepsine a montré une stabilité meilleure pour les proventricules de poulet séchés sous vide partiel, coupés en quatre et non salés

ABSTRACT

Chicken proventriculus conservation test, salted or not, incised or not, by partial vacuum drying

Ecrire le résumé anglais (environ 15 lignes) Remet cover only 30% of the world's cheese production because the availability of calf stomach becomes limited (FAO, 2015). This lack has suggested the search for animal, vegetable or microbial enzyme substitutes. Among the alternative animal enzymes, chicken pepsin. Chicken proventriculus, whole or incised into four parts or incised into slices, without or with salt addition distributed into six different lots, were dried under partial vacuum (47 ° C, 800 mbar). The effects of the incision or not, as well as the addition or not of salt, and storage time of dried proventriculus, on the coagulant activity of pepsin extracts (expressed in equivalents Rennet Units) were studied. The six lots pepsin residual activities determined immediately after drying operation expressed the relative yield in the fresh state before storage. They were between 50% for proventriculus cut into four parts without salt addition and 18% for proventriculus with salt a addition.

After 54 days of storage, the residual activity was relatively distinct for proventriculus cut into four parts without salt addition : 35.5% and for the proventriculus incised into slices with salt addition of 4.7%. Salt seemed to have caused a great loss of activity during salting. In addition, the incision effect combined to salt addition showed a remarkable loss of activity. During the storage period, the pepsin residual coagulant activity showed better stability of partially vacuum-dried proventriculus cut into four parts and unsalted.

INTRODUCTION

L'augmentation de la production et de la consommation du fromage dans le monde, d'une part, et l'impossibilité d'augmenter en parallèle la production de présure d'autre part,

ont causé une pénurie mondiale en approvisionnement en cet agent coagulant. Ces problèmes sont aggravés notamment dans les pays musulmans, pour des raisons religieuses, dues aux rituels de l'abattage.

L'Algérie ne fait pas l'exception. Selon l'Office National des Statistiques (ONS), en 2015, les fromageries algériennes ont importé approximativement 2,25 tonnes de présure et/ou ses succédanés, d'une valeur approximative de 200 000 dollars. Selon la même source, près de 50 000 tonnes de fromages ont été vendues sur le marché algérien, soit une consommation de l'ordre de 1,2 Kg/habitant/an en 2015 contre 0,7 en 2011. Devant cette situation, des recherches sur les succédanés de présure de différentes origines ont été envisagées.

La pepsine est l'une des protéases d'origine animale qui a fait l'objet d'expérimentation en vue d'une utilisation potentielle en industrie fromagère comme succédanés de la présure. En Israël, en 1974, plus que 50% de la production fromagère était préparées à partir de pepsine de poulet (Cuvellier, 1993).

La pepsine de poulet est connue dans le sud algérien depuis une époque lointaine et est utilisée dans la fabrication de fromage traditionnel connu sous le nom de « *Takammérit* »

En raison de l'insuffisance de la bibliographie en matière de documents relevant des modes de conservation des enzymes ; ce présent travail vise l'étude de la stabilité de la pepsine de poulet au cours du temps. Cette enzyme est extraite de proventricules considérés comme déchets non valorisés. Ces proventricules salés ou non, incisés ou non ont été séchés sous vide partiel puis la cinétique de l'activité coagulante résiduelle de la pepsine de poulet au cours de stockage a été suivie

1. METHODOLOGIE

1.1 Substrat de BERRIDGE

Le substrat de Berridge est obtenu par reconstitution d'une poudre de lait écrémé moyen chauffage (SOLAREC S.A , Hollande), à 12 % (m/v) dans une solution de CaCl_2 (0,01M). Pour éviter le développement microbien, 0,04% (m/v) d'azide de sodium sont ajoutés. Le lait est ensuite conservé à 4°C durant 12 heures minimum pour assurer la stabilité et la réhydratation des micelles de caséine.

1.2 Expression de l'activité coagulante

L'activité coagulante de la pepsine de poulet est évaluée en équivalent unités présure (UP) :

$\text{UP/mL} = 10V/T_v$ (Alais, 1984) ; tel que : UP : unité présure, V : volume de lait ; v : volume de l'enzyme multiplié par son facteur de dilution ; T : temps de floculation en secondes. Ce temps est estimé comme suit : 10 mL de substrat de Berridge mis dans un tube à essai, à 30 °C dans un bain Marie, sont additionnés de 1 mL de la solution enzymatique. Le temps de floculation est fixé par arrêt du chronomètre lors d'apparition des premiers flocons sur la paroi du tube sous mouvement rotatoire, en position incliné (Alais, 1984).

1.3 Récupération et nettoyage des proventricules

Après abattage et éviscération des poulets, un lot d'environ 700 proventricules a été transporté au laboratoire dans une glacière. La matière grasse a été ôtée, puis ils ont été lavés sous un courant d'eau avant d'être égouttés. Un échantillon est prélevé pour la détermination de l'activité coagulante à l'état frais

1.4 Préparation des proventricules pour le séchage

Les lots de proventricules destinés au séchage sous vide partiel ont été préparés selon la figure 1

Les codes attribués aux différentes pièces de proventricules sont présentés ci-dessous

Code	Identification	Code	Identification
LSS	Incisé en lamelles sans sel	QS	Incisé en quatre avec sel
LS	Incisé en lamelles avec sel	ESS	Proventricule entier sans sel
QSS	Incisé en quatre sans sel	ES	Proventricule entier avec sel

Le salage des proventricules a été pratiqué selon la méthode traditionnelle de conservation des viandes : en les frottant avec du sel de table de façon à saturer toute leurs surfaces (Fournaud, 1982). L'incision des proventricules a été effectuée à l'aide de bistouri.

1.5 Conditions du séchage sous vide

Les proventricules préparés sont répartis sur une grille métallique (36cm x 29cm) séparée et soulevée de 3 cm environ de la plaque de l'étuve. La grille est choisie pour augmenter la surface de contact entre l'air et l'échantillon. Le séchage a été réalisé dans une étuve sous vide (GALLENKAMP-SG94/09/405-UK) munie de trois étages de 3132 cm²

Ainsi, six lots sont déposés dans l'étuve, soit deux lots différents par étage. Le suivi du séchage est fait périodiquement jusqu'à l'obtention d'une masse constante sur un échantillon de contrôle pour chaque lot. La durée de séchage est comprise entre 48h et 55h. La température et la pression sont de l'ordre de 47° ± 3°C et 800 mbar respectivement.

1.6 Entreposage des proventricules séchés

Après l'opération de séchage sous vide partiel, les proventricules séchés sont pesés et emballés dans du papier aluminium puis entreposés dans des boîtes en cartons à température ambiante (25°C) et à l'abri de la

lumière et de l'humidité. La durée de l'entreposage est de 54 jours

L'extraction de la pepsine de poulet à l'état frais et après séchage a suivi le diagramme de Bohak (1970) (figure 2)

Les données expérimentales sont présentées sous forme de moyennes et d'écart-type de trois expériences.

1.7 Expression de l'activité coagulante résiduelle

La détermination de l'activité coagulante résiduelle est exprimée en valeur relative à celle des proventricules à l'état frais, qui est de 333 équivalents Unités Présure. Elle est mesurée immédiatement après la phase de séchage (Jo) (ACAS), puis pendant le stockage (tous les 9 jours jusqu'à 54 jours de stockage) (ACR).

$$\text{A.C.A. S. (\%)} = \frac{\text{Activité coagulante après séchage}}{\text{Activité coagulante initiale à l'état frais}} \times 100$$

$$\text{A.C.R. (\%)} = \frac{\text{Activité coagulante après stockage (9j)}}{\text{Activité coagulante initiale à l'état frais}} \times 100$$

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les activités résiduelles des solutions de pepsines extraites des différentes parties de proventricules incisés ou non et salés ou non soumis au séchage sous vide partiel, sont regroupées dans le tableau 1.

Après l'opération de séchage (J0), les activités coagulantes résiduelles exprimant les rendements relatifs à l'état frais (333 UP), sont comprises entre 50 % notées pour les proventricules coupés en quatre sans l'ajout de sel et 18% relevées pour les proventricules coupés en lamelles avec ajout de sel (tableau 1, figure 3 et 4).

En fin de stockage, l'activité résiduelle était relativement distincte entre les proventricules coupés en quatre sans sel (QSS) : 35,5% et les proventricules en lamelles avec sel (LS) : 4,7 % (tableau 1, figure 3 et 4).

Pour mieux interpréter les résultats obtenus, il est pertinent d'étudier l'effet du salage, de l'incision et l'effet combiné du salage et de l'incision sur les activités coagulantes résiduelles des solutions de pepsine extraites des proventricules séchés sous vide.. Par ailleurs, Garcia Fontan et al., (2007), rapportent que durant la fabrication des viandes séchées, des modifications chimiques et physico-chimiques surviennent, principalement la fermentation des

carbohydrates et l'acidification avec une lipolyse et une protéolyse.

Ces changements pourraient donc affecter la pepsine et par conséquent son activité enzymatique. De plus, le sel aide à la contraction du muscle par l'effet d'osmose et favorise ainsi la sortie des composants hydrosolubles vers le milieu extérieur (Essid et al., 2007, Essid et al., 2009). Ceci pourrait être un autre facteur dans la perte de l'activité enzymatique de la pepsine suite aux phénomènes d'osmose et d'exsudation remarqués juste après le salage et créés par les fortes concentrations en sel

Toutefois, le sel pourrait avoir aussi un effet bénéfique dans la conservation de l'activité enzymatique par le fait qu'il pourrait créer un effet inhibiteur sur une grande variété de flores microbiennes. (Vilar et al., 2000). Selon Rodríguez et al. (1994), García et al., (1995) et Vilar et al., (2000), la flore mésophile aérobie peut être partiellement ou totalement bloquée par la flore halotolérante, à cause de la concentration élevée en NaCl atteinte à la surface et à l'intérieur des pièces de viande salée et séchée.. Ceci est la conséquence de l'activité de l'eau (aw) qui a subi une baisse progressive pour atteindre la valeur de aw 0,705 en surface et de aw 0,767 à l'intérieur des pièces de viande séchée. Ce facteur pourrait contribuer à la conservation de la pepsine en inhibant la flore microbienne susceptible de la dégrader et par conséquent de la désactiver.

Pour l'incision, son intérêt a été enregistré dans la réduction de la durée de séchage sous vide partiel grâce à l'augmentation de la surface de contact avec l'air. Nous notons 48 heures de séchage pour les proventricules coupés en lamelles (LS et LSS), 53 heures pour les proventricules coupés en quatre (QS et QSS) et 55 heures pour les proventricules entiers (ES et ESS)

Le séchage est une opération complexe qui met en jeu des transferts couplés de matière (d'eau essentiellement) et de chaleur, accompagnés de modifications physico-chimiques et de structure du matériau. La chaleur est transférée par convection de l'air vers la surface, la vapeur d'eau est éliminée de la surface du produit par convection

Le séchage aide à éliminer l'eau libre par transfert de chaleur qui diffuse dans le produit sous l'effet du gradient de température et par conséquent, diminuer l'activité de l'eau (aw) jusqu'à une valeur inférieure à 0,5 qui aura comme répercussion l'augmentation de la stabilité du produit séché au cours de son stockage (KEMP et al., 2001 ; BIMBENET et al., 2002).

La stabilité relative de l'activité résiduelle de la pepsine a été bien vérifiée lors du stockage des proventricules séchés, avec des niveaux de pertes d'activité résiduelle variables en fonction des conditions de préparation, de séchage, et de la durée d'entreposage à l'état déshydraté. .

D'autre part, l'effet combiné du sel a été notablement remarqué lors de l'incision qui a pu faire augmenter la

perte en enzyme par exsudation. Plus le proventricule est incisé et salé plus la perte en activité enzymatique est marquante et notable, (figure 4). Les rendements en activité résiduelle des proventricules entiers salés sont les plus élevés, suivis des proventricules salés coupés en quatre puis les proventricules salés coupés en lamelles (figure 4). Cette différenciation est due à l'augmentation de surface de contact entre le proventricule et le sel (NaCl) qui induit une exsudation et par suite une perte en enzyme.

CONCLUSION

Le séchage des proventricule de poulet aide à réduire l'activité de l'eau et par la suite à préserver en partie (jusqu'à 50 % après séchage et 35,5 % après séchage puis stockage à température ambiante 54 jours.

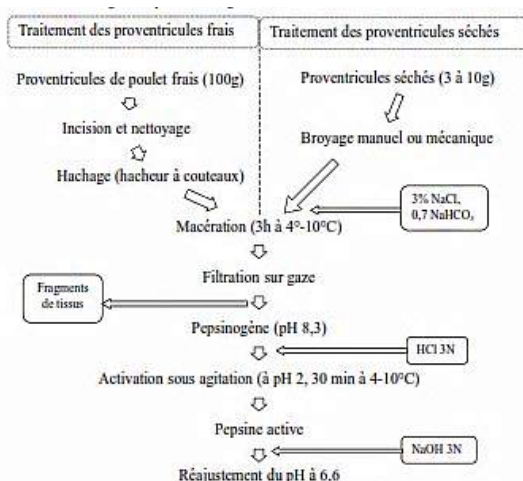
L'incision a un rôle dans la réduction de la durée de séchage sous vide partiel (entre 48h et 55h) ; cependant, elle a un effet négatif combiné au sel dans l'augmentation de la perte de l'activité de la pepsine. Cette perte est notable après incision des proventricules et est encore plus accentuée après adjonction du sel.

L'étude de la combinaison des facteurs étudiés nous permet de conclure pour sélectionner les meilleures conditions proposées :

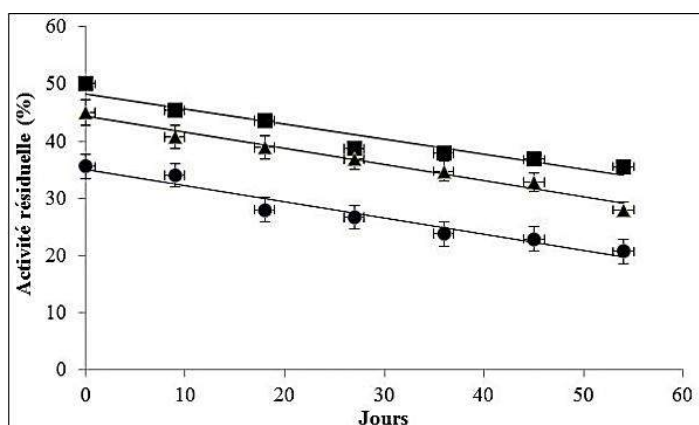
L'activité coagulante résiduelle de la pepsine extraites des proventricules de poulet coupés en quatre, non salés et séchés sous vide partiel 53 h à 47°C, a exprimé un rendement satisfaisant après séchage de 50 % avec une stabilité meilleure durant la période de stockage de 54 jours (35,5%) comparativement aux autres combinaisons de facteur utilisé pour la préparation de proventricules séchés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

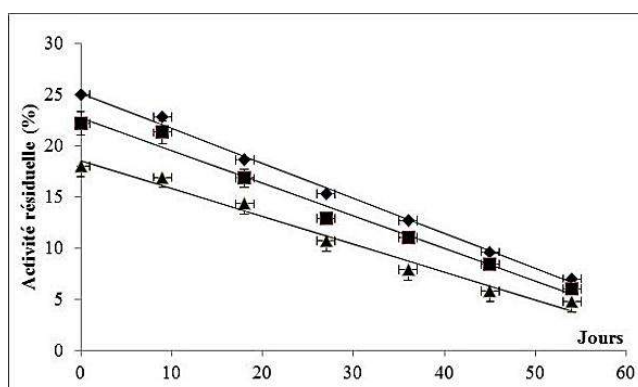
1. Alais C., 1984. Sciences du lait, principes des techniques laitières. SEPAIC, 4^{ème} édition. 811p.
2. Bimbenet J.J., Buquenoy A et Trystram G. 2002. Génie des procédés alimentaires, des bases aux applications, Dunod, 545 p.
3. Bohak, Z. 1970. Chicken pepsinogen and chicken pepsin, In: Methods in enzymology, proteolytic Enzymes. Ed., G.E. Perlmann and L. Lorand, Acad press Inc., New York Vol 19. pp 347-358, 1042p.
4. Cuvellier G.F., 1993 Production des enzymes In : Biotechnologie. Edition Scriban R. Coord 4^{ème} édition Tec. et Doc. Lavoisier, 904 p.
5. WWW.FAOSTAT.FAO.org site consulté le 26 mars 2016
6. Essid, I., Ben Ismail, H., Bel Hadj Ahmed, S., Ghedamsi, R., & Hassouna, M. 2007.
7. Meat Science, 77, 204–212.
8. Essid I., Medini M. and Hassouna M., 2009. Meat Science 81 (2009) 203–208
9. Fournaud J., 1982. Type de germes rencontrés aux différents stades de la filière, Hygiène et technique de la viande fraîche, CNERNA - Commission « viande et produits carnés », pp 109 - 131
10. Garcia Fontan, M. C., Lorenzo, J. M., Parada, A., Franco, I., & Carballo, J. 2007. Food Microbiology, 24, 52–58.
11. García I., Zumalacarregui J.M. and Díez V. 1995. Food Microbiology 12, 309-315.
12. Kemp I.C., Fyhr B.C., Laurent S., Roques M., Groenewold C., Stotsas E., Sereno A., Bonazzi C., Bimbenet J.J. et Kind M. 2001. Methods for processing experimental drying kinetics data. Drying technology vol. 19 n° 1 p. 15 à 34
13. Rodríguez M., Núñez F., Córdoba, J.J., Sanabria C., Bermúdez E. and Asensio M.A. (1994). International Journal of Food Microbiology 24, 329-335.
14. Vilar I., García Fontán M.C., Prieto B., Tornadizo, M.E. and Carballo J. 2000. Journal of Applied Microbiology 89, 1018-1026

Figure 1. Proventricules entier (E), incisés en quatre (Q) et incisés en lamelles(L)**Figure 2.** Diagramme d'extraction de pepsine de poulet selon Bohak (1970) modifié**Tableau 1.** Activités coagulantes résiduelles des solutions de pepsine extraites des proventricules incisés ou non et salés ou non au J0 et au J54

Partie du proventricule étudiée	Activité résiduelle % (J0)	Activité résiduelle % (J54)
QSS	50±0,6	35,5±1,6
QS	22,16±0,8	6±1,3
LSS	45±0,6	28±1,2
LS	18±0,7	4,7±1,1
ESS	35,5±0,3	20,7±1,3
ES	25±0,9	7±1,6

Figure 3. Evolution de l'activité coagulante résiduelle des solutions de pepsine extraites des parties de proventricules non salés

■ : QSS : $y = -0.2635x + 48.243$; $R^2 = 0.9274$;
 ▲ : LSS : $y = -0.2817x + 44.321$; $R^2 = 0.9749$;
 ● : ESS : $y = -0.2815x + 34.98$; $R^2 = 0.9516$

Figure 4. Evolution de l'activité coagulante résiduelle des solutions de pepsines extraites des parties de proventricules salés

◆ : ES : $y = -0.3425x + 25.104$; $R^2 = 0.9955$;
 ■ : QS : $y = -0.3178x + 22.66$; $R^2 = 0.9819$;
 ▲ : LS : $y = -0.2709x + 18.511$; $R^2 = 0.9797$

UTILISATION DE LA PEPSINE DE POULET DANS LA COAGULATION DU LAIT DE CHAMELLE

**Ouarda Aïssaoui-Zitoun^{1*}, Ferial-Aziza Benyahia-Krid¹, Lamia Arar¹, Dounia Korichi¹,
Halima Boughellout¹, Faiza Adoui¹, El-hocine Siar¹, Amani Harkati¹, Mohammed
Nassereddine Zidoune¹**

*¹Laboratoire de Recherche en Nutrition et Technologie Alimentaire (L.N.T.A.), équipe
(TEPA), Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires
(INATAA). Université Frères Mentouri, Constantine 1, Route Ain El Bey, Constantine-25000,
Algérie.*

**azouarda@yahoo.fr*

RÉSUMÉ

La pepsine de poulet est une enzyme protéolytique peu valorisée dans la coagulation des laits en dehors du lait de vache. L'objectif de ce travail est l'étude de la coagulation du lait de chamelle, connu pour sa faible aptitude coagulante, par la pepsine de poulet en comparaison avec la présure de commerce et le lait de vache. Les résultats ont montré que l'extrait clarifié de pepsine a une teneur en protéines de 3,20 mg/ml, une activité coagulante de $10,2 \pm 1,14$ UP (unité présure), et une force coagulante estimée à 1/19282,44. En ce qui concerne l'activité spécifique, l'extrait de pepsine a une activité de 3,18 UP/mg. Son activité protéolytique a été estimée à 1075,9 µg/ml. Le lait de chamelle présente une faible aptitude à la coagulation par rapport au lait de vache marquée par un temps de floculation lent. A 35°C, la pepsine de poulet montre une force coagulante sur le lait de vache 6 fois plus importante que sur le lait camelin et ceci au pH natif de chaque type de lait. Cependant, et à 42°C, le temps de coagulation du lait de chamelle sous l'action de la pepsine a été similaire à celle du lait de vache. Le coagulum du lait camelin par la présure apparaît comme un précipité granulé dispersé dans le lactosérum, alors qu'avec celui de la pepsine le coagulum forme un gel homogène et ferme. La pepsine de poulet peut donc être valorisée dans la coagulation du lait camelin et offre la possibilité de varier les produits laitiers à partir de ce lait.

ABSTRACT

USE OF CHICKEN PEPSIN IN CAMEL MILK COAGULATION

The chicken pepsin is a proteolytic enzyme, poorly developed in no-cow's milk coagulation. The objective of this work is the study of the camel milk coagulation, known for its weak coagulating aptitude, by the chicken pepsin in comparison with commercial rennet. Results showed that the clarified pepsin extract has a content of proteins of 3.20 mg/ml, a coagulating activity of 10.2 ± 1.14 UP, and a coagulating force estimated at 1/19282.44. With regard to the specific activity, the pepsin extract has an activity of 3.18 UP/mg. Its proteolytic activity was estimated to 1075.9 µg/ml. The camel milk exhibits a weak aptitude for coagulation compared to the cow's milk marked by a slow flocculation time. At 35 °C, chicken pepsin shows a coagulant force on cow's milk 6 times higher than on camel milk at the native pH of each milk. However, and at 42°C, the coagulation time of camel milk by pepsin was similar to that of the cow's milk. Camel milk coagulum with rennet appears as a granulated precipitate dispersed in the whey, whereas with that of pepsin the coagulum form a homogeneous and firm gel. The chicken pepsin can thus be developed in camel milk coagulation and offers the possibility of varying the dairy products starting from this milk.

INTRODUCTION

La pepsine de poulet est une enzyme protéolytique extraite du proventricule de poulet. C'est une enzyme peu valorisée dans la coagulation des laits en dehors du lait de vache. La coagulation, première étape de la fabrication, est la clé de la réussite de n'importe quel fromage. Elle consiste en la transformation du lait en gel suite à des modifications physico-chimiques intervenant sur les micelles de caséines et elle est souvent le résultat de l'action d'enzymes de différentes origines (animales, végétales et microbiennes). La présure, initialement extraite de la caillette de jeunes ruminants, est constituée d'un complexe enzymatique de chymosine et de pepsine (A et B). C'est la principale enzyme protéolytique utilisée. Les présures commercialisées en France contiennent au moins 520 mg L⁻¹ de chymosine active et un rapport chymosine/pepsine A supérieur à 1,38 (Choisy *et al.*, 1997). Cependant, sa production connaît une pénurie mondiale croissante due essentiellement à une augmentation de la production et de la consommation du fromage, et l'impossibilité d'augmenter en parallèle la production de présure. Cette pénurie a provoqué des fluctuations très importantes de son prix (Cuvellier, 1993).

Les différents types de lait utilisés en fromagerie sont le lait de vache, de chèvre et de brebis. Dans le cas du lait de chamelle la transformation en produits laitiers est très réduite. La production de lait de chamelle, journalière et annuelle, en Algérie est respectivement 3 kg/j et 1,460 kg/an (Farah, 2011). La coagulation de ce lait est connue pour être très difficile et très lente (Farah, 1987 ; Ramet, 1993). Elle a été particulièrement explorée par des essais préliminaires avec la présure bovine et avec les enzymes gastriques de dromadaire dont les résultats ont été probants (Wangoh *et al.*, 1993 ; Gorban et Izzeldin, 1997 ; Siboukeur *et al.* 2005). Ces premiers résultats sont encourageants, mais le problème de cette coagulation persiste toujours et nécessite une enzyme moins coûteuse et plus disponible. Notre travail visait à évaluer l'aptitude à la coagulation du lait camelin par des succédanés de présure traditionnellement utilisés dans la fabrication de fromages algériens et qui sont très peu valorisés, soit la pepsine de poulet. L'objectif de cette coagulation est la fabrication d'un fromage frais à partir de lait camelin. Sa caractérisation physicochimique et sensorielle a également été évaluée.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Matériel

1.1.1. Lait : Les échantillons du lait de chamelle ont été collectés à partir de troupeaux de dromadaires de race Sahraoui, en élevage extensif dans des parcours naturels de la région OUAD SOUF distante de Constantine de 335 kms.

Le lait est congelé directement après la traite puis acheminé dans une glacière au laboratoire. Les échantillons sont vérifiés par mesure de pH et d'acidité, puis conservés à -18 °C jusqu'à utilisation. Les échantillons de lait de vaches utilisés dans notre étude, proviennent d'une ferme localisée à Masinissa (Constantine). Le substrat standard de BERRIDGE est préparé par la dissolution de 12 g de la poudre de lait écrémé dans 100 ml d'une solution de chlorure de calcium 0,01 M (Alais, 1974). Le lait en poudre écrémé (1 Kg) est de qualité « moyen chauffage » de marque SOLAREC S.A. (Belgique) et provient de la laiterie SAFILAIT (Constantine). Le lait ainsi préparé est stocké à 4°C pendant 12 h afin de permettre l'établissement de l'équilibre physico-chimique. Il est utilisé pour étudier l'activité enzymatique de la pepsine de poulet.

1.1.2. Enzymes de coagulation

1.1.2.1. Pepsine de poulet

La pepsine de poulet est préparée à partir de proventricules. Les proventricules, de 8 et 10 g, sont récupérés après abattage, incisés puis rincés à l'eau et répartis en lots de 100g. Ils sont utilisés pour l'extraction de l'enzyme en suivant le protocole proposé par Bohak (1970) cité par NOUANI *et al.* (2011). Les proventricules hachés sont mis dans une solution saline de macération (30 g/l de NaCl et 7 g/l de NaHCO₃), à raison de 300 ml de la solution de macération pour 100 g des proventricules. Après 3 h de macération sous agitation, le pepsinogène est activé par ajout d'HCl (3N) jusqu'à pH = 2. Ensuite, le mélange est maintenu à température ambiante pendant 15 minutes, puis est filtré pour récupérer l'extrait brut de pepsine de poulet. Le filtrat est enfin centrifugé (à 3200g pendant 30 min à 4°C ; centrifugeuse SEGMA model 3-30K, Allemagne). Le pH du surnageant obtenu, est ajusté à 6,4 par une solution de NaOH (3N). Il représente l'extrait de pepsine clarifiée.

1.1.2.2. Présure

La présure se présente sous forme de poudre (Fromase, France) de force coagulante 1/220000. La solution mère de présure est préparée par reconstitution de 1 g de poudre dans 100 ml d'eau distillée. Cette solution est conservée à 4°C durant 3 jours maximum.

1.2. Méthodes

1.2.1. Analyse physicochimique des laits

La détermination du pH est réalisée à l'aide d'un pH-mètre électronique (HANNA instruments, Roumanie), l'acidité titrable est mesurée avec la soude Dornic (0,1N) (AFNOR, 1993) et la teneur en matière grasse

du lait par la méthode de Gerber (AFNOR, 1993). La détermination de l'extrait sec est effectuée par un étuvage sous vide à $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ jusqu'à poids constant de l'échantillon (AFNOR, 1993).

1.2.2. Caractérisation des extraits enzymatiques

La teneur en protéines des extraits est réalisée selon la méthode de Lowry (1951). L'activité protéolytique est déterminée en mesurant les unités aspartyl-protéases (Anson et al. 1938, cité par Mechakra *et al.* 1999). Son principe consiste à mesurer l'accroissement des produits d'hydrolyse obtenus par action enzymatique sur la caséine solubilisée dans l'acide trichloracétique (T.C.A.) à 12% concentration finale. Le mélange réactionnel est constitué de 2 ml de la solution de caséine 1% (1g de caséine dans 100 ml du tampon acétate de sodium, pH=5,2) à la quelle est ajouté 1 ml de d'extrait enzymatique. Le mélange est incubé à 35°C pendant 1 heure, la réaction est arrêtée par l'ajout de 5 ml de T.C.A. à 12%, après un temps de repos de 15 min les produits d'hydrolyse sont séparés par une centrifugation à 6200g pendant 10 min. Dans notre étude, l'évaluation du taux de dégradation du substrat (caséines) pendant la réaction d'hydrolyse est réalisée par le dosage de la tyrosine soluble dans le T.C.A. à 12% selon la méthode de Lowry *et al.* (1951). L'unité d'activité coagulante est évaluée dans le substrat standard de Berridge à 30°C (Alais, 1974) et la force coagulante est exprimée en force coagulante de Soxhlet (Veisseyre, 1979) qui correspond au volume de lait coagulé par unité de volume de l'extrait enzymatique en 40 minutes, à 35°C et pH 6,4 du lait cru. Selon Ramet (1993), la température optimale de coagulation du lait camelin se situe à $40-42^{\circ}\text{C}$. Le temps de coagulation du lait camelin a donc été évalué à 42°C en comparaison avec le lait de vache à la même température. Il en va de même pour la force coagulante du lait de chamelle mesurée à 42°C . La température de 35°C est la température optimale pour le lait de vache. L'activité spécifique des enzymes est exprimée par le rapport entre l'activité coagulante de l'extrait enzymatique et le taux de protéines de cet extrait enzymatiques et exprimée en UP (unité présure)/mg (Nouani *et al.*, 2009).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Caractéristiques des laits

Les résultats des analyses physico-chimiques des deux types de lait utilisés pour l'étude de la coagulation avec la pepsine de poulet sont résumés dans le tableau 1. Le lait camelin a un pH de $6,54 \pm 0,01$ qui est légèrement plus faible que celui de vache. L'acidité du lait de vache est comprise dans l'intervalle cité par FAO (1995). L'acidité du lait de chamelle est proche de celle donnée par Siboukeur *et al.* (2005). Cependant elle est supérieure à celle rapportée par Elamin et Wilcox (1992) en Arabie Saoudite (15°D) et Kamoun (1994) en Tunisie ($15,6 \pm 1,4^{\circ}\text{D}$). En effet, le lait de chamelle a une forte concentration en

acides gras volatiles (Yagil, 1985) et une teneur relativement élevée en vitamine C (Saley, 1993) qui peuvent influencer son acidité. La teneur moyenne en extrait sec total enregistrée pour le lait de vache est de $12,4\% \pm 0,2\%$ qui est comparable à la teneur donnée par la FAO (1995) (12,8 %). Pour le lait de chamelle, la valeur enregistrée est de l'ordre de $11,6 \pm 0,2\%$. Elle est du même ordre de grandeur que celle rapportée pour la race Hamra ($11,6 \pm 1,1$) selon Mehaia *et al.* (1995). Cependant, elle se situe entre les teneurs rapportées par Debouza *et al.* (2014) ($10,24 \pm 0,46\%$); et par Abu-Lehia (1989) du lait des races Majaheem et Somali (12,15 %). L'une des principales caractéristiques du lait camelin est en effet, sa teneur en matière sèche réduite par rapport à celle des laits d'autres espèces (Ramet, 1994). La teneur en matière grasse enregistrée dans le lait de vache est supérieure à l'intervalle donné par AFNOR (1993) (28,5 à 32,5). Pour le lait de chamelle, elle est comparable à celle rapportée pour la race Hamra 28,5 g/l et supérieure à celle de la race Wadah (24,6 g/l) (Mehaia *et al.*, 1995).

2. Caractéristiques des extraits enzymatiques

Les caractéristiques des extraits enzymatiques (teneur en protéines, activité protéolytique, l'activité et la force coagulante et l'activité spécifique) utilisés dans notre étude sont présentées dans le tableau 2.

L'extrait de présure est caractérisé par une teneur en protéines de $0,305 \pm 0,20$ mg / ml, une activité coagulante de $11,67 \pm 0,90$ et une force de 1/13924. Par ailleurs l'extrait clarifié de pepsine dispose d'une teneur en protéines de 3,20 mg/ml et son activité coagulante est de $10,2 \pm 1,10$ U.P. Cette activité est proche à la valeur trouvée par Nouani *et al.* (2011). En termes de force coagulante l'extrait de la pepsine que nous avons obtenu a une force de 1/ 19282 et une activité spécifique de 3,20 UP/mg. L'ensemble de ces caractéristiques montrant l'activité protéolytique importante de la pepsine et la possibilité de son utilisation dans la coagulation du lait de chamelle.

L'activité protéolytique des deux enzymes est schématisée en figure 1. La figure montre la quantité de produits d'hydrolyse libérés par la même quantité d'enzyme (présure ou pepsine de poulet) sur les caséines de lait de vache. Dans le cas de la présure, c'est principalement la chymosine qui agit sur le lait. Pour la pepsine de poulet plusieurs auteurs ont signalé une activité protéolytique supérieure à celle de la présure (Stanley *et al.*, 1980; Findlay *et al.*, 1984). Cependant, pour assurer un bon rendement fromager et pour éviter certains défauts de goût et de texture qui peuvent apparaître sur les fromages, ces protéases doivent présenter une protéolyse générale faible.

2. Allure de la coagulation

Concernant l'allure de la coagulation, proprement dite, sur le lait après ajout de l'extrait enzymatique, nous avons noté une différence dans le temps de coagulation du lait de vache et du lait de chamelle avec la présure et avec la pepsine de poulet à 35°C .

La pepsine de poulet dispose d'une force coagulante sur le lait de vache 6 fois plus importante que sur le lait camelin et ceci au pH natif de chaque lait et à une température de 35°C. Cependant, à 42°C, la coagulation du lait de chamelle sous l'action de la pepsine a été similaire à celle du lait de vache. Le coagulum prend forme à partir de 30 min environ (figure 2).

Il ressort de ces figures que la coagulation du lait de vache par la présure a été la plus courte (7 min) suivie par la pepsine de poulet (30 min). D'autre part, la coagulation du lait de chamelle a été similaire à celle du lait de vache avec la pepsine. Le gel camelin de pepsine semble être plus ferme et tranchable en comparaison avec celui de présure où le coagulum reste dispersé dans la phase aqueuse, sans prise de gel proprement dite.

CONCLUSION

La pepsine de poulet, au vu de sa forte activité protéolytique, est une enzyme qui peut être valorisée dans la coagulation du lait camelin et offre la possibilité de varier les produits laitiers à partir de ce lait et principalement dans les zones semi-arides et arides de l'Algérie. Le proventricule de poulet, source de l'enzyme, est un co-produit de l'industrie de poulets, qu'il est facile de se procurer tout au long de l'année et nécessite une meilleure valorisation dans l'industrie agro-alimentaire, notamment dans celle de la fromagerie. Tout au contraire de la présure de ruminants dont les disponibilités sont moindres et le coût est plus important.

REFERENCES

- Abu-Lehia I. H., 1989. Food Chemistry, (34), 261-71.
- AFNOR, 1993. Contrôle de la qualité des produits alimentaires. Paris La Défense : AFNOR, 4 éd, 581 p.
- Alais C., 1974. Principes des techniques laitières : science du lait. Ed : Publicité, Paris. 513 p.
- Choisy C., Desmazeaud M., Gripon J. C., Lamberet G. et Lenoir J., 1997. La biochimie de l'affinage in « Le fromage, Eck, A., et Gillis J.C. (coord.) », pp : 87-161, 3ème édition, Lavoisier Tec. & Doc. 891 p.
- Cuvellier G.F., 1993. Production des enzymes In : Biotechnologie. Edition Scriban R. Coord 4ème édition Tec. et Doc. Lavoisier, 904 p.
- Debouza A., Guerguer L., Hamid Oudjana A et Hadj Seyd A.E.K., 2014. Revue El Wahat pour les Recherches et les Etudes, (7) 2, 10 – 17
- Elamin F.M. and Wilcox C.J., 1992. In J.Dairy Sci. (75), 3155-3157.
- FAO (1995). Lait et produit laitier dans la nutrition humaine, Rome, 269p.
- Farah Z. and Bachman M.R., 1987. In Milchwissenschaft, (42), 689-692.
- Farah Z., 2011. Camel Milk, In Encyclopedia of Dairy Sciences, (2nd ed.) Editor-in-Chief., pp. 512-517.
- Findlay C.I., Stanley D.W. et Emmons D.B., 1984. In Can. Inst. Food Sci. Technol. J. (17), 97-101.
- Gorban A.M.S. and Izzeldin O.M., 1997. In J. Dairy Technol. (64), 471-474.
- Kamoun M., 1994. Actes du Colloque « Dromadaires et chameaux, animaux laitiers » 24-26 octobre, Nouakchott, Mauritanie.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J., 1951. In J. Biol. Chem. (193), 265-275.
- Mechakra A., Auberger B., Remeuf F., et Lenoir J., 1999. In Sciences des aliments (19), 663-675.
- Mehaia M. A., Hablas M. A., Abdel-Rahman K. M., El-Mougy S. A, 1995. In Food Chem. (52) 115-122.
- Nouani A., Dako E., Morsli A., Belhamiche N., Belbraouet S., Bellal M.M. et Dadie A., 2009. In J. Food Technol., 7: 39, 1-13.
- Nouani A., Hamrani L., Bellal M. M., 2011. Neuvièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, 29 et 30 mars.
- Ramet J.P. 1994. Les aspects scientifiques et technologiques particuliers de la fabrication de fromage au lait de dromadaire. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.
- Ramet, J.P., 1993. Etude F.A.O., Production et santé animales, pp. 113.
- Saley M., 1993. La Production Laitière du Dromadaire. CIRAD, Ed Maison-Alfort, Paris.
- Siboukeur O., Mati A. et Hesses B. 2005. In Cahiers Agricultures, 5, 473-478.
- Stanley D. W., Emmons D.B., Modler H.W. et Mirvine D., 1980. Can. Inst. Food Sci. Technol. 1. 13: 97-102.
- Veisseyre R., 1979. Technologie du lait, maison rustique, 3ème édition refondue de techniques laitière, 715 p.
- Wangoh J., Farah Z. and Puan Z., 1993. Milchwissenschaft, 48, 322-325.
- Yagil R., 1985. The Desert camel; comparative physiological adaptation. Ed Karger, Basal. New York, pp. 163.

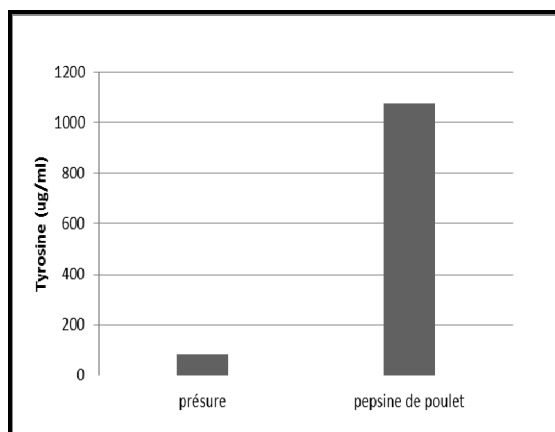
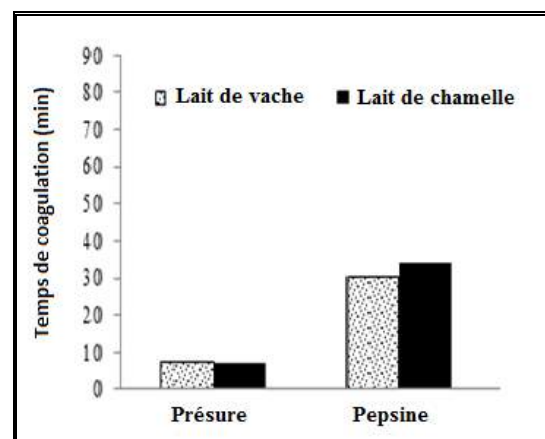
Tableau 1. Caractéristiques du lait de vache et du lait de chamelle

	Lait de vache*	Lait de chamelle*
pH	6,80 ± 0,01	6,54 ± 0,01
Acidité titrable(°D)	16,33 ± 0,57	17,33 ± 0,01
Extrait sec total (%)	12,40 ± 0,20	11,60 ± 0,20
Matière grasse (g /l)	35,00±0,00	28,00±0,00
Densité	1,03 ± 0,01	1,03 ± 0,00

* moyenne de trois essais.

Tableau 2. Principales caractéristiques des enzymes extraites

Caractéristiques	Pepsine	Présure
Taux de protéine (mg/ml)	3,20 ± 0,60	0,305 ± 0,20
Activité protéolytique (µg /ml)	1075,9 ± 0,03	83,48 ± 0,08
Activité coagulante (UP)	10,2 ± 1,10	11,67 ± 0,90
Force coagulante	1/19282	1/13924
Activité spécifique (UP/mg)	3	3

Figure 1. Quantité des produits d'hydrolyse protéiques libérés (tyrosine en µg/ml) sous l'action des extraits enzymatiques**Figure 2.** Temps de coagulation lait de vache et au lait de chamelle avec les différentes enzymes à 42°C



Offrez du
FOIE GRAS
ON S'EN SOUVIENDRA !



Pour plus d'informations sur la tradition culturelle et gastronomique du Foie Gras :
www.leblogdufoiegras.com / www.lefoiegras.fr

Un Oeuf chaque jour... En forme toujours !*

Grâce à ses qualités nutritionnelles,
l'Oeuf est un aliment d'exception

L'Oeuf offre des protéines de qualité pour
un prix très abordable

En cuisine, l'Oeuf fait merveille dans
de nombreuses recettes salées ou sucrées



Pour en savoir plus sur l'Oeuf, connectons-nous sur www.leblogdeloeuf.com

Le CNPO est l'Interprofession de l'Oeuf qui représente chacun des maillons de la filière Oeuf, des accoueurs aux transformateurs en passant par les éleveurs, il regroupe huit organisations. Le CNPO a été reconnu par les pouvoirs publics le 12 mars 1996. Il est chargé de contribuer au développement et à la prospérité des différentes branches de la filière ponte.

*sauf contre indication



Comité National pour
la Promotion de l'Oeuf



Delacon.
performing nature