

EFFET DU SYSTEME D'ELEVAGE DES POULES PONDEUSES SUR LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DES ŒUFS COQUILLES

Chastagner Amélie¹ & Gillot Guillaume², Riou Antoine², Mouhali Nassim², Evrard Julie², Huchet Véronique², Galliot Pascal¹, Souchet Christophe¹, Jan Sophie³, Lechevalier Valérie³, Norwood Eve-Anne⁴, Debregeas Carole⁵, Travel Angélique¹

¹ ITAVI, 7 rue Faubourg Poissonnière 75009 Paris, France

² ADRIA Food Technical Institute, 29000 Quimper, France

³ STLO, l'Institut Agro Rennes-Angers-INRAE, 35042 Rennes, France

⁴ ONIRIS-GEPEA, 44000 Nantes, France

⁵ ADRO Ouest, Rennes, France

chastagner@itavi.asso.fr

RÉSUMÉ

L'évolution des modes d'élevage des poules pondeuses s'oriente progressivement vers des systèmes alternatifs favorisant le bien-être animal. Dans ce contexte, un des objectifs du projet ELEV'OP est d'évaluer l'impact de différents systèmes d'élevage sur la qualité microbiologique de la surface des œufs. Deux souches de poules Lohmann ont été étudiées avec 26 élevages répartis dans 3 systèmes d'élevage (cage, sol et plein air). La population microbienne de la surface des œufs a été évaluée par dénombrement de la flore totale aérobie mésophile, psychrotrophe et sporulée psychrotrophe, des entérocoques et des entérobactéries présumées, et comparée à la contamination de l'air dans la salle d'élevage et sur le convoyeur. Dans le même temps, une approche métabarcoding 16S a été mise en œuvre pour caractériser plus précisément les communautés bactériennes présentes à la surface des œufs. La charge microbienne est très variable entre les élevages. L'analyse quantitative ne montre par exemple pas d'effet du système d'élevage sur les flores dénombrées sur les coquilles dans cette étude. Un effet de la saison est en revanche mis en évidence pour la flore totale psychrotrophe sur la coquille qui est plus présente en saison froide, inversement à la présence d'entérocoques qui domine en saison chaude. L'analyse qualitative met en évidence une « signature microbienne » démarquant le système d'élevage en cage des systèmes alternatifs. Le système d'élevage a un effet sur le profil des communautés bactériennes à la surface des œufs, mais la saisonnalité et les pratiques d'élevages apparaissent comme plus impactant que le système d'élevage sur le dénombrement des flores bactériennes sur la surface des coquilles.

ABSTRACT

EFFECT OF THE BREEDING SYSTEM OF LAYING HENS ON THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF SHELL EGGS

Laying hen breeding methods are gradually moving towards alternative systems that promote animal welfare. In this context, one of the aims of the ELEV'OP project is to assess the impact of different breeding systems on the microbiological quality of egg surfaces. Two strains of Lohmann hens were studied on 26 farms in 3 breeding systems (cage, barn and free range). The microbial population on the egg surface was assessed by counting total aerobic mesophilic, psychrotrophic and psychrotrophic spore-forming flora, enterococci and presumptive enterobacteria, and compared with air contamination in the breeding room and on the conveyor. At the same time, a 16S metabarcoding approach was implemented to characterize more precisely the bacterial communities present on the egg surface. The microbial load varied considerably between farms. Quantitative analysis, for example, showed no effect of breeding system on the eggshell flora counted in this study. On the other hand, the total psychrotrophic flora on the shell is more present in the cold season, while enterococci are more prevalent in the warm season. Qualitative analysis reveals a "microbial signature" that sets cage farming apart from alternative systems. The breeding system influences the profile of bacterial communities on the egg surface, but seasonality and breeding practices appear to have a greater impact than the breeding system on the enumeration of bacterial flora on the shell surface.

INTRODUCTION

L'évolution des modes d'élevage des poules pondeuses vers des systèmes favorisant le bien-être animal a été engagée suite aux évolutions législatives européennes en matière de bien-être (directive 1999/74/CE), appliquée en 2012, qui interdit les cages non aménagées (code 3). Mais depuis plusieurs années maintenant, les élevages de poules pondeuses en cage poursuivent leur métamorphose vers des systèmes alternatifs pour répondre à la demande sociétale et pour s'adapter aux engagements pris par l'aval de ne plus s'approvisionner en œufs de code 3. L'effet des systèmes d'élevage sur la production d'œufs a été évalué dans différentes études sur plusieurs aspects : productivité, poids moyen des œufs, unité Haugh et résistance des coquilles, qualité d'hygiène microbiologique... (da Silva Pires *et al.*, 2021). L'originalité du projet ELEV'OP est d'évaluer l'impact de différents systèmes d'élevage sur la qualité microbiologique et les propriétés fonctionnelles des œufs jusqu'à leur transformation en ovoproduits. Dans cet article, seuls les résultats de la qualité microbiologique de la surface des œufs sont présentés. La colonisation microbienne des coquilles a lieu pendant la courte période entre la ponte et la collecte, et résulte d'un transfert des bactéries cloacales sur l'œuf suivi des bactéries déposées par contact avec les poussières et surfaces sales. La contamination des coquilles a des conséquences à la fois sur le risque de toxi-infection alimentaire des consommateurs, en cas de présence de *Campylobacter* ou d'entérobactéries pathogènes tel que *Escherichia coli* ou *Salmonella*, mais également sur la durée de conservation des œufs et ovoproduits puisque certaines bactéries ont des propriétés altérantes, telles que les *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Proteus* et *Aeromonas* qui résistent aux défenses antimicrobiennes de l'œuf et peuvent se retrouver dans l'œuf (Mallet *et al.*, 2010). La maîtrise des bactéries aux propriétés altérantes ainsi que des microorganismes psychrotrophes, thermorésistants et/ou sporulés, potentiellement sélectionnés par les procédés de conservation (chaîne du froid) et de transformation (pasteurisation), sont un enjeu essentiel pour les ovoproduiturs (Baron *et al.*, 2010). Cette maîtrise commence dès la production des œufs à l'élevage. Les systèmes alternatifs sont depuis longtemps vus comme facteurs de risque pour la contamination des coquilles, du fait du contact des poules avec la litière souillée par les fientes, éventuellement l'extérieur et l'augmentation des poussières par leurs mouvements (De Reu *et al.*, 2008). Cependant, l'adaptation des pratiques et des équipements dans ces nouveaux systèmes vise à effacer ces différences. Notre objectif est d'étudier l'influence des systèmes d'élevage sur la flore de coquille dans les élevages actuels français, en

comparant à la fois la charge bactérienne et la diversité des communautés bactériennes.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Critères de recrutement des fermes

Deux souches de poules ont été étudiées à un âge moyen de 58 semaines pour maîtriser les effets génétique et âge qui sont connus pour influencer les paramètres physiques des œufs : la souche Lohmann Brown Classic (LB) génétiquement sélectionnée pour produire des œufs bruns à destination de la vente en coquilles et la Lohmann White LSL Classic (LW) sélectionnée pour ses performances de production d'œufs blancs destinés à la transformation en ovoproduits. Trois systèmes d'élevage ont été comparés : cage, sol et plein air.

1.2. Prélèvements effectués : air, convoyeur, chiffonnettes œufs et œufs entiers

Les prélèvements ont été réalisés pendant la 1^{ère} collecte des œufs du matin. Les œufs ont été pris aléatoirement en début, milieu et fin de collecte pour représenter l'ensemble du bâtiment. Cinq sacs stériles contenant chacun 3 œufs ont été préparés pour l'analyse microbiologique. En parallèle, 4 groupes de 10 œufs ont été essuyés avec une chiffonnette stérile par groupe imbibée d'eau peptonée tamponnée (EPT) sans neutralisant. Les chiffonnettes ont été conservées à 4°C durant leur transport et jusqu'à réalisation de l'analyse microbiologique.

Pendant le ramassage, les bactéries aéroportées ont été collectées dans la salle d'élevage par deux capteurs individuels de polluants microbiologiques CIP 10-M. A la fin du ramassage, 3 chiffonnettes ont été frottées sur 3 zones de taille A4 réparties le long du convoyeur début, milieu, fin (ex: ascenseur entrée, convoyeur, ascenseur fond).

Chaque échantillon a été manipulé avec des gants stériles (une paire de gant neuve par lot) pour éviter tout risque de contaminations croisées.

1.3. Analyses microbiologiques

Les lots de 3 œufs ont été lavés dans 50 mL d'eau peptonée tamponnée (EPT) pour mettre en suspension la flore de coquille. Pour les prélèvements d'air, les filtres en mousse ont été immergés individuellement dans 10 mL d'EPT. Enfin, pour les chiffonnettes du convoyeur, la dilution a été réalisée dans 50 mL d'EPT. Pour ces échantillons, la flore mésophile totale a été dénombrée par la méthode Spiral à 30°C selon la norme XP V08-034. La quantité d'entérobactéries présumées a été mesurée par inclusion à 30°C selon la norme NF V08-054. Le dénombrement des entérocoques a été réalisé sur milieu Slanetz. Les dénombrements ont été convertis en UFC/cm² de coquille en se basant sur la surface moyenne de

coquille estimée sur 40 œufs du même élevage par l'équation $4.69 \times (\text{poids de l'œuf})^{2/3}$.

Les chiffonnettes ayant essuyé les 10 œufs ont été retransférées en conditions stériles dans un sac à filtre (30 µm) au moment de l'analyse et 225 mL d'EPT ont été ajoutés par sac. Une homogénéisation à l'aide d'un broyeur type Stomacher a été réalisée durant 1 min/s. Les dilutions successives ont été réalisées à l'aide de tryptone sel. Pour chaque dénombrement, le milieu non sélectif PCA a été utilisé. 3 conditions différentes ont été testées : 72h à 30°C pour la flore totale, 5 à 7 jours à 15°C pour la flore psychrotrophe et l'application d'un traitement thermique de 10 min à 80°C puis une incubation de 5 à 7 jours à 15°C pour la flore sporulée psychrotrophe.

1.5. Approche métabarcoding

Pour chacune des lingettes ayant essuyé les œufs, 40 mL ont été prélevés du sac issu de l'analyse microbiologique décrite précédemment. Une centrifugation de 5000g durant 30 min a été réalisée. Par la suite, le culot a été repris dans 500 µL d'une solution de lyse supplémentée de 100 µL de protéinase K. La suite de l'extraction d'ADN a été réalisée en utilisant le DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Une purification des extraits a été réalisée à l'aide de billes magnétiques. A la suite des purifications, une quantification de l'ADN via un Fluorimètre Qubit 4 a été réalisée. Les extraits d'ADN ont ensuite été placés à -20°C en attendant la préparation de la librairie pour le séquençage. L'approche métabarcoding appliquée a été réalisée avec la technologie de séquençage Oxford Nanopore Technologies en utilisant le 16S Barcoding Kit et le séquenceur MinION Mk1C. Les analyses bio-informatiques ont été réalisées avec l'outil EPI2ME - FASTQ 16S (v2022.01.07). Les proportions relatives des genres bactériens identifiés par élevage ont été calculées sur la moyenne du nombre de lectures par genre obtenu sur les 10 genres les plus représentés sur chaque lingette (top 10).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Description des systèmes visités

Au total, 26 élevages ont été échantillonnés entre octobre 2021 et octobre 2022, 15 élevages sur la période « froide » (3 LB/ 2 LW en système cage, 2 LB / 2 LW au sol et 3 LB/ 3 LW plein-air) et 11 élevages en période « chaude » (2 LB / 2 LW en cage, 1 LB au sol et 2 LB / 4 LW en plein-air). Les bâtiments des élevages au sol et plein-air étaient équipés de volières, à l'exception d'un élevage de LW en plein-air. En raison de l'épizootie d'influenza hautement pathogène qui a sévit en France en 2021-2022, les poules de seulement 4 élevages plein-air sur 12 avaient accès au parcours le jour de la visite et les 3 semaines précédentes.

2.2. Analyse quantitative : charge microbienne

La charge microbienne de coquille était très variable entre les élevages. La flore totale aérobie mésophile moyenne mesurée à la surface des œufs sur les lots de 3 œufs entiers variait entre élevages de 1,6 à 5,0 log UFC/cm² de coquille (soit environ 3,1 à 6,9 log UFC/coquille) avec une médiane de 3,05 log UFC/cm². L'analyse quantitative ne montrait pas d'effet du système d'élevage et de la souche sur les différentes flores dénombrées dans cette étude (Tableau 1). La claustration des poules plein-air pendant les périodes à risque d'influenza aviaire n'a pas montré d'effet sur la charge microbienne, car les bâtiments visités étaient adaptés en taille et en équipements pour assurer une bonne gestion de l'ambiance (température, humidité et ventilation). Un effet de la saison a été mis en évidence pour la flore totale psychrotrophe de coquille qui était plus présente dans les élevages échantillonnés en saison froide d'octobre à avril (5,3 versus 4,6 log UFC/g). Inversement à la présence d'entérocoques plus forte en saison chaude de mai à octobre (en moyenne 0,8 versus 2,6 échantillons positifs sur 5) indépendamment de la souche et du système d'élevage. Ces résultats sont cohérents avec le thermotropisme de ces deux catégories de bactéries. Mallet *et al.* (2006) ont également observé une augmentation d'entérocoques en été, ce qu'ils expliquent par l'augmentation de la température, de la ventilation et des brumisateurs qui favorisent la diffusion et l'adhésion de bactéries aéroportées. Dans notre étude, la présence d'entérocoques sur les coquilles est en partie corrélée à leur présence dans l'air ($R = 0.51$).

2.3. Analyse qualitative : métabarcoding 16S

L'analyse par métabarcoding 16S sur les coquilles a permis d'identifier 40 genres bactériens en cumulant l'ensemble des top 10 sur les lingettes (31 genres identifiés en cage, 23 en sol et 26 en plein-air). La diversité était cependant plus forte dans les systèmes alternatifs (Shannon index = 1.63 en cage, 1.98 en sol et 1.89 en plein-air) ce qui peut être expliqué par le contact des poules avec un environnement plus riche et diversifié. Au niveau des phylums, l'ensemble des échantillons était dominé par la présence de *Bacillota*, anciennement *Firmicutes* (93,9%±10,6), suivi à plus faible proportion par les *Pseudomonadota*, anciennement *Proteobacteria* (4,4%±8,9) et *Actinomycetota* (0,6%±1,0) sans distinction entre les systèmes d'élevage. Au niveau des genres, 8 ont été presque systématiquement retrouvés sur les coquilles : *Lactobacillus* largement dominant (49,3 %±14,6) quel que soit le système, *Staphylococcus* plus présent dans les systèmes alternatifs, *Romboutsia* et *Blautia* plus fréquent dans les système cage, puis *Jeotgalicoccus*, *Enterococcus*, *Aerococcus* et *Streptococcus* sans distinction entre système d'élevage (Figure 1). La forte présence de *Lactobacillus* pourrait être expliquée par l'utilisation de probiotiques, contenant des

Lactobacillus, administrés aux jeunes poules pour les protéger de *Salmonella* lors des premiers stades de leur développement, et qui colonisent le système digestif au stade juvénile et perdurent à l'âge adulte, agissant entre autres comme flore compétitive. Parmi les genres bactériens Gram+ les moins fréquents, on peut noter que *Salinicoccus* n'a été observé dans le top 10 que dans un élevage cage sur les 15 occurrences, *Lachnoclostridium* a été observé dans le top 10 dans 6/8 élevages cage et plus rarement dans les autres systèmes. La colonisation bactérienne de la coquille se faisant principalement au niveau du cloaque, la présence des bactéries citées ci-dessus est cohérente avec les microbiotes cloacaux, caecaux et intestinaux décrits chez la poule (Schreuder *et al.*, 2020, Khan *et al.*, 2020, Dai *et al.*, 2022). A l'opposé, les genres de l'ordre des *Micrococcales*, bactéries du sol et des litières (ex. *Brachybacterium* ou *Brevibacterium*) sont rares en système cage ce qui est cohérent avec l'absence de contact des poules avec le sol. Parmi 40 genres identifiés dans les top 10, on peut noter la présence de 12 genres Gram-, dont *Megamonas* dans 12 élevages (incluant 7/8 en cage), *Acinetobacter* dans 13 élevages, *Psychrobacter* dans 7 élevages, *Pseudomonas* et *Arcobacter* dans 2 élevages. En plus du potentiel entéropathogène de certaines bactéries (ex. *Acinetobacter*, *Psychrobacter*), la présence de ces bactéries Gram- à la surface des œufs représente un risque d'altération de la qualité des œufs, car elles passent plus facilement les défenses antimicrobiennes internes de l'œuf et peuvent impacter leur conservation et leurs propriétés fonctionnelles (De Reu *et al* 2008).

L'analyse du microbiote cloacal des poules pondeuses menée par Schreuder *et al.* (2020) avait montré une forte variation entre élevages (20,9%) mais peu d'effet du système d'élevage (0,2 %). Ici, bien que les genres bactériens identifiés sur les coquilles des œufs des différents systèmes soient similaires, l'analyse de la structure des communautés bactérienne par l'ACP met en évidence une « signature microbienne » démarquant le système d'élevage en cage des systèmes alternatifs (Figure 2). On observe notamment une plus forte association avec les genres *Megamonas*, *Lachnoclostridium*, *Blautia* et *Romboutsia* pour le système cage.

CONCLUSION

Dans cette étude, le système d'élevage n'a pas montré d'effet significatif sur le dénombrement des flores bactériennes sur la surface des coquilles. Cependant à l'échelle qualitative, les systèmes d'élevage ont un effet sur le profil des communautés bactériennes à la surface des œufs. La forte variabilité observée entre les élevages indique que les pratiques d'élevages (gestion de l'ambiance, de l'alimentation, de l'évacuation des fientes, du nettoyage des convoyeurs...) apparaissent comme plus impactant que le système d'élevage sur le dénombrement des flores bactériennes sur la surface des coquilles. Une étude complémentaire semble nécessaire pour mettre en relation les pratiques d'élevage et l'analyse des communautés bactériennes, afin d'identifier des leviers pour limiter les bactéries aux propriétés altérantes qui peuvent dégrader la qualité des œufs de consommation comme les ovoproduits.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Baron F., Jan S. 2010. INRA Prod. Anim., (23), 193-204.
- Dai, D., Qi, G. H., Wang, J., Zhang, H. J., Qiu, K., & Wu, S. G., 2022. Poultry Science, 101(9), 102008.
- De Reu K., Messens W., Heyndrickx M., Rodenburg T.B., Uyttendaele M., Herman L., 2008. World's Poultry Science Journal, (64), 5-19.
- Khan, S., Moore, R. J., Stanley, D., Chousalkar, K. K., 2020. Applied and envi. microbiol., 86(13), e00600-20.
- Mallet S., Guesdon V., Ahmed A.M.H, Nys Y., 2006. British Poultry Science, (47), 30-35.
- Mallet S., Huneau-Salaün A., Herman L., De Reu K., 2010. INRA Prod. Anim., (23), 183-192.
- da Silva Pires, P. G., Bavaresco, C., Prato, B. S., Wirth, M. L., de Oliveira Moraes, P., 2021. Livestock Science, (250), 104597.
- Schreuder, J., Velkers, F. C., Bouwstra, R. J., Beerens, N., Stegeman, J. A., de Boer, W. F., van Hooft P., Elbers A.R.W., Bossers A., Jurburg, S. D., 2020. Animal microbiome, 2(1), 1-11.

Tableau 1. Flore bactérienne mesurée à la surface des œufs et dans l'environnement dans les différents systèmes d'élevages. Aucune différence statistique n'a été observée avec le seuil $p < 0.05$.

Système d'élevage	Nb élevage	Bactérie à la surface des coquilles						[Conveyeur]	[Air]
		¹ Flore mésophile totale (log UFC/cm ²)	² Flore mésophile totale (log UFC/coquille)	² Flore psychrotrophe (log UFC/coquille)	² Flore sporulée (Nb élevage positives)	¹ Enterobacteries (Nb d'élevage positifs)	¹ Enterococcus spp (Nb d'élevage positifs)	Flore mésophile totale (log UFC/cm ²)	Flore mésophile totale (log UFC/m ³)
Cage	9	2,7±0,6	3,7±0,5	3,5±0,5	6 (67%)	7 (78%)	4 (44%)	4,3±1,4	4,7±0,7
Sol	5	3,3±0,7	4,3±0,9	4,1±0,9	2 (40%)	3 (60%)	4 (80%)	4,8±0,4	5,5±0,7
Plein-Air	12	3,3±0,6	4,1±0,3	4,0±0,9	5 (42%)	4 (33%)	7 (58%)	4,7±0,9	5,3±0,5

¹ Valeur moyenne obtenue à partir des 5 lots de 3 œufs lavés dans l'eau peptonée

² Valeur moyenne obtenue à partir des 4 chiffonnets imbibés d'eau peptonée ayant essuyées chacune 10 œufs

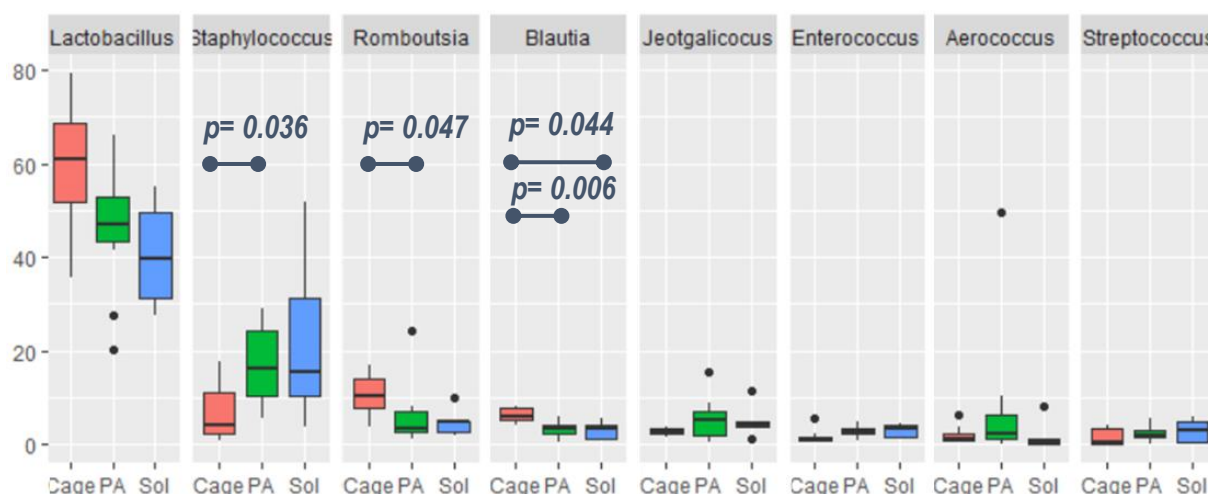


Figure 1. Proportion relative (%) des principaux genres bactériens identifiés à la surface des coquilles d'œufs par système d'élevage. Les p-values du test de Wilcoxon sont indiquées sur la figure pour les différences significatives. (PA : Plein Air)

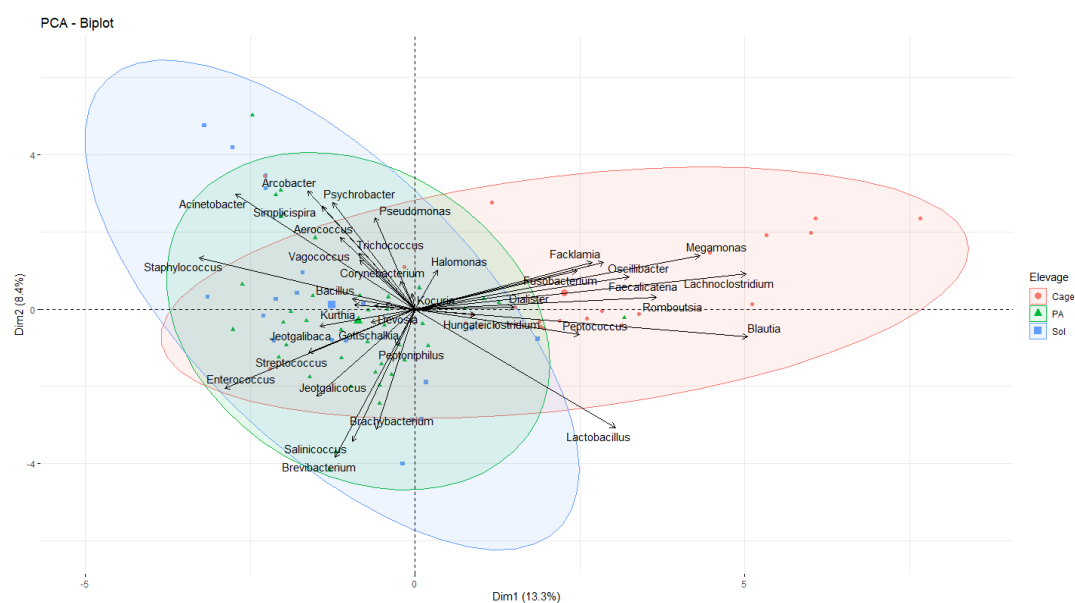


Figure 2. Analyse en composante principale (ACP) réalisée à partir des dix genres bactériens les plus représentés sur chaque lingette analysée. Chaque système d'élevage est représenté par une ellipse colorée et la contribution de chaque genre bactérien est représenté par une flèche. (PA : Plein Air)