

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

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

¹ Université d'Orléans – 45067 Orléans,

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

³ ITAVI- Centre INRA Val de Loire – 37380 Nouzilly

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

⁵ Néovia – 56250 Saint Nolf

thomas.janvier@univ-orleans.fr

RÉSUMÉ

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

ABSTRACT

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

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

INTRODUCTION

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

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

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux

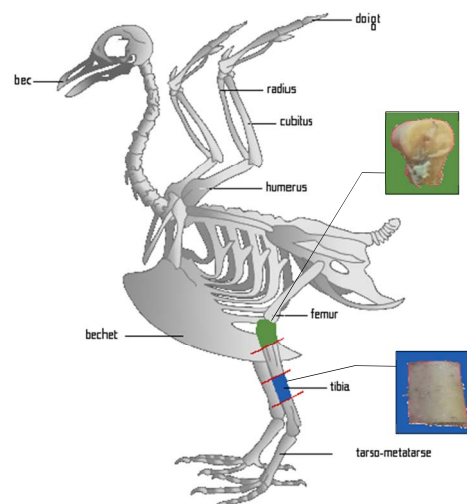
40 individus âgés de 86 à 87 semaines ont été sélectionnés dans une population de 634 poules pondeuses brunes, issues d'un élevage de sélection Novogen. Les poules ont été choisies de façon à constituer 2 groupes similaires en termes de taux de ponte ($\geq 95\%$), mais extrêmes en ce qui concerne les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

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

1.2. Préparation des échantillons

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

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



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

1.3. Acquisitions radiographiques

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

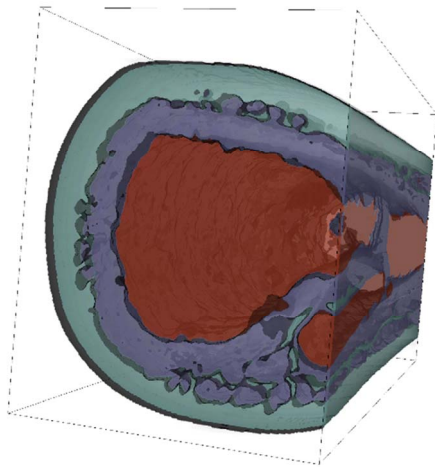
Chaque échantillon, une fois disséqué et fixé (épiphyse/métaphyse et diaphyse), a été imagé sur un

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

1.3. Analyse de la microarchitecture

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

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

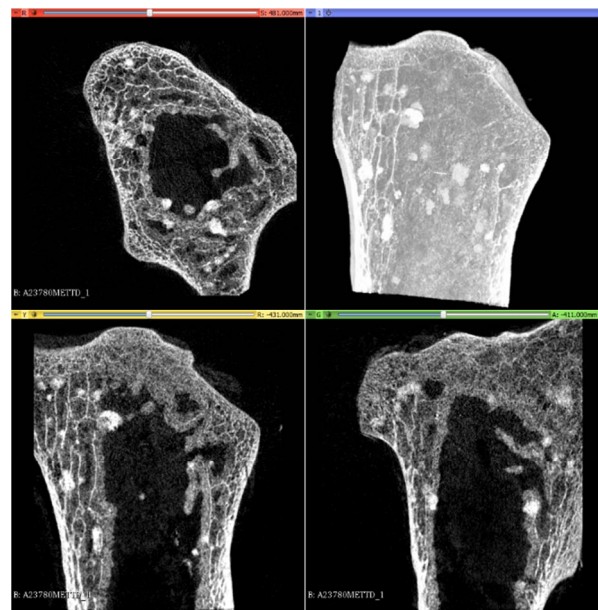


Sur les diaphyses, on distingue clairement trois niveaux d'intensité correspondant à la moelle osseuse de faible densité, à l'os médullaire de densité moyenne et à l'os structurel de haute densité (**Figure 3**). En revanche, cette décomposition à trois niveaux n'a pas été possible sur les épiphyses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

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

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

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



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

2. RESULTATS ET DISCUSSION

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

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

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

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

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

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

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

CONCLUSION

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

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

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

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

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

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

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

REMERCIEMENTS

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

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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