

UNE DOUBLE ENCAPSULATION DE BIOACTIFS REDUIT L'EXCRETION DE *SALMONELLA ENTERITIDIS* CHEZ LE POULET DE CHAIR ARTIFICIELLEMENT CONTAMINÉ

Stéphanie Ladirat¹, Maggie Fisher², Joseph Payne², Adrian Awre²

¹NUQO S.A.S - 13 rue d'Albigny – 74000 Annecy - France

²Ridgeway Research Ltd - adresse - code postal VILLE - Angleterre
Ladirat.Stephanie@nuqo.eu

RÉSUMÉ

Réduire la contamination des poulets de chair par la salmonelle est essentiel pour limiter les risques de zoonoses chez l'homme. Dans cet essai de 35 jours, les effets d'une solution de bioactifs à double encapsulation sur l'excrétion de *Salmonella Enteritidis* ont été étudiés sur des femelles Ross 308 artificiellement contaminées à 14 jours d'âge. La double encapsulation permet un relargage séquentiel des actifs dans l'intestin, à savoir une couche externe d'extraits de plantes et d'algues relargués en premier, et un cœur d'acides encapsulés relargués ensuite. Au jour 1, les poussins ont été placés dans des parquets de démarrage et répartis aléatoirement dans 2 groupes de 40 : un groupe recevant un aliment témoin (NC) et un groupe recevant un aliment supplémenté avec 400g/t de la solution encapsulée (NQ). Au jour 12, 36 poussins de chaque groupe ont été répartis aléatoirement dans 6 cages de 6. Ils ont tous été inoculés au jour 14 avec 10^8 unités formant colonies (UFC) de *S. enteritidis* par gavage oral. Le nombre d'échantillons positifs à la Salmonelle a été déterminé par isolement direct aux jours 13, 21 et 35 sur des prélèvements cloacaux effectués sur 4 animaux par cage. Le nombre d'UFC a été déterminé sur les échantillons négatifs après une nuit d'incubation. Les données ont été analysées avec le logiciel SAS soit avec un test de Fisher's Exact (présence/absence de Salmonelles) soit par ANOVA (UFC), avec un niveau de signification à $P < 0,05$. Un jour avant infection (j13), tous les échantillons étaient exempts de Salmonelle. Sept jours après infection (j21), le groupe NQ avait 29% d'échantillons positifs (7/24) tandis que le témoin avait 63% d'échantillons positifs (15/24), soit une réduction significative de 54% grâce à la solution encapsulée ($P = 0,04$). Au jour 35, le groupe NQ avait encore 56% d'échantillons positifs en moins que le témoin ($P = 0,18$). Les échantillons issus du groupe témoin, positifs à la Salmonelle avaient une moyenne de $8,0 \log_{10}$ UFC/ml tandis que ceux du groupe NQ avaient une moyenne de $5,7 \log_{10}$ UFC/ml, soit réduction de $2,2 \log_{10}$ ($P = 0,07$) au jour 21. Cette étude montre des résultats prometteurs quant à l'utilisation d'une double encapsulation de bioactifs pour réduire les excréments de Salmonelle en élevage.

ABSTRACT

A double encapsulation of bioactives reduces *Salmonella Enteritidis* shedding in artificially infected broiler chickens.

Reducing *Salmonella* contamination of broiler chickens at the farm is essential to limit the risks of zoonoses in humans. In this 35-day trial, the effects of a double-encapsulated bioactive solution on the excretion of *Salmonella Enteritidis* were studied in Ross 308 females artificially infected at 14 days of age. The double encapsulation allows a sequential release of the active ingredients in the small intestine, namely an outer layer of plant and algae extracts released first and a core of encapsulated acids released second. On day 1, the chicks were placed in brooder rings and randomly allocated to 2 groups of 40: a group receiving a control diet (NC) and a group receiving a diet supplemented with 400g/t of the encapsulated solution (NQ). On day 12, 36 chicks of each group were randomly distributed in 6 cages of 6. They were all inoculated on day 14 with 10^8 colony forming units (CFU) of *S. enteritidis* by oral gavage. The number of *Salmonella* positive samples was determined by direct-plating on days 13, 21 and 35 on cloacal samples taken from 4 animals per cage. Any direct plate swab samples that were negative received overnight enrichment allowing CFU to be measured. The data were analysed with the SAS software either with a Fisher's Exact test (presence/absence of *Salmonella*) or by one-way ANOVA ($\log_{10}$ transformed CFU/ml), with a level of significance at $P < 0.05$. One day before infection (d1), all samples were negative for *Salmonella*. Seven days post-infection (j21), the NQ group had 29% positive samples (7/24) while the control had 63% positive samples (15/24), a significant reduction of 54% due to the encapsulated solution ($P = 0.041$). On day 35, the NQ group still had 56% fewer *Salmonella* positive samples than the control group ($P = 0.18$). *Salmonella* positive samples from the control had an average of $8.0 \log_{10}$ CFU/ml while those from the NQ group had an average of $5.7 \log_{10}$ CFU/ml, indicating a trend of $2.2 \log_{10}$ reduction ($P = 0.07$) on day 21. This study shows promising results for the use of the double-encapsulation of bioactives to reduce *Salmonella* excretion in broiler chickens.

INTRODUCTION

La Salmonelle chez la volaille est l'un des agents pathogènes ayant le plus d'impact sur la sécurité alimentaire humaine. En Europe, une stratégie de contrôle de la fourche à la fourchette a été mise en place et implique tous les acteurs de la filière pour réduire les contaminations par Salmonelle. A l'abattoir, les mesures d'hygiène sont nécessaires pour réduire les risques de contamination des carcasses ; cependant, il a été démontré que les conditions en amont de l'abattage constituent aussi des facteurs de risque élevés. Une méta-analyse récente a notamment révélé que les facteurs en amont d'abattage les plus associés à une contamination des produits de volaille étaient le couvoir (48,5%), la litière (25,4%) et les excréments (16,3%) (Wang *et al*, 2023). Ces résultats soulignent le besoin urgent de contrôles en élevage pour réduire la pression Salmonelle au sein de l'animal et ainsi limiter la contamination des produits de volaille frais transformés.

Plusieurs stratégies de contrôle peuvent être mises en place au niveau de l'élevage telles que des mesures de biosécurité et d'hygiène efficaces pour prévenir l'introduction des Salmonelles en élevage. La vaccination ou les approches nutritionnelles permettent de réduire la colonisation et l'excrétion de Salmonelles au niveau de l'animal. Parmi les approches nutritionnelles, les additifs alimentaires sont souvent utilisés pour réduire le risque de contamination de l'aliment par la Salmonelle mais aussi prévenir l'excrétion des salmonelles, renforcer le système immunitaire et/ou améliorer la santé intestinale des animaux (Awad et Ghareeb, 2014). Si la sélection des molécules bioactives est essentielle pour contrôler la Salmonelle, il est aussi important de relarguer ces molécules au bon endroit dans le tube digestif pour optimiser les doses d'utilisation et avoir une efficacité maximale. Récemment, une solution de bioactifs à double encapsulation a été développée. La double encapsulation permet un relargage séquentiel des actifs dans l'intestin, à savoir 1. une couche externe d'extraits de plantes et d'algues relargués en premier, dans le duodénum jéjunum, pour supporter les fonctions digestives et moduler la réponse immunitaire, et 2. un cœur d'acides encapsulés relargués ensuite, au plus près des caeca, pour contrôler la composition du microbiote et réduire les agents pathogènes. Le relargage séquentiel de ces actifs permet d'avoir une action ciblée tout au long du tube digestif pour un support maximal de l'animal. Le but de cette étude est d'évaluer l'efficacité de cette solution de bioactifs à double encapsulation sur l'excrétion de *Salmonella Enteritidis* chez le poulet de chair artificiellement contaminé.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Schéma expérimental

Des poussins de chair femelles Ross 308 ont été élevés sur litière pendant 35 jours. Tous les poussins ont reçu *ad libitum* un aliment de démarrage du jour 1 au jour 12 et un aliment de croissance du jour 13 au jour 35. Au jour 1, les poussins ont été placés dans des parquets de démarrage et répartis aléatoirement dans 2 groupes de 40 : un groupe recevant un aliment témoin (NC) et un groupe recevant un aliment supplémenté avec 400g/t de NUQO®SAFE (NQ), une solution encapsulée composée d'un cœur d'acides organiques encapsulés sur lequel est appliqué une seconde encapsulation d'extraits de plantes et d'algues. Au jour 12, 36 poussins de chaque groupe ont été répartis aléatoirement dans 6 enclos de 6 et ont reçu le même traitement alimentaire que précédemment. Les poussins ont tous été contaminés par gavage oral au jour 14 avec 10^8 unités formant colonies (UFC) de *Salmonella enteritidis* (souche PT8 issue d'oiseaux ne présentant aucun signe clinique).

1.2. Mesures et analyses statistiques

Aux jours 13, 21 et 35, des prélèvements cloacaux ont été effectués par écouvillonnage sur 4 animaux par enclos. Les prélèvements ont été étalés sur des boîtes de pétri avec de l'agar Brilliant green pendant 18-24h à 37°C. L'absence ou la présence d'UFC de *Salmonella* a été notée. Le nombre d'UFC par ml a été déterminé sur les échantillons positifs après une nuit d'incubation dans du bouillon Selenite-F à 37°C. Les données ont été analysées avec le logiciel SAS soit avec un test de Fisher's Exact (présence/absence de Salmonelles) soit par ANOVA (UFC), avec un niveau de signification à $P < 0,05$.

2. RESULTATS

2.1. Prévalence de Salmonelles

Un jour avant infection (j13), tous les échantillons cloacaux étaient négatifs à la Salmonelle. La prévalence de salmonelles aux jours 7 et 21 post-infection sont présentés sur la figure 1. Sept jours après infection (j21), on observait 63% d'échantillons positifs (15/24) pour le groupe témoin NC tandis que le groupe NQ avait 29% d'échantillons positifs (7/24), soit une réduction significative de 54% grâce à la solution encapsulée ($P = 0,04$). Vingt-et-un jours après infection (j35), le témoin avait 38% d'échantillons positifs (9/24) tandis que le groupe NQ avait 16% d'échantillons positifs (4/24), soit encore 56% d'échantillons positifs en moins pour le groupe NQ ($P = 0,18$).

Le suivi individuel des animaux a permis de noter que, parmi les oiseaux positifs au jour 35, une partie était

déjà positive au jour 21 et une partie est devenue positive entre le jour 21 et le jour 35 (« nouveaux positifs »). Il y a eu moins de nouveaux oiseaux positifs dans le groupe NQ que dans le groupe témoin (1 contre 3), ce qui indique une meilleure protection contre les salmonelles non seulement peu de temps après l'infection mais également pendant tout le cycle de production grâce à la solution encapsulée. Ensuite, parmi les oiseaux positifs au jour 21, on peut voir qu'une partie s'est naturellement remise de l'infection (« précédemment positifs »). Le taux de récupération était similaire dans les deux groupes de traitement (~ 60 %). Enfin, il y a eu dans l'ensemble moins d'oiseaux infectés par la salmonelle dans le groupe NQ que dans le témoin avec un taux d'infection total de 33 % pour NQ contre 75 % pour NC.

2.2. Concentration en Salmonelles

La concentration en salmonelles a été évaluée au jour 7 post-infection (j21) sur les échantillons positifs après enrichissement (Figure 2). Les échantillons issus du groupe témoin, positifs à la Salmonelle, avaient une moyenne de $8,0 \log_{10}$ UFC/ml tandis que ceux du groupe NQ avaient une moyenne de $5,7 \log_{10}$ UFC/ml, soit réduction significative de $2,2 \log_{10}$ ($P = 0,07$).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Pour contrôler la pression des Salmonelles en élevage et ainsi réduire la contamination des produits de volaille frais transformés, des stratégies innovantes naturelles sont de plus en plus utilisées mais toutes ne se valent pas selon leur composition en composés actifs

ou leur technologie pour préserver ou relarguer ces composés actifs.

Dans cet essai, une solution à double encapsulation composée d'un cœur d'acides encapsulés et d'une couche externe d'extraits de plantes et d'algues encapsulés (NQ) a été testée chez le poulet de chair artificiellement contaminé au jour 14 d'âge. Les résultats montrent que le groupe NQ a réduit le taux d'infection totale à la Salmonelle à 33% contre 75% dans le témoin. De plus, le nombre d'échantillons positifs à la salmonelle a été réduit de plus de 50% dans le groupe NQ, 7 jours après infection et à l'abattage. Enfin, l'excrétion de Salmonelles a été réduite dans le groupe NQ avec des échantillons positifs qui avaient en moyenne une concentration en salmonelles plus faible de $2,2 \log_{10}$ UFC/ml 7 jour après infection par rapport au témoin. Ces résultats sont conformes avec des études précédentes qui ont montré que des huiles essentielles et des acides organiques pouvaient réduire la pression en Salmonelles (El-Saadony et al, 2023 ; Ruvalcaba-Gomez et al, 2022), surtout si utilisés ensemble (Zhang et al, 2019; Tugnoli et al, 2020). L'avantage de la technologie d'encapsulation a été mis en avant à plusieurs reprises montrant que le relargage précis et ciblé des composés engendrait une action plus efficace au sein de l'animal (Natsir et al, 2017 ; Tugnoli et al, 2020). La solution étudiée à double encapsulation va un cran plus loin en relarguant ces composés actifs à deux endroits distincts dans le tube digestifs.

Les modes d'actions du produit restent à être étudiés plus en détails mais cette étude montre déjà une utilisation possible de cette double encapsulation de bioactifs pour réduire les excréments de Salmonelle en élevage, et ainsi minimiser le risque de contamination de la viande de volaille après abattage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Wang J., Vaddu S., Bhumanapalli S., Mishra A., Applegate T., Singh M, Thippareddi H., (2023). *Poult Sci.*102(5):102566.
- Awad W., Ghareeb K. (2014). *World's Poultry Science Journal*, 70(3), 519-530.
- El-Saadony MT, Salem HM, El-Tahan AM, Abd El-Mageed TA, Soliman SM, Khafaga AF, et al. (2022). *Poult Sci.*101:101716.
- Ruvalcaba-Gomez JM, Villagran Z, Valdez-Alarcon JJ, Martinez-Nunez M, Gomez-Godinez LJ, Ruesga-Gutierrez E, et al. (2022) *Animals* 12:102.
- Zhang S, Shen YR, Wu S, Xiao YQ, He Q, Shi SR. (2019). *Poult Sci.* 98:6349–6355.
- Natsir MH; Hartutik SO; Widodo E; Widyastuti ES (2017) *AIP Conf. Proc.* 1844 (1), 020012
- Tugnoli B, Giovagnoni G, Piva A, Grilli E, (2020). *Animals* 10(1):134.

Figure 1. Prévalence de salmonelles aux jours 7 et 21 post-infection sur des échantillons prélevés dans le cloaque de poulets de chair ayant reçu un aliment témoin (NC) ou une solution naturelle encapsulée (NQ) et ayant été contaminés avec *Salmonella Enteritidis* au jour 14 d'âge. * $P < 0,05$

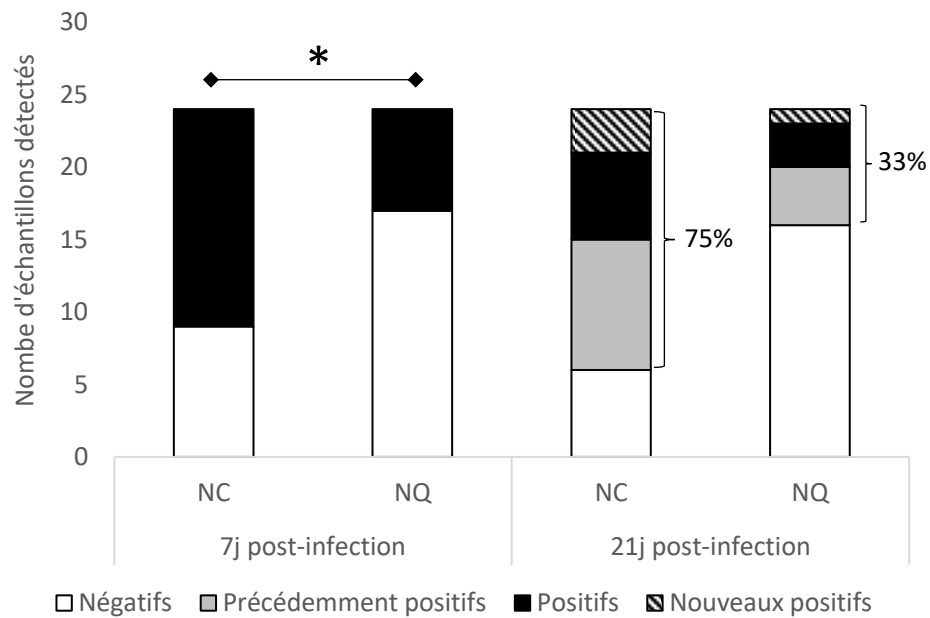


Figure 2. Concentration en Salmonelles (Log_{10} UFC/ml) au jour 7 post-infection après enrichissement d'échantillons prélevés dans le cloaque de poulets de chair ayant reçu un aliment témoin (NC) ou une solution naturelle encapsulée (NQ) et ayant été contaminés avec *Salmonella Enteritidis* au jour 14 d'âge. * $P < 0,05$

