

Université de Montréal

Le transfert de l'écosystème microbien fécal des oiseaux contribue à l'établissement du microbiote de surface des œufs pondus; application aux oiseaux reproducteurs de poulet de chair

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

par Sandrine Trudeau

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)
en sciences vétérinaires option hygiène vétérinaire et innocuité des aliments

Juillet 2019

© Sandrine Trudeau, 2019

Université de Montréal
Département de Pathologie et microbiologie, Faculté de Médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

Le transfert de l'écosystème microbien fécal des oiseaux contribue à l'établissement du microbiote de surface des œufs pondus; application aux oiseaux reproducteurs de poulet de chair

Présenté par

Sandrine Trudeau

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Sylvain Quessy

Président-rapporteur

Philippe Fravalo

Directeur de recherche

Alexandre Thibodeau

Codirecteur

Marie-Lou Gaucher

Codirectrice

Patricia Turgeon

Membre du jury

RÉSUMÉ

Dans la filière avicole de type chair, les bactéries présentes sur la coquille de l'œuf après la ponte sont encore très peu caractérisées, mais elles peuvent avoir des impacts sur la santé du poussin et, ultimement, sur la santé publique. L'objectif de cette étude était de décrire le microbiote fécal des oiseaux reproducteurs de poulet de chair et celui retrouvé à la surface de leurs œufs pondus afin d'évaluer une possible transmission de l'écosystème microbien fécal parental vers la surface de l'œuf. Douze troupeaux d'oiseaux reproducteurs de poulet de chair (Québec, Canada) ont été échantillonnés en deux temps. En utilisant une technologie de séquençage ciblant l'ARN ribosomal 16S des bactéries (la métagénomique 16S), nos analyses ont révélé que la composition et la structure des deux communautés bactériennes étaient significativement différentes ($p < 0.001$). Aussi, le facteur temps (2 périodes d'échantillonnage à intervalle de 4 semaines) et le facteur troupeau (identité du lot d'oiseaux) influençaient significativement ($p < 0.05$) les diversités alpha et beta des microbiotes. Ce sont 1790 unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) qui étaient communes aux fèces et aux coquilles d'œufs et ce, indépendamment du moment d'échantillonnage. Des séquences associées à des genres bactériens potentiellement pathogènes et à celles retrouvées dans les flores d'altération, i.e. *Acinetobacter*, *Campylobacter*, *Escherichia/Shigella*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* et *Staphylococcus*, étaient également partagées entre les deux types d'échantillons. Aussi, certaines OTUs, très représentées dans le microbiote fécal, n'étaient pas présentes à la surface des œufs, suggérant une sélection lors du transfert et/ou une contamination environnementale. À notre connaissance, il s'agit de la première étude s'appuyant sur la métagénomique 16S à décrire la contribution du transfert de l'écosystème microbien fécal des poules reproductrices à l'établissement du microbiote retrouvé à la surface des œufs pondus,

ainsi qu'à caractériser les communautés bactériennes présentes dans les fèces d'oiseaux reproducteurs de poulet de chair et à la surface des œufs pondus.

Mots clés : Transmission bactérienne, microbiote fécal, microbiote à la surface de la coquille de l'œuf, oiseaux reproducteurs de poulet de chair, ARNr 16S, santé animale, santé publique

ABSTRACT

In chicken broiler production, microbial populations present on the surface of the eggshell after laying are still poorly characterized, though they may significantly impact poultry and public health. The aim of this study was to describe the microbiota of both broiler breeder hens' feces and of the surface of the eggs laid by these birds in order to evaluate the transfer of the parental fecal microbial ecosystem to the surface of laid eggs. Twelve breeder flocks in Québec, Canada were sampled at two different times. Using 16S metagenomic, we showed that the bacterial community composition and structures of both microbiomes differ ($p < 0.001$). We also showed that both the sampling time and the flock identity were significantly ($p < 0.05$) influencing both the alpha and beta-diversity of the studied microbiomes. Results revealed 1790 operational taxonomic units (OTUs) shared between feces and eggshell samples and this, regardless of the sampling time. Sequences associated with genera of potentially pathogenic or spoilage bacteria such as *Acinetobacter*, *Campylobacter*, *Escherichia/Shigella*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* and *Staphylococcus* were shared between both sample types. Interestingly some OTUs highly represented in the fecal microbiota were not present on the egg surface, suggesting a selection during microbiota transfer and/or an environmental contamination. To our knowledge, this is the first study using 16S rRNA sequencing to describe the contribution of the transfer from the laying hens fecal microbial ecosystem to the establishment of the microbiota on the surface of laid eggs, as well as the bacterial communities at both the broiler breeder feces and the eggshell levels.

Keywords: Bacterial transmission, fecal microbiota, eggshell microbiota, broiler breeders, 16S rRNA, animal health, public health.

Table des matières

<i>RÉSUMÉ</i>	3
<i>ABSTRACT</i>	5
<i>TABLE DES MATIÈRES</i>	6
<i>LISTE DES TABLEAUX</i>	8
<i>LISTE DES FIGURES</i>	9
<i>LISTE DES SIGLES</i>	10
<i>LISTE DES ABRÉVIATIONS</i>	11
<i>REMERCIEMENTS</i>	14
<i>1. INTRODUCTION</i>	15
<i>2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE</i>	20
2.1 Production de poulet	21
2.1.1 Aperçu du portrait de l'industrie des producteurs de poulet du Canada	21
2.1.2 Pyramide de la filière avicole chair	23
2.1.3 Le soin et la manipulation des oiseaux reproducteurs de poulet de chair	25
2.1.4 Norme nationale de biosécurité pour les fermes avicoles	27
2.2 Production des œufs d'incubation	30
2.2.1 Aperçu du portrait de l'industrie des producteurs d'œufs d'incubation du Canada	30
2.2.2 La formation de l'œuf	33
2.2.3 La contamination de l'œuf : l'exemple de <i>Salmonella</i> Enteritidis	35
2.2.4 Le système de défense de l'œuf	36
2.3 Le microbiote	38
2.3.1 Le microbiote intestinal de la poule	39
2.3.2 Le microbiote fécal de la poule	42
2.3.3 Le microbiote à la surface des coquilles d'œufs	46
2.3.4 Liaison entre les microbiotes fécal et de surface d'œufs	51
2.4 Méthodes d'étude du microbiote	56
2.4.1 Méthodes basées sur la biologie moléculaire	56
2.4.2 Métagénomique 16S	57
<i>3. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS</i>	63
<i>4. ARTICLE SCIENTIFIQUE</i>	65
4.1 Abstract	67
4.2 Introduction	69
4.3 Materials and methods	72
4.4 Results	77
4.5 Discussion	83

4.6 Conclusions.....	90
Tables	92
5. <i>DISCUSSION GÉNÉRALE</i>	108
5.1 Interprétation des résultats	109
5.2 Aspects innovateurs.....	116
5.3 Limites de l'étude.....	117
5.4 Perspectives.....	120
6. <i>CONCLUSION</i>	123
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	127

LISTE DES TABLEAUX

Revue de la littérature

Tableau I. Exemples de mesures de biosécurité sur les fermes avicoles	15
Tableau II. Exemples de bonnes pratiques de production (BPP)	17

Article scientifique

Table 1. Data on potential pathogens and spoilage bacteria found in the feces and on the eggshells	86
Table 2. Comparison of alpha-diversity indices of feces and eggshells across broiler breeder flocks according to the time and the flock. The means were based on 1000 subsampling of 546 and 39,680 sequences for the eggshells and the feces, respectively.....	87
Table 3. Microbiota structure comparison of feces and eggshells across broiler breeder flocks according to the time and the flock.....	88
Table 4. Percentage of flocks for which genus sequences were detected on both eggshells and feces samples, and for which genus sequence were detected on the eggshells, but that were found to be absent in feces	89

Supplementary materials

Table S1. Information on the broiler breeder flocks.....	98
Table S2. Total phyla and families found in the samples	99-100
Table S3. Microbiota structure comparison of feces and eggshells across broiler breeder flocks according to the flock.....	101

LISTE DES FIGURES

Revue de littérature

Figure I. L'organisation pyramidale de la filière avicole chair	11
Figure II. Schéma représentant la structure de l'œuf.....	20
Figure III. La composition du microbiote de la poule, du jabot aux fèces.....	26
Figure IV Schéma représentant les phyla majoritaires présents dans les fèces de poules	29
Figure V. Schéma représentant les phyla majoritaires présents à la surface des coquilles d'œufs de poules selon le type de logement.....	35
Figure VI. Schéma des principales étapes d'une étude de métagénomique 16S.....	53

Article scientifique

Figure 1. Stacked bar chart illustrating the relative abundance (>1% at the phylum level) of feces and eggshell samples, and according to Silva and RDP databases.....	91
Figure 2. Stacked bar chart illustrating the relative abundance (>1% at the family level) of feces and eggshell samples, and according to Silva and RDP databases.....	92
Figure 3. Examples of the 2 dimensions NMDS plot using Jaccard distances matrices to compare A) broiler breeder fecal microbiota beta-diversity according to the time of sampling, B) eggshell microbiota beta-diversity according to the time of sampling, and C) overall microbiota according to the sample type.	93-95
Figure 4. Comparison of the broiler breeder fecal microbiota and eggshell microbiota using LEfSe. Histogram of the LDA scores for significantly differentially abundant biomarkers among groups (LDA Score [\log_{10}] > 4). Red = Feces and Blue = Eggshells.....	96
Figure 5. Comparison of the shared OTUs by groups using a Venn diagram. The groups compared were: i) eggshells at Day 0 of the study; ii) eggshells 4 weeks after; iii) feces at Day 0 of the study; iv) and feces 4 weeks after.	97

LISTE DES SIGLES

CRSNG	Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada
CRIBIQ	Consortium de recherche et innovations en bioprocédés industriels au Québec
CRSV	Chaire de recherche en salubrité des viandes
POIC	Producteurs d'œufs d'incubation du Canada

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMOVA	« Analysis of MOlecular VAriance »
AmpC	Adénosine monophosphate cyclique
APEC	« Avian Pathogenic <i>E. coli</i> »
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
<i>bla</i>	Gène de résistance aux β -lactamines codant pour une BLSEs
BLSEs	β -lactamases à spectre étendu
BPP	Bonnes pratiques de production
CTX-M	Phénotype d'une BLSEs
DT104	« Definitive phage type 104 »
ExPEC	« Extraintestinal pathogenic <i>Escherichia coli</i> »
GIT	Tractus gastro-intestinal
HACCP	« Hazard Analysis Critical Control Point »
HRM	« High Resolution melt »
LDA	« Linear discriminant analysis »
LEfSe	« Linear discriminant analysis Effect Size »
MADO	Maladie à déclaration obligatoire
NCBI	« National Center for Biotechnology Information »
NMDS	« Non-metric multidimensional scaling »
OTU	Unité taxonomique opérationnelle
PBS	« Phosphate buffered saline »
PCR	« Polymerase chain reaction »

PFGE	« Pulsed-field Gel Electrophoresis »
PIB	Produit intérieur brut
PCQOI	Programme canadien pour la qualité des œufs
PT4	Phage de type 4
RDP	« Ribosomal Database Project »
SPI	« <i>Salmonella</i> Pathogenicity Island »
TEM	Phénotype d'une BLSEs
TGI	Tractus gastro-intestinal
UFC	Unité Formant des Colonies

À mon fiancé qui a su m'épauler durant cette étape importante de ma vie

~ Every Cloud has a Silver Lining ~

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Philippe Fravallo, pour m'avoir permis de réaliser ce superbe projet de maîtrise. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir supportée malgré les obstacles. Merci pour tes précieux conseils.

Merci à mon codirecteur, Dr Alexandre Thibodeau, pour m'avoir appuyée tout au long de ce projet. Merci pour ton temps et ta patience avec toutes ces analyses statistiques.

Merci à ma codirectrice Dre Marie-Lou Gaucher, pour m'avoir également supportée pour la réalisation de ce projet. Ta passion pour la recherche m'a donné le goût de voir plus loin et de ne jamais abandonner.

Merci à toute l'équipe de la Chaire de recherche en salubrité des viandes (CRSV) pour votre aide au laboratoire et vos conseils.

Merci à la Coop fédérée pour l'accueil dans les fermes échantillonnées.

Merci à Jefe Inc., le CRSNG et le CRIBIQ pour leur contribution financière au projet.

Merci aux membres de mon comité-conseil et aux membres du jury d'évaluation de ce mémoire de maîtrise.

Merci à ma famille et mes amies de m'avoir encouragée durant ces deux années.

Merci à mes deux boules d'amour, Gustave et Margot, de m'avoir accompagnée tout au long de la rédaction de ce mémoire, la maison aurait été bien trop silencieuse sans toutes vos bêtises <3

Merci à l'homme de ma vie de m'avoir supportée tout au long de ce projet, de m'avoir encouragée et d'avoir cru en moi. En fait, merci pour TOUT <3

1. INTRODUCTION

La viande de volaille est non seulement une source importante de protéines, de vitamines et de minéraux de haute qualité, mais c'est également le produit carné le plus maigre et le plus abordable disponible dans le monde. Tout ceci soutient la valeur économique de cette denrée (Hou *et al*, 2016). Conséquemment, l'industrie du poulet de chair s'est considérablement développée au cours des dernières décennies (Leeson *et al*, 2005). Cependant, les poulets jouent un rôle important en tant que réservoirs contribuant à la transmission d'agents pathogènes d'origine alimentaire (Kaakoush *et al*, 2014). Récemment, une méta-analyse européenne sur la prévalence des agents pathogènes dans la viande de volaille a révélé que *Campylobacter* avait la prévalence la plus élevée avec 48,6%, suivie de *Staphylococcus aureus* avec 39,9%, de *Listeria monocytogenes* avec 21% et de *Salmonella spp.* avec 3.2% (Gonçalves-Tenorio *et al*, 2018).

L'environnement intestinal des volailles peut être colonisé par ces bactéries pathogènes, mais aussi par de nombreuses populations de micro-organismes, incluant des bactéries transitoires et des bactéries commensales (Videnska *et al*, 2013), formant ainsi le microbiote intestinal. La relation symbiotique hôte-bactéries dans le tractus gastro-intestinal (TGI) est primordiale pour la croissance et la santé de l'hôte (Apajalahti *et al*, 2004). Grâce à l'arrivée des méthodes dites « culture-indépendantes », comme l'approche métagénomique 16S, le microbiote intestinal aviaire est de mieux en mieux caractérisé (Zhu *et al*, 2002). Le gène codant pour l'ARN ribosomal (ARNr) 16S est présent dans la sous-unité ribosomique 30S de tous les procaryotes et est ubiquitaire, ce qui fait de ce dernier un marqueur de choix pour étudier des populations de micro-organismes, comme celles habitant dans le tube digestif des animaux (Deusch *et al*, 2014).

Dans la production de poulets de chair, des études sur le microbiote ont été menées principalement au niveau de l'élevage, donc chez les poulets de chair, plutôt qu'au niveau de l'amont de la production, soit chez les oiseaux reproducteurs. De plus, ces études se sont concentrées principalement sur la caractérisation des différents segments du TGI de ces oiseaux (Zhu *et al*, 2002; Lu *et al*, 2003; Gong *et al*, 2006); alors que quelques-unes seulement ont inclus l'étude des fèces (Kaakoush *et al*, 2014; Videnska *et al*, 2014; Pauwels *et al*, 2015; Hou *et al*, 2016). Il a été rapporté que de nombreux facteurs influençaient la composition du microbiote intestinal aviaire, notamment l'âge (Knarreborg *et al*, 2002; Videnska *et al*, 2013). L'effet de l'âge a été démontré chez des poulets de chair entre eux (Knarreborg *et al*, 2002), mais aussi entre des poulettes (oiseaux en croissance) et des poules adultes (oiseaux en ponte) (Videnska *et al*, 2013). Cet effet n'a toutefois pas été démontré chez des poules en cours de ponte à différents âges. Plusieurs études ont prouvé que des bactéries pathogènes du poulet, mais aussi des bactéries responsables de toxiinfections alimentaires, lorsqu'elles se retrouvent sur la surface des coquilles d'œufs peuvent infecter les poussins éclos, pouvant ainsi potentiellement affecter la santé du poulet tout au long de sa croissance et, ultimement, augmenter le risque sanitaire pour les produits carnés dérivés de ces poulets (Glávits *et al*, 1984; Cox *et al*, 1997a; Forgetta *et al*, 2011; Poulsen *et al*, 2017). Dans ce contexte, caractériser la composition et la diversité des communautés bactériennes présentes plus haut dans la pyramide de production de poulets de chair à l'aide d'approches moléculaires pourrait aider à mieux gérer les risques pour la santé animale, mais aussi ultérieurement pour la santé publique, associés à la transmission de ces populations bactériennes.

Juste après la ponte, la température de l'œuf, jusqu'à présent de 42°C dans le système reproducteur de la poule, chute brutalement puisque l'œuf se retrouve dans un environnement extérieur plus froid. Ceci engendre ainsi une pression négative qui augmente les chances pour les bactéries présentes à la surface de la coquille de l'œuf de pénétrer à travers la coquille et de contaminer le contenu de l'œuf (Gantois *et al*, 2009). Plusieurs études ont montré que la présence de contamination à la surface de la coquille pouvait être attribuée à divers facteurs environnementaux tels que le type d'élevage des oiseaux (Jones *et al*, 2016), le taux de ponte (Chemaly *et al*, 2009), l'aliment, l'eau, les matières fécales, la poussière (Im *et al*, 2015), la litière (Quarles *et al*, 1970), le duvet (Sivaramalingam *et al*, 2013) et l'état de la cuticule de l'œuf (Sparks *et al*, 1985). Des études ont aussi montré que la matière organique humide faciliterait la survie, voire même la croissance de certaines bactéries pathogènes (Gantois *et al*, 2009). Les communautés microbiennes fécales des poules reproductrices de poulet de chair représentent les premières bactéries rencontrées par l'œuf durant et après la ponte. Toutefois, la contribution de ces micro-organismes à l'établissement du microbiote retrouvé à la surface de l'œuf reste encore majoritairement inconnue.

Les communautés bactériennes présentes à la surface de la coquille d'œuf sont encore très mal caractérisées, bien qu'elles soient les premières bactéries rencontrées par les poussins après l'éclosion. La majorité des données disponibles sur les communautés bactériennes présentes à la surface de la coquille de l'œuf proviennent principalement d'études menées sur des œufs destinés à la consommation humaine et les résultats ont été obtenus à l'aide de méthodes reposant sur la bactériologie classique. Les seules études utilisant le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S ont été menées sur des coquilles d'œufs d'oiseaux sauvages

(Shawkey *et al*, 2009; Lee *et al*, 2014; van Veelen *et al*, 2017) dont l'une a été menée sur les œufs de poules pondeuses (Neira *et al*, 2017). De plus, ces études n'ont pas pu documenter la diversité inter-troupeaux, la diversité à travers le temps, ni fournir des données propres aux premiers maillons de la chaîne de production de poulets de chair.

En réponse à ces défis, les objectifs du présent projet étaient de décrire l'écosystème microbien fécal des oiseaux reproducteurs de poulet de chair et le microbiote retrouvé à la surface des œufs pondus, afin d'évaluer le transfert du microbiote fécal parental vers la surface de ces mêmes œufs.

2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE

2.1 Production de poulet

La production mondiale annuelle de viande de poulet de chair est passée de 41 millions à 68 millions de tonnes entre 1993 et 2005. Durant ces mêmes années, en Amérique du Nord, la production de viande de poulet est passée de 13 millions à 21 millions de tonnes (Leeson and Summers, 2005). Les plus gros producteurs mondiaux de poulet sont les États-Unis, la Chine, l'Union Européenne et le Brésil. Ces derniers ont produit à eux seuls 61% de la production mondiale de poulet en 2005. Cette même année, le Canada se classait au 13^e rang avec une production représentant 1.4% (Diarra *et al*, 2014).

2.1.1 Aperçu du portrait de l'industrie des producteurs de poulet du Canada

Les producteurs de poulet du Canada, un organisme créé en 1978, comptait en 2017, 2 735 producteurs, dont 744 au Québec, 182 usines de transformations, dont 47 usines sous inspection fédérale et 135 usines faisant l'objet d'une inspection provinciale. Cette même année, la consommation de poulet a été partagée entre les divers secteurs du marché, avec les achats au détail représentant 59%, la restauration rapide 24%, la restauration service complet 12%, ainsi que les hôtels et institutions 5% (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2018) et la contribution de l'industrie avicole canadienne au produit intérieur brut (PIB) du pays a été de 6,8 milliards de dollars (Les Producteurs de poulet du Canada, 2018).

En plus d'être une protéine maigre et saine, le poulet est depuis plusieurs années la protéine animale la plus populaire au Canada. En 2017, les canadiens ont consommé 33,1 kg de poulet/habitant, devançant de loin le bœuf avec 24,6 kg/habitant et le porc avec 21,0 kg/habitant

(Les Producteurs de poulet du Canada, 2018). Le poulet doit en partie sa popularité à son prix concurrentiel qui peut être jusqu'à 50% moindre que celui de la viande de porc et ne représenter que le quart du prix des produits de bœuf. Le coût de production dépend bien sûr de plusieurs facteurs, l'un des plus importants étant l'alimentation des animaux. La production de soja et de maïs étant en hausse, il y a une plus grande disponibilité de ces intrants, abaissant ainsi les coûts de production et par le fait même les prix de vente. Pour l'année 2017, les producteurs canadiens de poulet ont produit un volume de 1 203,7 Mkg de viande et le Québec a été la deuxième province ayant été la plus productrice avec 328,2 Mkg, juste derrière l'Ontario avec 401,3 Mkg (Les Producteurs de poulet du Canada, 2018). Il est intéressant de souligner que plus de 60% de la production canadienne provenait de ces deux provinces (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2018b).

L'organisme des Producteurs de poulet du Canada est muni d'un système de gestion de l'offre qui a pour but de s'assurer que les allocations de contingents provinciaux soient respectées afin que chaque province produise un volume de poulet préalablement établi, incluant le commerce interprovincial. En d'autres termes, ce système s'assure que la production de poulets réponde à la demande du marché. Les allocations étaient très élevées en 2017, atteignant pratiquement la capacité maximale de production pour certains éleveurs et rendant l'utilisation de la totalité du contingent plus difficile. Les importations de poulets en 2017 au Canada ont été de 85,0 Mkg. La majorité des poulets provenaient des États-Unis, suivis du Brésil et de la Thaïlande. Cette même année, les exportations de poulets ont été de 134,1 Mkg. Des 44 pays importateurs, les plus importants étaient les États-Unis, les Philippines et Taïwan, suivis par Hong Kong, l'Afrique du Sud, Cuba et la Jamaïque (Agriculture et Agroalimentaire Canada,

2018b). En ce qui a trait au commerce interprovincial, le Québec était le deuxième plus grand exportateur et importateur de poulets vivants après l'Alberta et le Nouveau-Brunswick, respectivement.

Les Producteurs de poulet du Canada fixent annuellement leurs priorités de recherche. Pour 2017, ces priorités visaient 1) la réduction de l'utilisation des antibiotiques et l'élimination de l'usage préventif des antibiotiques, 2) la recherche pour les soins des animaux et 3) la recherche pour la réduction des agents pathogènes à la ferme et au lieu de transformation. Les Producteurs de poulet du Canada font d'ailleurs partie d'un groupe de travail sur le contrôle de *Salmonella* et de *Campylobacter* dans la volaille qui regroupe « l'Initiative de réduction des agents pathogènes » et « le Groupe de travail sur *Salmonella* Enteritidis ».

2.1.2 Pyramide de la filière avicole chair

L'organisation pyramidale complète des filières avicoles, comme la filière de type chair, est généralement établie comme suit (Figure 1). Au sommet de la pyramide, on retrouve les élevages pedigree correspondant aux ancêtres de la race pure ayant été minutieusement sélectionnés lors des contrôles aux nids-trappes. Le principe des nids-trappes ou pondoirs-trappes est que lorsque la poule entre dans le nid pour pondre, une porte se referme derrière elle afin que chaque œuf pondu soit associé à la bonne poule pondeuse à l'aide d'un numéro se retrouvant à la fois sur une étiquette pour l'œuf et sur une bague d'aile pour la poule. Ce suivi rigoureux permet, sur une longue période, de noter plusieurs données importantes comme le taux de ponte, la longueur de la période de ponte, la grosseur des œufs, l'état des coquilles et le taux d'éclosion (Ministère fédéral de l'agriculture, 1949). Ces poules produisent les arrières

grands-parentaux représentant un élevage qualifié de facultatif. Ensuite, ces poules produisent les grands-parentaux. C'est à cet étage de la pyramide que se dessine la structure organisationnelle des filières avicoles au Canada. En fait, on compte un seul troupeau d'oiseaux qualifiés de grands-parentaux au pays; il s'agit de poules pondeuses commerciales de race Lohmann et le troupeau se situe en Ontario (Hébert, 2017). Pour la filière avicole de type chair, le Canada ne possède pas de troupeaux de grands-parentaux; son organisation canadienne débute avec les troupeaux de parentaux; étage de la pyramide où la multiplication a lieu (Guémené, 2014). Pour ce qui est des troupeaux d'oiseaux reproducteurs de poulet de chair, on compte environ 4 000 à 6 000 têtes part lot et ces derniers pondent des œufs sur une période d'environ 35 à 40 semaines (Producteurs de poulet du Canada, 2019a). Les oiseaux destinés aux parquets de reproduction doivent être choisis rigoureusement et doivent préférablement provenir d'une lignée améliorée. Dans ce cas-ci, les lignées mâles doivent être différentes de celles des femelles. Les oiseaux sélectionnés à ce stade doivent être parfaits autant au niveau de leur grosseur, que de leur couleur et autres standards propres à la race (Ministère fédéral de l'agriculture, 1949). Les œufs pondus par les oiseaux reproducteurs sont dirigés vers un couvoir et sont incubés durant 18 à 21 jours, à la suite de quoi, des poussins vont éclore (Producteurs de poulet du Canada, 2019b). Si les œufs issus des oiseaux reproducteurs sont insalubres ou infectés, ils sont plutôt dirigés vers la filière de ponte pour être pasteurisés puis transformés. Une fois les poussins éclos, ceux-ci sont transférés vers une ferme d'élevage où ils y resteront durant environ 35 jours, pour ensuite transiter vers l'abattoir avant d'être mis en marché sous forme de viande destinées aux consommateurs (Producteurs de poulet du Canada, 2019b). Dans le présent projet de recherche, ce sont les troupeaux de parentaux associés à la filière avicole chair (étage de la multiplication) auxquels nous allons nous intéresser.

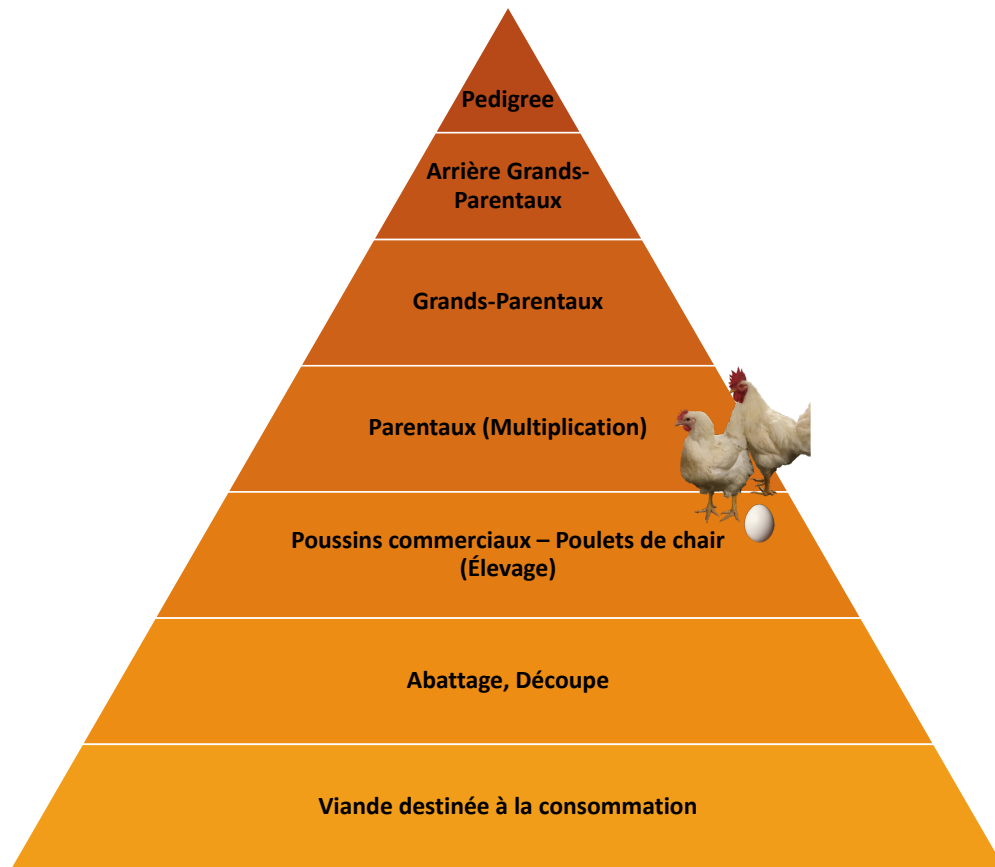


Figure I. L'organisation pyramidale de la filière avicole chair.

2.1.3 Le soin et la manipulation des oiseaux reproducteurs de poulet de chair

Les bonnes pratiques recommandées pour le soin et la manipulation des oiseaux reproducteurs dans la filière chair sont mises en place afin d'optimiser les capacités de production tout en respectant la santé et le bien-être animal. En effet, depuis plusieurs années, la manipulation et le contrôle des lignées génétiques, ainsi que d'autres facteurs environnementaux ont permis d'augmenter considérablement la production des poulets de chair ce qui entraîne toutefois des défis en termes de bien-être animal, en partie reliés à la croissance accélérée des oiseaux.

Les poules et les coqs sont élevés séparément puisqu'ils n'atteignent pas la maturité sexuelle et la taille corporelle voulues exactement au même âge. Arrivé à maturité, ces oiseaux sont élevés en enclos mixtes de femelles et de mâles. Le ratio poule/coq est primordial afin d'assurer une reproduction optimale et d'établir une hiérarchie stable afin d'éviter aux oiseaux un stress qui pourrait se traduire par des problèmes comportementaux. Habituellement, les coqs doivent représenter entre 6 et 10% du troupeau, mais cela varie en fonction de l'âge du troupeau; le ratio tend à diminuer avec l'âge. Des coqs d'appoint peuvent être incorporés dans le troupeau lors de la période de ponte afin de favoriser une meilleure fertilité, une pratique que l'on nomme « spiking ». La densité maximale d'oiseaux sur un même parquet est de 34kg/m² et afin d'améliorer la productivité, un système d'éclairage séparant artificiellement le jour et la nuit, est mis en place, ce qui permet également de réduire le picage des plumes (oiseau qui arrache les plumes d'un congénère avec son bec) et de favoriser une bonne santé globale des oiseaux. L'éclairage, la ventilation, la disposition des nids (facilité d'accès, inclinaison et hauteur des rampes d'accès, position par rapport aux autres installations) et le ratio poules/nids (recommandation de 4 à 7 oiseaux/nid) sont quant à eux tous des facteurs influençant l'utilisation des nids, et donc la production des œufs. Comme les oiseaux reproducteurs sont sélectionnés génétiquement pour leur ratio de conversion alimentaire élevé, l'accès à l'eau et à la moulée leur est parfois restreint afin d'éviter une croissance trop rapide et une prise de poids excédentaire qui pourrait diminuer leur taux de ponte (CNSAE, 2016).

Finalement, la surveillance constante de la santé des oiseaux par le relevé des données d'élevage est essentielle afin de suivre le comportement des oiseaux (répartition des oiseaux dans le poulailler, quantité d'eau et de moulée consommée, taux de ponte) et leur état (plumage,

respiration, capacité à se lever, boiteries, blessés, malades, morts) de façon générale. Les oiseaux morts doivent être retirés chaque jour et le tout est noté dans un registre prévu à cet effet. Si la présence d'une maladie dans le troupeau est suspectée, il est nécessaire de consulter un vétérinaire et de soumettre des échantillons (oiseaux, eau, moulée, litière, air ou autres) afin d'effectuer une analyse plus approfondie. Des procédures de nettoyage et d'assainissement des équipements et des lieux doivent également être exécutées de façon régulière afin d'éviter l'accumulation de matières organiques qui pourraient réduire la qualité de l'air et favoriser la multiplication d'agents potentiellement pathogènes (CNSAE, 2016). En fait, plusieurs mesures peuvent être mises en place afin de prévenir l'introduction et la multiplication d'agents pathogènes au sein d'un troupeau. Parmi celles-ci, la mise en place de protocoles de vaccination et de lutte contre les parasites ou de lutte contre les animaux ravageurs/nuisibles est suggérée. La mesure la plus importante reste l'application stricte de mesures de biosécurité.

2.1.4 Norme nationale de biosécurité pour les fermes avicoles

La Norme nationale de biosécurité pour les fermes avicoles correspond à une série de mesures de biosécurité que peuvent appliquer volontairement les propriétaires de productions avicoles au Canada. Chaque ferme est donc responsable de développer et de mettre en place un plan de biosécurité qui lui est propre et de sa bonne mise en application.

Le terme biosécurité désigne « les mesures requises pour se protéger contre l'introduction et la propagation des maladies infectieuses » (Agence Canadienne d'Inspection des Aliments, 2018). En d'autres mots, les producteurs doivent prendre tous les moyens nécessaires afin d'éviter l'introduction d'agents pathogènes dans un bâtiment et ainsi la

contamination du troupeau (principe de l'exclusion). Si un troupeau est infecté, l'objectif est alors d'éviter que l'agent pathogène ne se propage dans les autres troupeaux de la ferme le cas échéant (principe du confinement). Selon l'agent pathogène, les oiseaux infectés ne vont pas nécessairement montrer de signes cliniques. On dit alors qu'ils sont des porteurs asymptomatiques. Ces derniers peuvent par contre contaminer l'environnement ou leurs congénères par le biais de leurs excréments ou déjections. Les micro-organismes présents dans les aérosols peuvent aussi contaminer les équipements, les pneus, les vêtements et les chaussures des travailleurs, augmentant ainsi le risque de transmission vers d'autres troupeaux.

Afin d'éviter une telle situation, il est primordial que les éleveurs établissent un plan de biosécurité efficace adapté aux risques pour leur exploitation. Ceci implique une évaluation continue du risque, en identifiant et en caractérisant les dangers (biologiques ici), en caractérisant et en évaluant les conséquences de l'exposition pour l'élevage et finalement, en caractérisant le risque. La mise en place des mesures de biosécurité afin de gérer les risques associés aux dangers identifiés (e.g. des agents pathogènes ou des animaux indésirables) et un suivi de l'application des mesures établies afin de prévenir et de contrôler ces dangers font aussi partie intégrante d'un programme efficace. Au Canada, les nombreuses éclosions de maladies d'origines aviaires, comme l'influenza aviaire en Colombie-Britannique en 2014 (Agence Canadienne d'Inspection des Aliments, 2017a) et en Ontario en 2015 (Agence Canadienne d'Inspection des Aliments, 2017b), démontrent qu'une gestion inadéquate des risques tout au long de la chaîne de production peut avoir d'importantes conséquences, non seulement sur l'économie du pays, mais également sur la santé publique (Agence Canadienne d'Inspection des

Aliments, 2018). Voici des exemples de mesures de biosécurité recommandées sur les fermes avicoles.

Mesures de biosécurité sur les fermes avicoles	
1.	Créer une zone d'accès contrôlé et une zone d'accès restreint où sont hébergés les oiseaux afin de limiter la propagation des maladies.
2.	Augmenter la surveillance des oiseaux à la suite d'un évènement représentant un risque plus élevé (ex : la visite d'intervenants, l'arrivée de nouveaux oiseaux, l'arrivée de nouveaux équipements, lors d'éclosions locales, etc.).
3.	Retirer immédiatement les oiseaux morts afin d'éviter la contamination des autres oiseaux ou du bâtiment.
4.	Gérer les bâtiments selon le principe « tout plein/tout vide » (ne pas avoir des troupeaux avec des oiseaux de différents âges) afin de rendre plus efficace le nettoyage et la désinfection.
5.	Faire un vide sanitaire d'au moins 14 jours entre les troupeaux afin de diminuer la présence d'agents pathogènes.
6.	Avoir des procédures d'hygiène sévères et obligatoires pour les personnes qui entrent en contact avec les oiseaux.
7.	Avoir un bon programme de nettoyage des installations et des équipements avant l'arrivée d'un nouveau troupeau.
8.	Avoir un bon programme d'assainissement des locaux, des bâtiments, des équipements et des véhicules qui entrent sur le site.
9.	Restreindre le personnel ou les intervenants qui doivent entrer dans les bâtiments où sont logés les oiseaux.
10.	Si une personne doit entrer dans plusieurs bâtiments, établir un ordre de visite allant des oiseaux les plus jeunes aux plus âgés et des plus sains aux plus malades.
11.	Éviter d'aller sur différents sites de production pendant une même journée.
12.	Faire l'installation de douches à l'entrée et à la sortie des bâtiments et exiger un changement complet de vêtements.
13.	Mettre des vêtements et des gants propres avant de manipuler des oiseaux.
14.	Mettre des couvre-bottes ou des bottes propres à l'entrée de chaque bâtiment.

Tableau I. Exemples de mesures de biosécurité sur les fermes avicoles (CNSAE, 2016; Agence Canadienne d'Inspection des Aliments, 2018).

2.2 Production des œufs d'incubation

2.2.1 Aperçu du portrait de l'industrie des producteurs d'œufs d'incubation du Canada

En 2017, le Canada comptait 241 producteurs d'œufs d'incubation de poulets de chair, dont la grande majorité (>90%) étaient membres des Producteurs d'œufs d'incubation du Canada (POIC). Une quarantaine de couvoir incubant ces œufs étaient aussi dénombrés. Pour cette même année, les plus gros producteurs d'œufs destinés à l'incubation étaient le Québec et l'Ontario. Au total, plus de 905 millions d'œufs de poussins à chair ont été incubés et le prix moyen de ces poussins était 54 ¢ l'unité. Toujours en 2017, les exportations s'élevaient à près de 40 millions d'œufs d'incubation réparties dans 22 pays et totalisant près de 70 millions de dollars. Le plus gros importateur était les États-Unis, suivis par la Russie, la Turquie et la Pologne (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2018a).

Les producteurs d'œufs d'incubation de poulets de chair du Canada ont mis sur pied un programme volontaire afin de maintenir la confiance des consommateurs en matière de salubrité des aliments « de la ferme à la table » et ceci grâce à leurs bonnes pratiques de production (BPP). Ce programme a pour nom « Programme canadien pour la qualité des œufs d'incubation (PCQOI^{MC}) ». Ce programme national est fondé sur les principes de l'analyse des dangers et la maîtrise des points critiques ou « Hazard Analysis Critical Control Point » (HACCP), lesquels sont reconnus internationalement. Le PCQOI^{MC} comprend trois points de contrôles critiques. Le premier concerne l'utilisation des médicaments : il ne doit pas y avoir de résidus médicamenteux dans les œufs non aptes à l'incubation destinés à la consommation humaine, ni y avoir de résidus médicamenteux dans la viande issue de l'abattage des oiseaux reproducteurs de poulet de chair.

Le deuxième concerne le tri des œufs : le pourcentage d'œufs présentant des défauts permis (sauté, taches ou fêlure) dans un lot ne doit pas dépasser la norme nationale qui est de 3%. Finalement, la température d'entreposage des œufs non aptes à l'incubation qui sont destinés pour la consommation humaine et redirigés vers des classificateurs commerciaux et aux consommateurs doit être conforme aux normes établies (Producteurs d'œufs d'incubation du Canada, 2015). Voici des exemples de BPP du PCQOI^{MC}.

Bonnes pratiques de production (BPP)
<ul style="list-style-type: none"> ○ Le troupeau d'origine doit avoir été testé négatif pour le dépistage de <i>Salmonella</i> Enteritidis ou <i>Salmonella</i> Typhimurium DT104 et le tout doit être confirmé par écrit. ○ Soumettre des échantillons de poussins d'un jour (analyse de duvet) et des échantillons environnementaux après 16 semaines d'âge et avant la mise en production d'œufs d'incubation à des cultures bactériologiques pour détection de <i>S. Enteritidis</i> et <i>S. Typhimurium</i> DT104. ○ L'eau doit être analysée chaque année et être d'une qualité microbiologique acceptable, i.e. lorsqu'aucun échantillon ne contient plus de 10 coliformes totaux par 100 ml d'eau, et lorsqu'aucun des coliformes détectés n'est un coliforme fécal. ○ Entre chaque cycle de production, les bâtiments de poulettes d'élevage et de ponte doivent être lavés et désinfectés minutieusement. ○ Lors du ramassage des œufs, il ne faut pas manipuler les oiseaux vivants ou morts. ○ Toutes les deux semaines, le triage des œufs d'incubation doit être surveillé en examinant au moins 1% de la production quotidienne afin de déterminer le nombre d'œufs sales, souillés ou fêlés. ○ Les tables de ramassage des œufs doivent être nettoyées quotidiennement et désinfectées hebdomadairement avec un produit approuvé pour les surfaces en contact avec les aliments. ○ Le plancher des locaux d'entreposage des œufs doit être nettoyé et désinfecté après le ramassage pour la livraison des œufs ou hebdomadairement. ○ Le couvoir doit être accrédité HACCP ○ Le fournisseur de moulée doit être accrédité HACCP

Tableau II. Exemples de bonnes pratiques de production (BPP) (Producteurs d'œufs d'incubation du Canada, 2015).

La mise en place et le respect ou non de ces BPP par les producteurs sont déterminants pour le transfert des bactéries des fèces vers la surface des coquilles d'œufs. Par exemple, le fait que le troupeau d'origine doit avoir testé négatif pour le dépistage d'une bactérie hautement

pathogène, comme *Salmonella*, diminue le risque de contamination de la surface de la coquille des œufs par des fèces infectées, provenant de poules qui auraient pu sécréter le pathogène si le statut positif du troupeau n'avait pas été détecté au départ.

Les œufs destinés à l'incubation doivent être ramassés au moins trois fois par jour et ceux récoltés dans les nids ne doivent pas être mélangés avec ceux trouvés au sol. Une fois les œufs collectés, ces derniers doivent être nettoyés avec une brosse. Le lavage des œufs destinés à l'incubation n'est pas recommandé, excepté pour les œufs plus sales. Cependant, avant de nettoyer et d'assainir les œufs, le producteur doit consulter le couvoir puisque ces étapes sont facultatives et des méthodes précises peuvent être recommandées, si nécessaire (CNSAE, 2016). Lors d'un tel lavage, les œufs doivent être trempés dans une eau à 40°C à laquelle un désinfectant comme l'hypochlorite de sodium peut être ajouté. Il est primordial que la température initiale de l'eau soit supérieure à celle de l'œuf et monte durant tout le processus de lavage pour éviter la création d'une pression négative dans l'œuf et limiter ainsi le risque de migration des bactéries de la surface vers l'intérieur. Ensuite, une étape de fumigation permettra de réduire les risques que les agents pathogènes puissent pénétrer la coquille. Cette étape peut être effectuée avec du formaldéhyde et du permanganate de potassium (Agriculture Canada, 1990).

Divers facteurs peuvent affecter le pourcentage d'éclosion : l'âge des parents, le temps d'entreposage des œufs, ainsi que la température et le niveau d'humidité dans la salle d'entreposage (CNSAE, 2016). Afin de s'assurer de conserver les embryons en dormance, les œufs fertilisés doivent être ensuite entreposés entre 16-17°C (durée d'une semaine) et 11-12°C (plus longue période de temps) avec une humidité relative de 80-88% jusqu'à la mise en incubation (Agriculture Canada, 1990). Il est important de noter que pour atteindre une

éclosabilité optimale, les œufs doivent être incubés un maximum de sept jours après leur ponte et être positionnés la pointe vers le bas (CNSAE, 2016). Afin de mieux comprendre l'importance des BPP à adopter lors de la manipulation des œufs d'incubation et ainsi réduire au minimum les risques de contamination microbienne, voici quelques notions à savoir sur l'œuf.

2.2.2 La formation de l'œuf

La formation de l'œuf dure environ 26 heures (Solomon, 1997) et se déroule dans le système reproducteur de la poule, qui est formé d'un ovaire et d'un oviducte. Le trajet qu'emprunte l'œuf de l'ovaire jusqu'au cloaque et sa structuration sont présentés à la Figure 2. Dans l'ovaire se déroule la formation des follicules ovariens, correspondant au jaune de l'œuf (vitellus). Selon leur stade de maturation, les follicules seront de différentes grosseurs et chaque jour, le plus mature et souvent le plus gros des follicules se détache de la paroi ovarienne au niveau du sigma, la partie où il n'y a pas de vaisseaux sanguins. Ensuite, le jaune entre dans l'oviducte, qui possède cinq régions fonctionnelles. Tout d'abord, il y a l'infundibulum qui capture le follicule ovarien mature et le mène vers le magnum, où est produit l'albumen (blanc de l'œuf). Durant ce passage, le jaune tourne sur lui-même afin que les chalazes s'enroulent entre elles et stabilisent le jaune au centre de l'albumen. Ce dernier passe alors dans l'isthme où il y a la formation des membranes de la coquille, puis dans l'utérus où se forme la membrane coquillère qui devient la coquille de l'œuf. Des petits cristaux de calcium se forment et prennent de l'expansion, laissant seulement de petits pores par lesquels s'effectueront les échanges gazeux. Une pellicule organique se dépose alors : la cuticule. Finalement, l'œuf arrive dans le vagin juste avant d'être éjecté par le cloaque. Immédiatement après la ponte, étant donné que la température corporelle de 42°C de la poule est plus élevée que celle de l'environnement, le

contenu de l'œuf perd du volume et une chambre à air se forme à l'extrémité de l'œuf. Si l'œuf est fécondé (disque germinatif) et incubé, le poussin se servira lors de l'éclosion de la chambre à air pour respirer.

Des bactéries, comme *Salmonella*, possèdent des caractéristiques intrinsèques pour interagir avec les organes reproducteurs de la poule et également avec les composants de l'œuf. Pour *Salmonella*, les gènes favorisant ce tropisme sont réunis sur des îlots de pathogénicité 1 (SPI-1) et 2 (SPI-2) (Gantois *et al*, 2009). Cette bactérie peut coloniser les cinq régions fonctionnelles de l'oviducte, puis ensuite contaminer les différents composants de l'œuf (Gast *et al*, 1990; Humphrey *et al*, 1991; Keller *et al*, 1995; Miyamoto *et al*, 1997; De Buck *et al*, 2004). Nous allons donc faire référence à cette bactérie afin d'expliquer la contamination verticale de l'œuf.

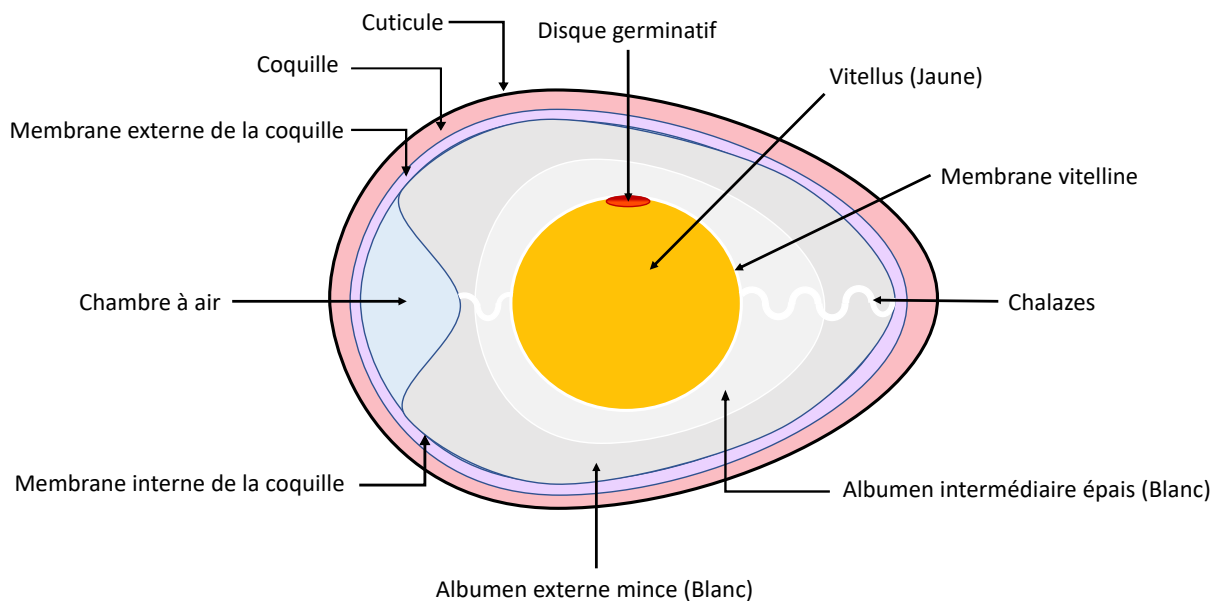


Figure II. Schéma représentant la structure de l'œuf (Inspiré de Gantois *et al*, 2009).

2.2.3 La contamination de l'œuf : l'exemple de *Salmonella Enteritidis*

De façon générale, il y a deux chemins possibles que peut emprunter *S. Enteritidis* pour contaminer l'œuf. Il peut y avoir une transmission horizontale : une route fréquemment empruntée par les bactéries selon un certain nombre d'auteurs (Adler, 1965; Mishu *et al*, 1991). Il peut y avoir une transmission verticale, qui selon la plupart des auteurs, est la voie de transmission la plus importante en termes de conséquence (Gantois *et al*, 2009; Gast *et al*, 1990; Guard-Petter, 2001; Miyamoto *et al*, 1997). Dans les fermes d'élevage, la poule est généralement contaminée par *S. Enteritidis* de façon orale. La bactérie pénètre ensuite dans le tractus digestif, colonisant la lumière de l'intestin, pour ensuite envahir les cellules épithéliales. Cela provoque l'arrivée des macrophages du système immunitaire vers le site d'infection et ces cellules immunitaires phagocytent alors la bactérie. Cette étape est cruciale, puisque la bactérie a la capacité de survivre et se multiplier dans les macrophages. Ces derniers se dirigent vers les organes internes, favorisant ainsi une propagation systémique de la bactérie, comprenant sa localisation au niveau des organes reproducteurs. Il peut y avoir une contamination directe du jaune, des membranes vitellines, de l'albumen, des membranes de la coquille et de la coquille elle-même causée par une infection des ovaires, de l'infundibulum, du magnum, de l'isthme et de la coquille, respectivement. Cela correspond à une contamination verticale, de la poule à son œuf en développement. En effet, certaines bactéries ont la capacité de survivre et de croître dans l'albumen et sur la membrane vitelline malgré le fait que cet environnement soit antibactérien (Gantois *et al*, 2009). Il faut noter que le jaune de l'œuf est un environnement riche en nutriments et que la migration de certaines bactéries vers cette structure pourra permettre leur multiplication (Gantois *et al*, 2009). En plus de cette transmission verticale, la transmission horizontale figure parmi les voies de transmission des bactéries. Lors de la contamination horizontale, l'œuf peut

être contaminé par les fèces durant son passage dans le cloaque de la poule, par l'environnement du couvoir (duvet contaminé) ou par d'autres éléments de l'environnement du poulailler, comme la litière et la poussière. À la suite d'une contamination horizontale, il y a une possibilité pour certaines bactéries de pénétrer la coquille de l'œuf par l'entremise de microfissures ou lorsque l'œuf vient tout juste d'être pondu, par exemple (De Reu, 2006). Il est important de noter que les poules infectées ne produisent pas des œufs contaminés à une fréquence constante. Pour ce qui est de la contamination d'un troupeau par *Salmonella*, la production d'œufs contaminés à la surface de leur coquille (contamination horizontale) par la bactérie sera d'environ 1,05% (Chemaly *et al*, 2009). En ce qui concerne les risques de contamination de l'intérieur de l'œuf, il semble qu'avant la ponte, des facteurs internes à l'œufs puissent intervenir dans le contrôle de la contamination par *Salmonella*. Effectivement, une étude en France a démontré que si environ le tiers des œufs en formation dans l'oviducte de poules infectées contenaient la bactérie, après la ponte, les œufs dont le contenu était contaminé (contamination verticale) ne représentaient que 0 à 0,6% de la production totale (Feuillet, 2007). Il est important de noter que l'œuf possède plusieurs moyens de défenses intrinsèques afin de l'aider à lutter contre la contamination microbienne.

2.2.4 Le système de défense de l'œuf

L'œuf possède de nombreux mécanismes de défense physiques et chimiques contre la contamination microbienne. Juste après la ponte, l'œuf qui est intègre, i.e. sans craquelures ni fissures, est muni de trois premières barrières physiques : la cuticule, la coquille et les membranes coquillères (Gantois *et al*, 2009). Plus la cuticule est de bonne qualité, plus minces sont les chances de contamination par les micro-organismes (De Reu, 2006). Les membranes

coquillères constituent l'obstacle le plus efficace contre la pénétration des bactéries, leur conformation de fibres orientées aléatoirement joue le rôle de filtre physique antimicrobien. À ces fibres sont associées des protéines antibactériennes, comme le lysozyme, l'ovotransferrine et l'ovocalyxine (De Reu, 2006), retrouvées également dans la coquille et l'albumen. En plus de sa viscosité, de ses chalazes et de son pH alcalin, l'albumen détruit et prévient la croissance d'une grande variété de bactéries grâce aux substances bactériostatiques et bactéricides qu'il renferme. Le lysozyme en est un bon exemple puisqu'il affecte la membrane cellulaire des bactéries à Gram positif en catalysant l'hydrolyse des peptidoglycane, mais il forme aussi des pores dans la membrane cellulaire des bactéries à Gram négatif. L'ovotransferrine est autre exemple de protéine antibactérienne de l'albumen qui possède deux mécanismes bactériostatiques différents contre les bactéries. D'une part, elle agit en tant que chélateur de fer, ce qui crée un environnement déficient en fer pour les bactéries, et d'autre part, elle interagit directement avec la membrane cellulaire bactérienne altérant les fonctions biologiques de cette dernière (Berrang *et al*, 1999). Plusieurs autres facteurs défavorables à la croissance microbienne sont également présents dans le blanc d'œuf, comme d'autres agents chélateurs (ovoflavoprotéine et avidine), des protéines inhibitrices de protéases microbiennes (ovoinhibiteur, ovostatine, OVAX) et des anticorps IgM et IgA (De Reu, 2006). Lors de l'incubation, la température élevée permet aux protéines de l'albumen de fonctionner de manière optimale (Cook *et al*, 2003). Finalement, si des micro-organismes parviennent au vitellus, ils se retrouvent dans un environnement très riche en nutriments, ce qui favorise leur croissance (Gast *et al*, 2001).

Dans le présent projet, nous nous intéressons aux bactéries qui sont à la fois retrouvées dans les matières fécales des poules et à la surface de la coquille de leurs œufs pondus. Nous tenterons d'évaluer le rôle du microbiote fécal de la poule dans la contamination horizontale de la surface de l'œuf.

2.3 Le microbiote

Le microbiote englobe l'ensemble des micro-organismes (bactéries, virus, champignons, levures) présents dans un environnement spécifique déjà établi. Pour les micro-organismes vivants dans le tractus gastro-intestinal (TGI), on parle alors du microbiote intestinal. L'étude du microbiote intestinal a amélioré radicalement nos connaissances sur la santé humaine et animale, particulièrement sur les maladies, sur le métabolisme et sur l'absorption des nutriments et plus encore (de la Cuesta-Zuluaga *et al*, 2016). Ces communautés microbiennes sont soumises à une pression sélective de la part de l'hôte et son environnement. Au fil du temps, le microbiote au sein du TGI a co-évolué avec son hôte afin de développer une relation mutuellement bénéfique; une relation dite symbiotique (Thursby *et al*, 2017). De plus, certains rôles importants sont aujourd'hui reconnus pour ces micro-organismes comme moduler le système immunitaire de l'hôte et offrir à la barrière intestinale des activités antagonistes contre les agents pathogènes, comme par exemple en libérant des substances microbiennes, en baissant le pH en produisant de l'acide lactique, en produisant des cytokines, en interférant avec la transcription de certains gènes (De Maesschalck *et al*, 2015) et en produisant des vitamines et des acides aminés essentiels (Hou *et al*, 2016). Une caractérisation approfondie du microbiote (composition et fonctionnement) et une modulation favorable de ce dernier pourraient être entre autres d'une

grande utilité pour diminuer l'utilisation non thérapeutique des antibiotiques (Deusch *et al*, 2014).

Tout le long du tractus digestif, plusieurs éléments changent, comme la densité bactérienne, le niveau du pH et le taux d'oxygène (Donaldson *et al*, 2016). Chez plusieurs espèces, comme la volaille par exemple, il a été démontré qu'une panoplie de facteurs pouvait affecter la composition du microbiote : l'âge (Lu *et al*, 2003), la diète (Sekelja *et al*, 2002), les additifs alimentaires (Torok *et al*, 2011), le génotype de l'oiseau, l'immunité de l'hôte (Van der Wielen *et al*, 2002), l'utilisation d'antibiotiques (Videnska *et al*, 2013), l'apparition de maladies, la présence d'agents pathogènes (Thibodeau *et al*, 2015), les caractéristiques de la niche écologique, ainsi que l'hygiène de cet environnement (Sekelja *et al*, 2002; Stanley *et al*, 2012). Par exemple, la densité de poules vivant dans un système sur parquet, comme c'est le cas des troupeaux d'oiseaux reproducteurs de poulet de chair, a des conséquences sur le comportement des poules (stress, cannibalisme, picage), ces paramètres pouvant potentiellement affecter leur microbiote (Feuillet, 2007). Aussi, la présence de litière et de plus d'un niveau de plancher sont des facteurs qui affectent la qualité de l'air dans le bâtiment de production ou d'élevage et donc, l'air respiré par les poules. Tous ces facteurs peuvent changer les communautés microbiennes présentes dans chaque partie du TGI et donc moduler le microbiote de l'hôte (Huneau-Salaün *et al*, 2010).

2.3.1 Le microbiote intestinal de la poule

L'environnement gastro-intestinal de la poule comprend une large communauté de micro-organismes, de l'ordre de 900 espèces bactériennes. Il a été rapporté que près de 90% de

ces bactéries n'avait pas été cultivé (Gabriel *et al*, 2005). Ce microbiote hautement diversifié comprend des bactéries commensales, des bactéries transitoires, mais également des bactéries pathogènes (Videnska *et al*, 2013). Les bactéries commensales font partie du microbiote « normal ou résident » de l'hôte. Ayant co-évolué avec ce dernier, ces bactéries jouent un rôle important dans le développement du système immunitaire, bien qu'à l'occasion elles puissent surmonter les réactions de protection de l'hôte et provoquer des effets pathologiques (Tlaskalová-Hogenová *et al*, 2004). Les bactéries transitoires sont des bactéries de passage, par exemple celles jouant un rôle de probiotique (Sanz *et al*, 2009). Les bactéries pathogènes utilisent les nutriments dérivés du microbiote afin de favoriser leur croissance et leur virulence. Ces bactéries modifient l'environnement du microbiote et sont responsables de maladies infectieuses (Bäumler *et al*, 2016). Ces populations de micro-organismes, en plus de contribuer à la digestion, jouent également un rôle important pour la croissance et la santé de la poule (Apajalahti *et al*, 2004). Il a été rapporté qu'une dysbiose, une perturbation de la relation hôte-microbes dans le TGI, était souvent associée à la présence d'une maladie (Hou *et al*, 2016). Étant donné que les différentes parties du TGI de la poule ont une composition très spécifique, l'analyse du microbiote se fait séparément, en considérant chacun des segments comme des écosystèmes distincts (Van der Wielen *et al*, 2002). Le microbiote de la poule allant du jabot aux fèces est composé à plus de 99% par les phyla Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria et Actinobacteria (Videnska *et al*, 2013).

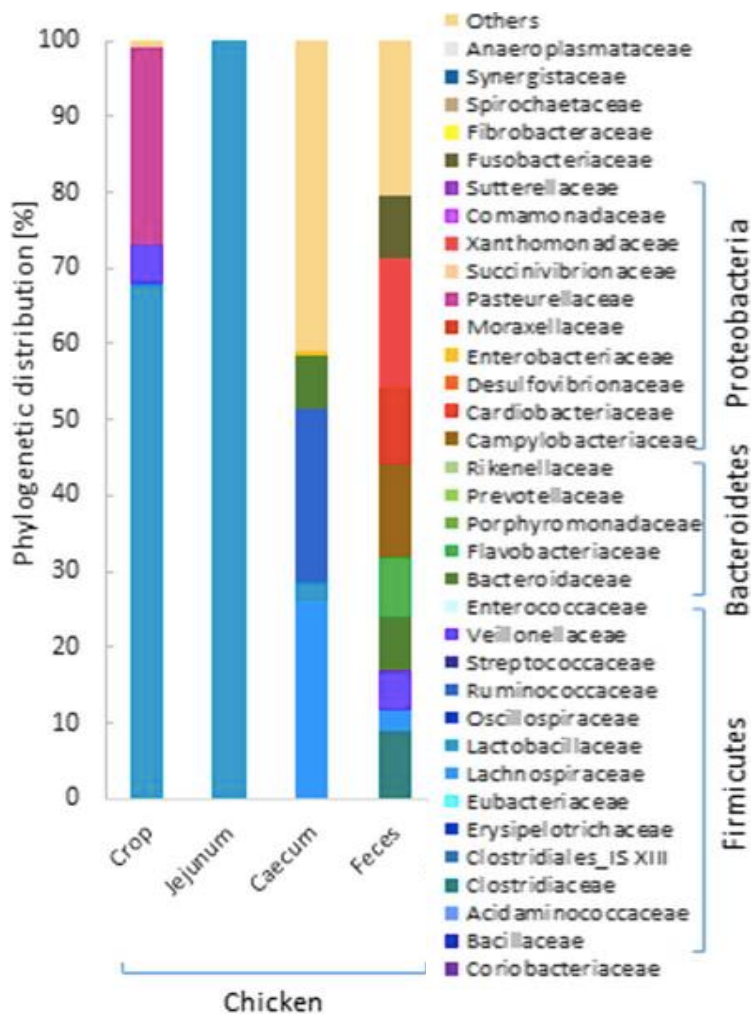


Figure III. La composition du microbiote de la poule, du jabot aux fèces (Deusch *et al*, 2014).

Comme le démontre l'étude de Deusch *et al*, la distribution phylogénétique des bactéries du jabot, du jéjunum, des caeca et des matières fécales présente une variation significative. Au niveau du jabot, la majorité des bactéries appartiennent à la famille des *Lactobacillaceae*, suivies des *Pasteurellaceae* et des *Veillonellaceae*. En ce qui concerne le jéjunum, 99% des bactéries sont membres des *Lactobacillaceae* avec en complément une proportion faible de *Campylobacteraceae* et de *Streptococcaceae*. En fait, plus la poule est âgée, plus la quantité de *Lactobacillus sp.* sera élevée au niveau du duodénum et du jéjunum. Les caeca sont quant à eux

hautement colonisés par des bactéries anaérobiques, comme des bactéries de la famille des *Lachnospiraceae*, des *Clostridiaceae*, des *Bacteroidaceae* et des *Bifidobacteriaceae* (Videnska *et al*, 2013; Deusch *et al*, 2014). Finalement, c'est dans le cloaque qu'apparaît la plus grande diversité parmi les phyla majoritaires. Le cloaque est peuplé majoritairement et de façon assez équivalente par des membres des familles *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae* et des *Eubacteriaceae*, suivis des *Fusobacteriaceae*, des *Lactobacillaceae*, des *Bacteroidaceae* et des *Enterobacteriaceae*. On retrouve aussi des *Bifidobacteriaceae*, des *Streptococcaceae* et des *Staphylococcaceae* (Gabriel *et al*, 2005; Miyamoto *et al*, 1998).

2.3.2 Le microbiote fécal de la poule

En ce qui concerne le microbiote fécal de la poule, des études utilisant des méthodes de culture classiques ont rapporté que celui-ci varie, notamment en fonction de la saison (Trawinska *et al*, 2016) et du type d'élevage dans lequel les poules se trouvent (Jones *et al*, 2016). Une étude menée sur des poules pondeuses en cages a rapporté une augmentation de la contamination microbienne fécale durant l'hiver qui pouvait être expliqué par le chauffage à air pulsé dans le poulailler, conférant ainsi des conditions favorables pour la croissance des bactéries (e.g. taux d'humidité). Sur une base annuelle, la contamination moyenne des matières fécales était de 7,7log UFC/g pour le microbiote mésophile, 5,7log UFC/g pour les coliformes avec 5,6log UFC/g pour la seule bactérie *E. coli* (Trawinska *et al*, 2016). Aussi, il a été rapporté que le microbiote hétérotrophe aérobie total est de $1,4 \times 10^7$ UFC/g et comprend les bactéries *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* spp., *Flavoacterium* sp., *Klebsiella* sp., *Micrococcus* sp. et *Nocardia* spp. Cette portion du microbiote représente de 9,4% à 17,3% de la composition des matières fécales (Akinde *et al*, 2008).

Plusieurs études utilisant des méthodes de biologie moléculaire ont été effectuées récemment et ont démontré que la majorité des communautés présentes dans les matières fécales des poulets de chair et des poules pondeuses appartiennent aux phyla Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes et Actinobacteria (Videnska *et al*, 2013, 2014; Kaakoush *et al*, 2014; Deusch *et al*, 2014; Pauwels *et al*, 2015; Hou *et al*, 2016). À la suite d'une caractérisation par pyroséquençage des régions variables V3 et V4 de l'ARNr 16s, Videnska *et al* (2014) ont rapporté que le microbiote fécal des poulets de chair était dominé par le phylum Firmicutes représentant 76,2%, suivi par Proteobacteria à 14%, Bacteroidetes à 6,5% et Actinobacteria à 3,8%. Pour ce qui est des poules pondeuses commerciales, leur microbiote fécal était composé majoritairement mais dans une moindre proportion que celle observée pour les poulets de chair, du phylum Firmicutes, représentant 58,8%, suivi par Bacteroidetes à 22,1%, Proteobacteria à 16,9%, Fusobacteria à 1,4% et Actinobacteria à 0,6% (Videnska *et al*, 2014) (Figure 4).

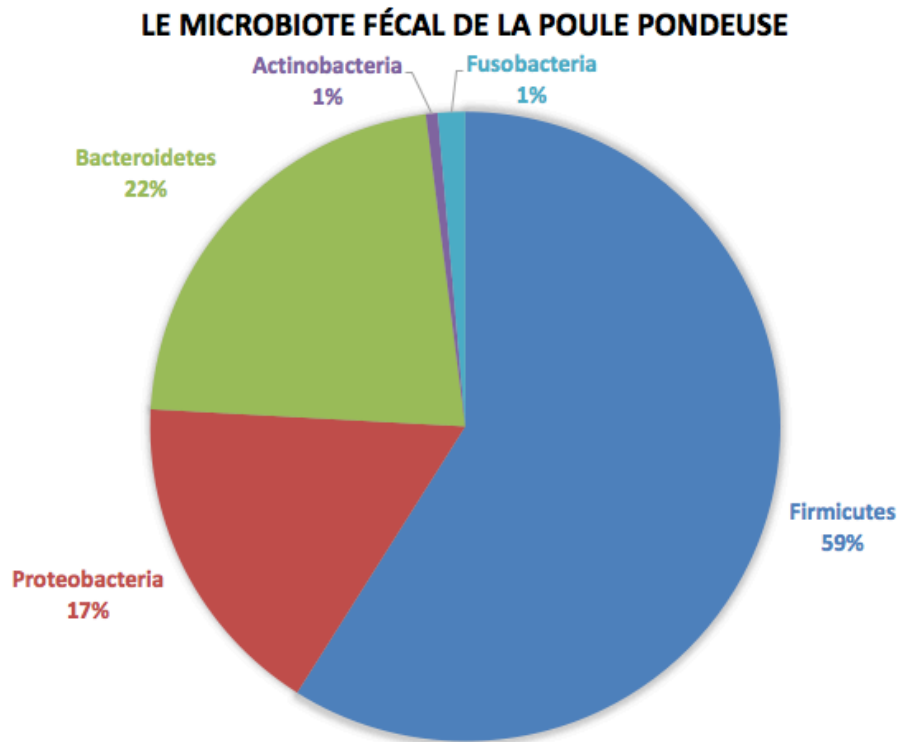
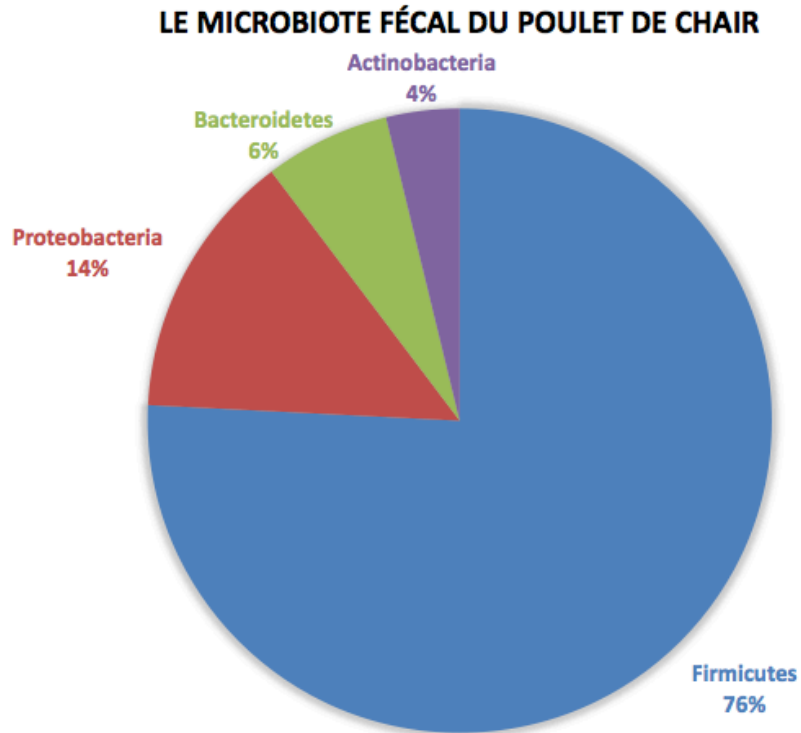


Figure IV. Schéma représentant les phyla majoritaires présents dans les fèces de poules (basé sur l'étude de Videnska *et al* (2014)).

Au niveau du phylum Firmicutes, on retrouve les bactéries des familles *Clostridiaceae* et *Lactobacillaceae* majoritairement, suivies des *Peptostreptococcaceae*, *Ruminococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Bacillaceae*, *Eubacteriaceae* et *Negativicutes*. Concernant le phylum Proteobacteria, ce sont majoritairement des bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* qui le composent, avec l'espèce *Escherichia* représentant 98% du phylum. Des bactéries pathogènes dont *Salmonella*, *Campylobacter* et *Shigella* peuvent y être également représentées. Pour ce qui est du phylum des Bacteroidetes, on retrouve les bactéries de la famille des *Bacteroidaceae*, suivies de membres des familles *Flavobacteriaceae* et *Prevotellaceae*. Le phylum Actinobacteria est représenté en majorité par les bactéries des familles *Corynebacteriaceae*, *Brevibacteriaceae* et *Coriobacteriaceae*. De plus, un pourcentage non négligeable de *Fusobacteriaceae* est également présent dans les fèces de poules pondeuses et de poulets de chair. Ces résultats de composition du microbiote fécal au niveau de la famille proviennent de différentes études menées chez des poulets de chair élevés en Norvège (Sekelja *et al*, 2012), en République Tchèque, en Croatie, en Hongrie, en Slovénie (Videnska *et al*, 2014), en Australie (Kaakoush *et al*, 2014; Stanley *et al*, 2015), en Allemagne (Deusch *et al*, 2014), aux États-Unis (Oakley and Kogut, 2016), en Chine (Yan *et al*, 2017) et en Belgique (Pauwels *et al*, 2015), ainsi que chez des poules pondeuses élevées en République Tchèque (Videnska *et al*, 2013), en Croatie, en Hongrie, en Slovénie (Videnska *et al*, 2014) et aux États-Unis (Jones *et al*, 2016).

Les différences entre les deux filières, poulets de chair et poules pondeuses, peuvent s'expliquer, tout d'abord, par l'âge des oiseaux lors de l'échantillonnage (l'abattoir), soit 6 semaines pour les poulets de chair et 6 mois pour les poules de la filière de ponte. L'alimentation

offerte dans les deux filières étant différente, ceci peut aussi expliquer ces différences (Hébert, 2017). La génétique des poules de chair et des poules pondeuses n'est pas la même, ce qui a une influence sur leur microbiote intestinal. Enfin, certaines études ont déjà signalé des fluctuations inter-troupeaux chez les poules pondeuses (Videnska *et al*, 2013) et les poulets de chair (Kaakoush *et al*, 2014; Hou *et al*, 2016). Certains auteurs ont également signalé des différences significatives dans le temps pour le microbiote fécal des poulets de chair (Van der Wielen *et al*, 2002; Sekelja *et al* 2012; Oakley and Kogut, 2016) et entre des poulettes et des poules pondeuses (Videnska *et al*, 2013). Les informations sont toutefois manquantes dans la littérature actuellement concernant les poules adultes.

2.3.3 Le microbiote à la surface des coquilles d'œufs

Les communautés bactériennes présentes à la surface de la coquille de l'œuf sont encore très mal caractérisées, bien qu'elles soient les premières bactéries rencontrées par les poussins après l'éclosion et qu'elles puissent avoir un impact sur la santé de l'oiseau, tout comme ultérieurement sur la santé publique (Neira *et al*, 2017). Les informations disponibles sur le microbiote à la surface des coquilles d'œufs sont issues de recherches majoritairement réalisées sur les œufs destinés à la consommation humaine et ont été obtenues à l'aide de méthodes de culture classiques, comme le dénombrement sur gélose. Pourtant, ces informations apparaissent précieuses, car lors de l'oviposition, l'œuf étant brutalement exposé à un environnement externe inférieur à 42°C, soit la température corporelle de la poule, subira une pression négative. Celle-ci pourrait favoriser la contamination de la coquille par les bactéries déjà présentes à la surface de l'œuf, voire même permettre la pénétration de celles-ci au travers de la coquille (Gantois *et al*, 2009). De plus, les poules transportent de la litière dans le nid ainsi que des fèces qui

contiennent une quantité importante de micro-organismes (Cox *et al*, 2000). En présence d'humidité, les bactéries y rencontrent un environnement hautement favorable pour leur survie (Berrang *et al*, 1999). Il a été rapporté que la surface de la coquille de l'œuf abritait en moyenne de 10^3 à 10^4 bactéries (dénombrement par culture) pour les coquilles très propres, et jusqu'à plus de 10^7 bactéries pour les coquilles très contaminées (Sauveur, 1978). La fraction cultivable mésophile aérobique totale du microbiote de la surface de l'œuf peut être considérée comme un indicateur sanitaire (Abdellah, 2010). Celle-ci a été étudiée par différents auteurs qui ont démontré que la contamination par cette portion du microbiote pouvait varier en fonction de différents facteurs, notamment, du type d'élevage où les œufs sont pondus (Guinebretière *et al*, 2009). Effectivement, une étude en France a comparé la contamination moyenne des coquilles d'œufs par le microbiote aérobique cultivable entre les différents systèmes d'hébergement et a obtenu les résultats suivants: en cages conventionnelles, la contamination était en moyenne de $4,4 \log$ UFC/coquille, en cages aménagées cette contamination se situait plutôt autour de $5,1 \log$ UFC/coquille et sur parquets, les nombres étaient de $4,8 \log$ UFC/coquille (Huneau-Salaün *et al*, 2010). Des études menées également sur les œufs de poules pondeuses ont rapporté que le microbiote cultivable de la coquille de l'œuf était dominé par des bacilles à Gram positifs tolérants à la dessiccation (Cook *et al*, 2003, 2005; De Reu, 2006). Il avait été suggéré que ces derniers pourraient venir du duvet, du sol ou alors des fèces de poules (Board *et al*, 1995).

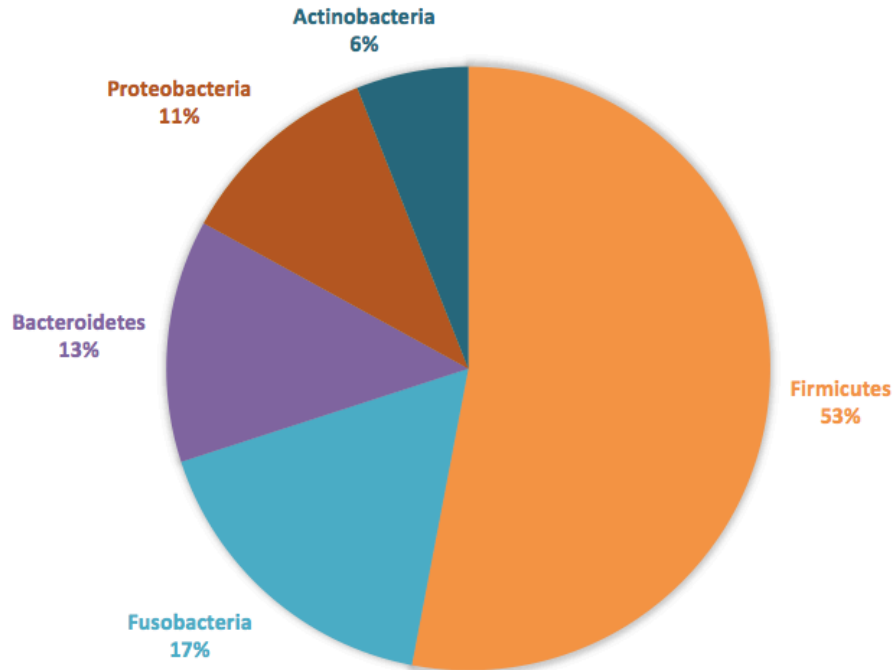
Les micro-organismes pathogènes les plus fréquemment responsables des toxi-infections alimentaires retrouvés sur la coquille des œufs étaient associés aux genres *Salmonella*, *Staphylococcus* (Ecole inter-etats des sciences et medecine veterinaires de Dakar), *Campylobacter* (Jones *et al*, 2016) et *Escherichia* (Cook *et al*, 2003). D'autres études faisant

appel à la bactériologie classique y ont également rapporté la présence de *Listeria monocytogenes* (Nitcheva *et al*, 1990) et de *Yersinia enterocolitica* (Favier *et al*, 2005) à la surface des œufs. Une autre étude a étudié les bactéries présentes à la surface des coquilles d'œufs de poules pondeuses, avant et après le lavage des œufs et a rapporté que les genres *Proteus*, *Pseudomonas* et *Salmonella* étaient retrouvés uniquement avant le lavage des œufs, tandis que d'autres bactéries telles que des entérobactéries (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* et *Providencia*), certains membres de la famille vibrionaceae (*Listonella* et *Vibrio*) et *Aeromonas* avaient résisté au lavage (Musgrove, 2004).

Rares sont les études utilisant une méthodologie de biologie moléculaire, comme la métagénomique 16S, qui ont été menées sur des coquilles d'œufs. Celles réalisées concernent majoritairement les oiseaux sauvages et une seule a été menée sur les œufs de poules pondeuses. Les études menées sur les œufs d'oiseaux sauvages étudiaient la contribution des bactéries provenant de l'environnement (sol, nids) et de la mère (cloaque, peau, plumes) au microbiote retrouvé à la surface de l'œuf (van Veelen *et al*, 2017) et l'effet du temps d'incubation sur l'évolution de ce microbiote (Lee *et al*, 2014). L'étude de Neira *et al* (2017) conduite en Espagne compare quant à elle la composition du microbiote à la surface des coquilles d'œufs de poules pondeuses vivant dans des systèmes d'élevage différents : en cages conventionnelles ou en parcours libre. Les résultats de cette étude ont démontré que le système d'hébergement des poules influençait les communautés bactériennes retrouvées sur la coquille. Le microbiote à la surface des œufs provenant de poules élevées en cages était dominé par le phylum Firmicutes à 50%, suivi par Fusobacteria à 16%, Bacteroidetes à 12%, Proteobacteria à 10% et Actinobacteria à 6%. Le microbiote présent sur les coquilles d'œufs provenant de poules

élevées en parcours libre était aussi dominé dans les mêmes proportions par le phylum Firmicutes (~50%), suivi dans ce cas par Bacteroidetes à 28%, Actinobacteria à 17% et Proteobacteria à 4% Neira *et al*, 2017) (Figure V).

**LE MICROBIOTE À LA SURFACE DE LA COQUILLE D'ŒUFS
PONDUS PAR DES POULES GARDÉES EN CAGE**



**LE MICROBIOTE À LA SURFACE DE LA COQUILLE D'ŒUFS
PONDUS PAR DES POULES GARDÉES EN PARCOURS LIBRE**

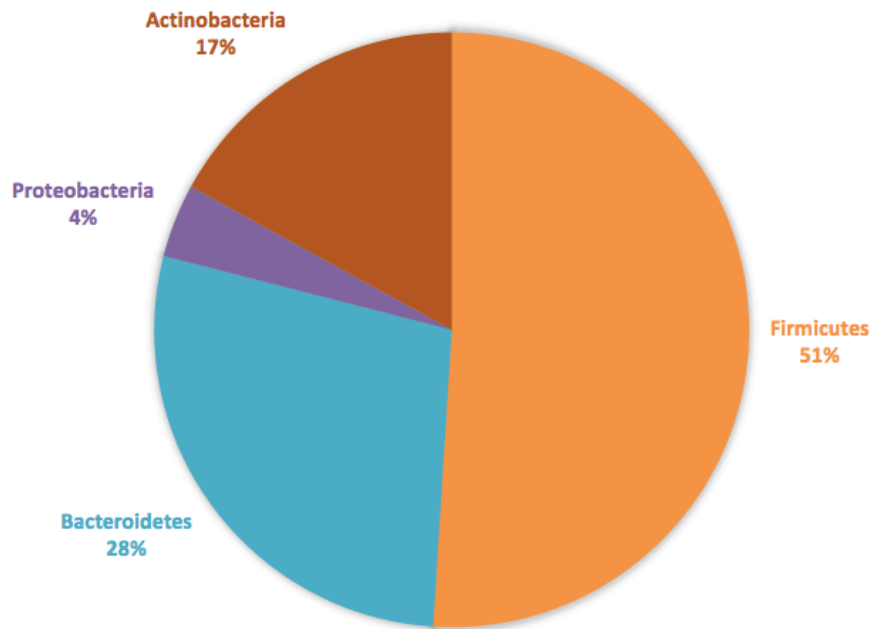


Figure V. Schéma représentant les phyla majoritaires présents à la surface des coquilles d'œufs de poules selon le type de logement (basé sur l'étude de Neira *et al.*, 2017)).

Les familles identifiées à plus d'un pourcent du microbiote total étaient les suivantes : *Dermabacteraceae*, *Bacteroidaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*, *Clostridiaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacillaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Ruminococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Veillonellaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Pasteurellaceae* et *Thiotrichaceae*. Ces auteurs ont également identifié des genres bactériens potentiellement pathogènes et d'altération à la surface des coquilles d'œufs, incluant *Campylobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Helicobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella* et *Staphylococcus*. Ces genres étaient présents en faibles proportions, représentant moins d'un pourcent du microbiote total (Neira *et al*, 2017). Malgré l'intérêt de ces premiers résultats, ces études n'ont pas pu documenter la diversité inter-troupeaux, la diversité à travers le temps, ni fournir les données au niveau des œufs destinés à l'incubation pour la production de poulets de chair.

2.3.4 Liaison entre les microbiotes fécal et de surface d'œufs

Dans les fermes où les oiseaux sont sur parquet, comme pour les oiseaux reproducteurs de poulet de chair, les matières fécales et les œufs peuvent tous deux se retrouver sur la litière, augmentant ainsi le risque de la transmission de certains micro-organismes présents dans les matières fécales vers la surface des œufs (Protais *et al*, 2003; De Reu *et al*, 2005). Le microbiote retrouvé tout au long du TGI des pondeuses (e.g. des poules reproductrices de poulets de chair) est grandement modulé sur parquet. Cela peut s'expliquer par le fait que les oiseaux sont en contact direct avec leurs matières fécales et qu'elles ont souvent tendance à manger leurs fèces lors d'un stress déclenché par les agressions dans les troupeaux sur parquet en raison du nombre important d'oiseaux « en liberté » (Feuillet, 2007). De plus, étant donné que les poules se

déplacent beaucoup plus contrairement aux poules en cages, la quantité de poussières dans l'air est plus importante dû au soulèvement des particules de litière, de matières fécales et de plumes suite au mouvement des oiseaux. Ces poules sont alors davantage susceptibles d'inhaler des particules contenant des micro-organismes pouvant être pathogènes par exemple. Ces micro-organismes se retrouvent donc dans les différents organes des oiseaux et peuvent moduler leurs microbiotes digestif, respiratoire, cutané, etc. (Huneau-Salaün *et al*, 2010).

Plusieurs études ont démontré que lorsqu'il y a contamination de la surface de la coquille d'œuf, celle-ci dépend beaucoup des éléments de l'environnement tel que le système d'hébergement, la nourriture, l'eau, les fèces et la poussière (Chemaly *et al*, 2009; Im *et al*, 2015; Garcia *et al*, 2011; El-Tras *et al*, 2010; Board *et al*, 1964; Quarles *et al*, 1970; Gentry *et al*, 1972). De plus, il a été montré que des œufs fraîchement pondus (dont la cuticule est encore humide) mis en contact avec des fèces fraîches de poules, présentent une coquille davantage contaminée que celles des œufs avec une coquille sèche (Sparks *et al*, 1985). La présence de fèces de poules et d'autres matières organiques humides faciliteraient la survie, voire même la croissance de certaines bactéries pathogènes, comme *Salmonella* (Gantois *et al*, 2009). Par exemple, selon une étude, au cours de laquelle il y avait contamination artificielle de la coquille des œufs avec des fèces contaminées par *Salmonella*, puis un entreposage à 25°C par la suite, le nombre de ces bactéries avait augmenté de 1 à 2 logs le premier jour, pour atteindre jusqu'à 4 à 5 logs le troisième jour (Shoeni *et al*, 1995). Une telle croissance indique que les fèces peuvent servir de réservoir nutritionnel aux bactéries (Messens *et al*, 2006). Il est donc très important de retirer rapidement les matières fécales pouvant entrer en contact avec les œufs (Radkowski, 2002) et de pouvoir apprécier la part du transfert depuis les matières fécales jusqu'à la surface

de la coquille de l'œuf dans les conditions rencontrées en production commerciale. Aussi, il a été rapporté que la résistance de *Salmonella* à la dessiccation lui permet d'être présente durant une longue période de temps dans les fèces et dans la poussière (Davies *et al*, 1996; Duguid *et al*, 1991), augmentant ainsi ses chances de contaminer la surface de l'œuf et même dans certains cas, comme documenté pour le sérovar *S. Enteritidis*, de pénétrer la coquille (Gast *et al*, 1990; Humphrey *et al*, 1991).

La mise en commun de résultats de différentes études portant sur la contamination par *Salmonella* de troupeaux naturellement infectés indique que les sérotypes qui sont fréquemment isolés à la fois dans l'environnement de la ferme des poules (incluant les fèces et la poussière), et à la surface de leurs œufs peuvent être extrêmement variés et donc, il n'y a pas de spécificité de sérovars pour chaque type de surface (Chemaly *et al*, 2009; De Buck *et al*, 2004; Humphrey *et al*, 1991; Im *et al*, 2015; Jones *et al*, 2016; Shoeni *et al*, 1995; Garcia *et al*, 2011). Cependant, malgré le grand nombre d'études publiées suggérant la contamination des œufs par des fèces, aucune étude à ce jour n'a établi la prévalence de la contamination naturelle via les fèces des coquilles d'œufs par *Salmonella* de façon satisfaisante (Chemaly *et al*, 2009). Les résultats de l'étude de Arnold *et al* (2013) ont indiqué la présence d'une relation linéaire entre le taux de contamination de l'intérieur des œufs et la prévalence des poules infectées dans l'élevage, donc le taux de contamination du contenu des œufs et le taux de poules infectées augmentent de façon similaire. Puis, une relation quadratique a été trouvée entre la contamination de la surface de la coquille des œufs et la prévalence des poules infectées, donc il y a une accélération du taux de présence de *Salmonella* sur les œufs suite à une augmentation de la prévalence intra-troupeau (Arnold *et al*, 2013).

Même si les études sont moins exhaustives pour les bactéries du genre *Escherichia*, une étude faite par Projahn *et al* (2016) a démontré deux cas de transmission pseudo-verticale d'une même bactérie entre les parents reproducteurs de poulet de chair (échantillons de fèces) et la surface de leurs œufs, à l'occasion de l'étude d'isolats présentant un profil d'antibiorésistance original. Ce projet avait pour but d'étudier dans la chaîne de production de poulets de chair, la présence et les modes de transmissions possibles d'entérobactéries commensales produisant des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSEs) ou possédant une AmpC transférable représentant un danger quant à la contamination des aliments destinés à la consommation humaine. L'AmpC se situe en fait sur les chromosomes des bactéries et protège ces dernières des antibiotiques. Le premier cas de transmission concernait l'espèce *E. coli*, avec une souche porteuse du gène *blaCTX-M1*, qui a été retrouvée à la fois dans les fèces du troupeau parent et sur la surface de la coquille des œufs avant la désinfection. Le deuxième cas concernait l'espèce *E. fergusonii*, porteuse du gène *blaTEM-52*, qui a été retrouvée à la fois dans les fèces du troupeau parents et sur la surface de la coquille des œufs après la désinfection. Dans les deux cas, les profils PFGE confirmaient la relation phylogénétique entre les bactéries (Projahn *et al*, 2016).

Finalement, pour les bactéries du genre *Campylobacter*, l'étude de Jones *et al* (2016) a étudié l'influence des différents systèmes d'élevage de poules pondeuses sur l'incidence et la sélection de *Campylobacter*. La présence de la bactérie à la fois dans les fèces de poules et à la surface de leurs œufs a été démontrée. À partir des œufs de poules élevés dans les cages conventionnelles, un seul isolat de *C. jejuni* a été récupéré de la coquille de l'œuf ce qui relativise la contribution des fèces dans la contamination de la coquille, contrairement aux autres types

d'élevage. Effectivement, dans les cages aménagées, 71% des fèces étaient contaminées par *Campylobacter spp.* (38% par *C. coli* et 33% par *C. jejuni*), alors que la contamination des coquilles était de 41%, avec un ratio d'espèce différent (8% par *C. coli* et 33% par *C. jejuni*). Dans le cas des volières, 29% des fèces étaient contaminées par *Campylobacter spp.* (27% par *C. coli* et 2% par *C. jejuni*), puis la contamination des coquilles était de 50%, avec une répartition *C. coli* / *C. jejuni* différente de celles des fèces (8% de *C. coli* et 42% de *C. jejuni*) (Jones *et al.*, 2016). Cela indique la capacité pour *Campylobacter spp.* de contaminer la surface des œufs via les fèces infectés, mais aussi suggère une aptitude supérieure pour *C. jejuni*. Dans une seconde étude menée sur des poules pondeuses excréant *Campylobacter jejuni*, les auteurs ont rapporté que 0,9% des coquilles d'œufs étaient contaminés avec la bactérie (Doyle, 1984).

Les rares études ayant comparé les micro-organismes présents dans les matières fécales de poules et ceux retrouvés à la surface des œufs pondus par celles-ci ne se sont donc intéressées qu'à certaines bactéries pathogènes (en particulier celles appartenant aux genres *Salmonella*, *Escherichia* et *Campylobacter*). Pourtant, les communautés microbiennes fécales des poules reproductrices chair sont l'une des premières bactéries rencontrées par l'œuf durant et après la ponte et la contribution de ces micro-organismes à l'établissement du microbiote à la surface de l'œuf demeure encore aujourd'hui inconnue. L'étude de ces microbiotes à l'aide de méthodes de culture classique est limitée puisque la majorité des bactéries ne sont pas cultivables ou nécessitent des conditions pour croître qui sont trop complexes ou trop coûteuses pour être reproduites en laboratoire.

2.4 Méthodes d'étude du microbiote

2.4.1 Méthodes basées sur la biologie moléculaire

Afin de bien évaluer la pertinence d'une approche métagénomique dans le présent projet d'étude, il est important de comprendre et de distinguer l'apport de cette méthode de biologie moléculaire face à la bactériologie classique. La bactériologie classique implique généralement la mise en culture, la croissance, l'isolement et/ou le dénombrement de bactéries sur ou dans des milieux non-sélectifs ou sélectifs, comme des géloses ou des bouillons (McClure, 2008). Les bactéries non-cultivables ou requérant des conditions de croissances trop complexes ne peuvent donc pas être facilement étudiées à l'aide d'une telle méthode. La représentation du microbiote est alors loin d'être optimale (Deusch *et al*, 2014). Les nouvelles technologies de séquençage d'ADN ont drastiquement amélioré l'étude du microbiote (de la Cuesta-Zuluaga *et al*, 2016). En effet, cette technologie permet d'étudier la composition et la dynamique de populations microbiennes d'environnements hautement colonisés, comme celui des matières fécales, mais également de certains milieux moins colonisés, comme les surfaces de coquilles d'œufs. Cependant, pour faire la détection de certaines bactéries qui sont habituellement présentes en faibles quantités, i.e. quantités inférieures au seuil de détection en métagénomique, l'utilisation de la bactériologie classique est indispensable.

La métagénomique à proprement dit est l'étude des génomes de plusieurs individus d'espèces différentes dans un même échantillon (Knight *et al*, 2018). Ce genre d'analyse permet de fournir des données sur la composition d'un microbiote, i.e. de décrire les micro-organismes présents, leur abondance et leur diversité. Plusieurs types d'analyse par métagénomique existent, comme la métagénomique globale (bactérienne, virale, fongique) et la métagénomique ciblée,

telle que la métagénomique 16S. La métagénomique globale ou « *Shotgun metagenomic* » permet de décrire le fonctionnement global du microbiote en séquençant à haut débit l'ensemble des gènes présents dans un échantillon, qu'ils soient procaryotes ou eucaryotes, sans amplification préalable d'une séquence ciblée. Cette méthode permet l'assemblage (*in silico*) de génomes entiers à partir de courts fragments d'ADN d'un échantillon donné (Quince *et al*, 2017). La métagénomique ciblée consiste, quant à elle, à séquencer un gène d'intérêt unique qui aura au préalable été amplifié. Ce gène doit être commun à plusieurs espèces, faiblement transférable, peu sensible aux mutations et aux événements de recombinaison et présenter des régions hypervariables afin de distinguer différentes espèces entre elles. C'est le cas du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S présent chez les bactéries et les archées. La métagénomique globale est plus précise, mais est également plus coûteuse et plus compliquée à mettre en œuvre que la méthode ciblée qui est offre une sélectivité intéressante (Knight *et al*, 2018). La métagénomique 16S est la méthode d'analyse qui a été choisie pour le présent projet de recherche et va donc être davantage détaillée.

2.4.2 Métagénomique 16S

La méthode de séquençage utilisant comme marqueur l'ADN du gène codant pour l'ARN ribosomique (ARNr) 16S est devenue un outil de travail très important permettant de caractériser les communautés microbiennes peuplant le tractus gastro-intestinal (Deusch *et al*, 2014). Ce gène est le marqueur le plus connu et le plus utilisé présentement et quatre raisons en font un excellent marqueur. L'ARNr 16S, présent dans la sous-unité 30S du ribosome de tous les procaryotes, est une molécule 1) ubiquitaire, 2) dont la séquence connue peut être utilisée pour identifier, classifier les bactéries, 3) il est codé par un gène d'environ 1500 nucléotides qui

possède dix régions hyper-conservées 4) il contient neuf régions hypervariables (Figure 3). Les séquences hautement conservées vont servir, lors de l'amplification par réaction en chaîne de la polymérase (PCR), de matrice afin d'ajouter les amorces F « *Foward* » et R « *Reverse* » sur la première base de chaque extrémité du double brin d'ADNr 16S et vont ainsi permettre une amplification des gènes. Les régions variables, elles, vont permettre soit d'identifier les bactéries ou d'établir les liens évolutifs et les similarités entre différents genres bactériens dépendamment des régions amplifiées (Renvoisé, 2012; Youssef *et al*, 2009).

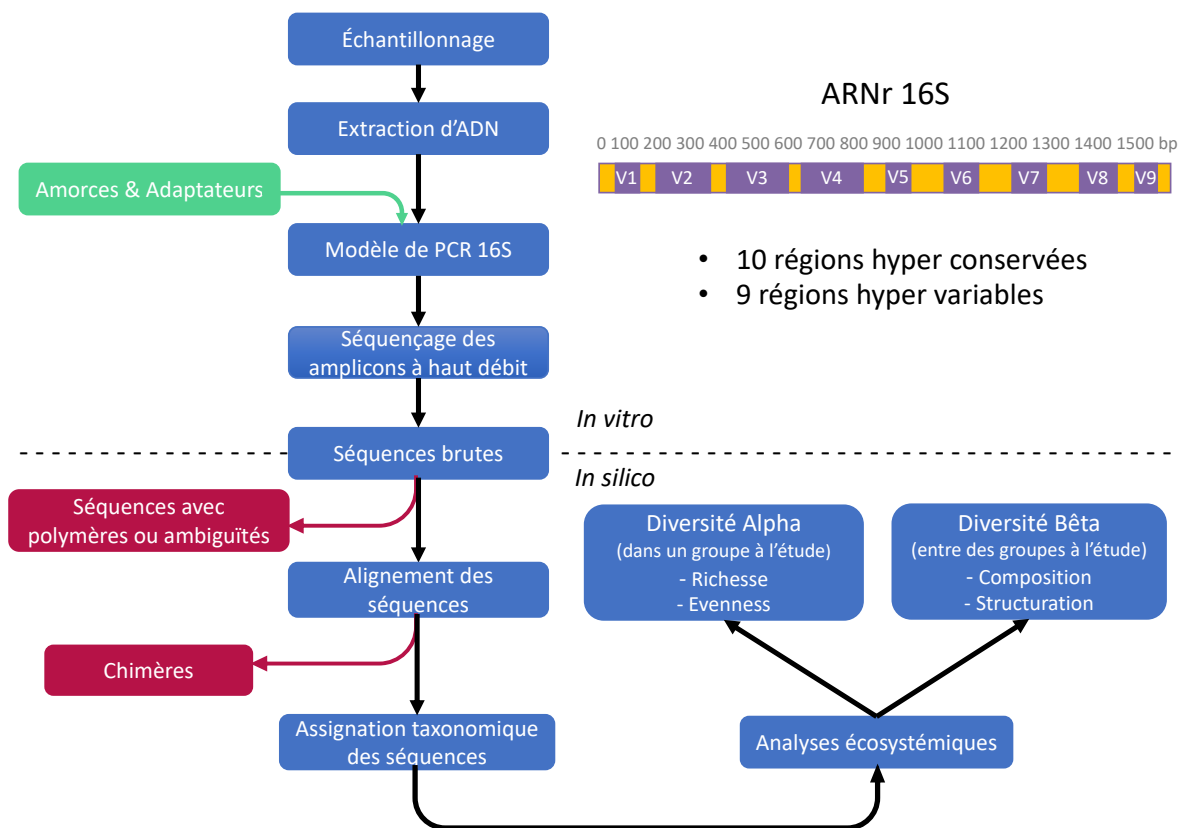


Figure VI. Schéma des principales étapes d'une étude de métagénomique 16S.

Cette méthode comprend une série d'étapes *in vitro* et *in silico* (Figure 3). Tout d'abord, il y a l'extraction de l'ADN à partir de l'échantillon sélectionné à l'aide d'une trousse commerciale

d'extraction (e.g. Mo Bio ou de MP Biomédical). L'efficacité des trousse d'extraction et le type d'échantillon ont un impact sur la qualité de l'extraction. Par exemple, si le ratio de bactéries à Gram positif et à Gram négatif est différent entre deux types d'échantillons et que la trousse d'extraction a plus de facilité à briser la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif, l'ADN extrait surreprésentera les bactéries à Gram positif et sera plus représentatif du contenu de l'échantillon contenant majoritairement ce type de bactéries. Aussi, certaines trousse d'extraction intègrent une étape de lyse mécanique qui donnent une quantité plus importante d'ADN bactérien et assure une lyse uniforme des différentes populations microbiennes que d'autres qui possèdent uniquement une étape de lyse chimique (de la Cuesta-Zuluaga *et al*, 2016). Une fois l'ADN extrait, des amorces sont utilisées sur les régions conservées afin de permettre le début de l'amplification de la région du 16S incluant une région hypervariable. De plus, lors de l'amplification de la région ciblée, des séquences nucléotiques supplémentaires sont ajoutées pour ensuite permettre la compatibilité de l'amplicon avec la technologie de séquençage choisie ainsi qu'avec l'indexation. Ensuite, l'indexation des amplicons sert à associer chaque séquence à un échantillon (ce qui permet le multiplexage rendu possible compte tenu de l'énorme capacité de séquençage en une seule réaction (run)). Il y a aussi une étude d'ajout d'adaptateurs, correspondant à des séquences d'ADN amplifiant fortement la transcription, afin que l'ADN soit reconnu par la plateforme qui va faire le séquençage. Ces adaptateurs sont habituellement avec les amorces. Pour exclure le risque de contamination lors de l'amplification des fragments, l'ajout d'un contrôle négatif et d'un contrôle positif lors ces différentes étapes est primordial. La concentration d'ADN et les conditions du thermocycleur peuvent également influencer les résultats d'une PCR (de la Cuesta-Zuluaga *et al*, 2016). Généralement, les concentrations d'ADN sont donc normalisées et les échantillons distribués

aléatoirement en autant d'amplification que nécessaire. Les fragments amplifiés sont ensuite analysés par un séquenceur à haut débit (NGS) avec une plateforme choisie (Illumina Miseq dans le cadre du présent projet d'étude). Par exemple, la plateforme Illumina Miseq permet de faire un séquençage pour de la métagénomique ciblée (e.g. seulement la région V4 du gène codant pour l'ARNr 16S) ou pour de petits génomes entiers. L'utilisation de cette plateforme est plus rapide et moins coûteuse que celle de la plateforme Illumina HiSeq, qui elle permet le séquençage de génomes entiers ou d'exomes, en plus de l'analyse de transcriptomes entiers (Illumina, 2019). Malgré l'efficacité de cette plateforme, lors des lectures de fragments, ces derniers doivent être analysés afin d'éliminer la présence de polymères, d'ambiguïtés, ou encore de fragments d'ADN trop courts ou trop longs qui seraient présents. Les séquences sont ensuite alignées à l'aide d'une base de données et les chimères détectées sont retirées (Deutsch *et al*, 2014). Les chimères sont des fragments doubles brins hybrides qui ont été produits avec plusieurs séquences mères, mais qui ne devraient pas être ensemble. S'ils ne sont pas retirés, ces nouveaux fragments peuvent alors être interprétés comme de nouveaux organismes alors qu'il s'agit plutôt d'une erreur d'assemblage (Haas *et al*, 2011). Puis, les séquences sont classées par unités taxonomiques opérationnelles (OTU) selon leur niveau de similarité (de la Cuesta-Zuluaga *et al*, 2016). Les séquences qui sont identifiées comme étant identiques à 97% sont généralement regroupées en un même OTU. Certaines analyses se font également à partir de séquences uniques. Des logiciels comme Mothur permettent de nettoyer adéquatement les séquences et permettent leur assemblage en OTU. Une fois la purification complétée et les séquences rassemblées en OTU, l'identification bactérienne et l'affiliation taxonomique de ces micro-organismes sont alors réalisées (Deutsch *et al*, 2014). Pour ce faire, un accès à des bases de données de références telles que RDP, NCBI, GreenGenes et Silva est nécessaire.

Dépendamment de la base de données choisie, les résultats pourront être légèrement différents puisque les rangs taxonomiques sont attribués différemment selon la base de données (alignement des séquences, détection des chimères et construction d'arbre différents) (Balvociute *et al*, 2017). Une fois l'affiliation taxonomique complétée, les analyses écosystémiques permettent de comparer la biodiversité des échantillons, ce qui inclut l'analyse des diversités alpha et bêta. La diversité alpha correspond à la diversité microbienne présente dans un même échantillon. Cette diversité est mesurée d'après sa richesse, soit le nombre de groupes d'individus génétiquement liés ou le nombre d'OTU, ainsi que d'après son « *Evenness* » correspondant à la proportion des espèces présentes ou à la distribution d'OTU (Batut, 2016). La diversité bêta, elle, désigne la diversité microbienne présente entre différents groupes à l'étude (Francour, 2014). Des matrices de distances montrant la position des centroïdes de différents groupes d'échantillons peuvent alors être créées afin de comparer statistiquement si la structuration des communautés microbiennes dans ces groupes est semblable ou non. Ces matrices peuvent être visualisées à l'aide de plusieurs types de graphiques, notamment le NMDS (non-metric multidimensional scaling), qui a pour but de représenter le plus fidèlement possible la position des communautés bactériennes en fonction de leur composition dans un espace multidimensionnel centré-réduit (Mahecha *et al*, 2007). Aussi, des analyses de type LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) peuvent être effectuées afin d'identifier les biomarqueurs qui sont associés avec chacun des groupes comparés (Segata *et al*, 2011), comme le microbiote fécal des troupeaux d'oiseaux reproducteurs de poulet de chair par rapport au microbiote retrouvé à la surface des œufs pondus par ces oiseaux par exemple.

À la suite de l'exposition de la méthode d'analyse de la métagénomique 16S, il est plus facile de percevoir l'intérêt de cette approche pour faire une étude de microbiote telle que présentée dans ce mémoire. Le microbiote retrouvé tout au long du TGI aviaire est de mieux en mieux compris depuis l'arrivée des méthodes dites « culture-indépendantes », comme la métagénomique 16S (Zhu *et al*, 2002). Pour le présent projet de recherche, cette méthode apporte une grande quantité d'informations supplémentaires aux données déjà présentes dans la littérature. En effet, cette technologie, en plus de permettre l'étude des populations de micro-organismes non cultivables, possède une profondeur d'analyse permettant de détecter autant les communautés microbiennes majoritaires que les communautés microbiennes minoritaires jusqu'à l'atteinte de certaines limites toutefois (Centre technique agroalimentaire, 2015). Ces limites sont entre autres liées aux erreurs de séquençage et aux populations bactériennes de tailles trop différentes (Faugier, 2010). La méthode d'analyse de la métagénomique 16S permet donc d'analyser des communautés microbiennes auxquelles les méthodes classiques de bactériologie n'auraient jamais donné accès.

3. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

La présente revue de la littérature souligne l'absence de données concernant la contribution du transfert de l'écosystème microbien fécal des oiseaux à l'établissement du microbiote à la surface des œufs pondus. De plus, l'effet de l'âge sur le microbiote fécal aviaire a été documenté chez les poulets de chair entre eux, ainsi qu'entre des oiseaux de ponte en développement et à l'âge adulte, mais l'influence de ce facteur chez les poules adultes à différents moments pendant la période de ponte, n'est actuellement pas bien documenté. Aussi, les rares études menées sur le microbiote présent à la surface des coquilles d'œufs n'ont pas pu documenter la diversité inter-troupeaux, la diversité à travers le temps, ni fournir de données au niveau des œufs destinés à l'incubation de la production de poulets de chair. De nouvelles études doivent être réalisées afin de connaître la diversité des communautés bactériennes présentes plus haut dans la pyramide de production de poulets de chair afin de mieux gérer les risques pour la santé animale et la santé publique à la suite de ce possible transfert.

L'hypothèse de ce projet de maîtrise était la suivante :

Les communautés bactériennes majoritaires présentes dans l'écosystème microbien fécal des poules vont se retrouver à la surface de la coquille des œufs pondus.

Les objectifs de ce projet de maîtrise étaient les suivants :

- 1) Décrire l'écosystème microbien fécal des oiseaux reproducteurs de poulet de chair, en plus de décrire sa stabilité et sa variabilité à travers le temps et entre différents troupeaux.
- 2) Décrire l'écosystème microbien à la surface des œufs, en plus de décrire sa stabilité et sa variabilité à travers le temps et entre différents troupeaux.
- 3) Évaluer le transfert du microbiote fécal parental vers la surface des œufs pondus.

4. ARTICLE SCIENTIFIQUE

En préparation pour la revue *Frontiers in Microbiology*

Contribution of transfer from birds' fecal microbial ecosystem to the establishment of the microbiota on the surface of laid eggs, application to the broiler breeders.

Sandrine Trudeau^{1*} ; Alexandre Thibodeau¹ ; Marie-Lou Gaucher¹ ; Philippe Fravallo^{1*}.

¹ NSERC Industrial Research Chair in Meat-Safety (CRSV), University of Montreal, Faculty of Veterinary Medicine, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

Correspondence

Sandrine Trudeau

sandrine.trudeau@umontreal.ca

Philippe Fravallo

philippe.fravallo@umontreal.ca

4.1 Abstract

In broiler production, microbial populations present on the surface of the eggshell after oviposition are still poorly characterized, though they may significantly impact both poultry and public health. The aim of this study was to describe the microbiota of broiler breeder hens' feces and of the surface of the eggs laid by these birds in order to evaluate the transfer of the parental fecal microbial ecosystem to the surface of its eggs. A total of twelve breeder flocks in Quebec, Canada were sampled at two different times for a total of 940 feces and 16,400 egg surfaces samples were recovered. Using 16S rRNA gene sequencing, we showed that even if both microbiomes were mainly composed of the phyla Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria and Bacteroidetes, the bacterial community composition and structures differed. Classifications to the family level were done according to RDP and Silva databases consultations, both were used because we documented the importance of describing microbiomes at multiple levels using more than one databases. Our results also showed that both the sampling time and the flock identity were significantly ($p < 0.05$) influenced the alpha-diversity and the beta-diversity of the studied microbiomes. Using a Venn diagram, we showed that 1790 operational taxonomic units (OTUs) were shared between feces and eggshell samples. Sequences associated with genera of potentially pathogenic and spoilage bacteria such as *Acinetobacter*, *Campylobacter*, *Escherichia/Shigella*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* and *Staphylococcus* were shared between types of samples. Interestingly some OTUs, highly represented in the fecal microbiota (e.g. OTUs associated with *Lactobacillus* and *Streptococcus* genera), were not present on egg surface, suggesting a real selection during the microbiota transfer and/or the potential role of environmental contamination. To our knowledge, this is the first study using 16S rRNA sequencing that describes the bacterial communities at both the

broiler breeder feces and the eggshell level, as well as the contribution of the transfer from the fecal microbial ecosystem of laying breeder hens to the establishment of the microbiota on the surface of laid eggs.

Keywords

bacterial transfer, fecal microbiota, eggshell microbiota, broiler breeders, 16S rRNA, animal health, public health

4.2 Introduction

Poultry meat is not only an important source of high-quality proteins, vitamins and minerals, it is also the leanest and most affordable meat product available worldwide, thus supporting its economic worth (Hou *et al*, 2016). Consequently, the broiler chicken industry has grown considerably over the last decades (Leeson and Summers, 2005). However, chickens are known as important biological hazard reservoirs, contributing to the transmission of foodborne pathogens (Kaakoush *et al*, 2014).

The chicken intestinal environment is colonized by such pathogenic bacteria but also by numerous populations of microorganisms, including commensal and transient bacteria (Videnska *et al*, 2013), forming the intestinal microbiota. The symbiotic host-microbes relationship within the gastrointestinal tract of birds is primordial for the host growth and health (Apajalahti *et al*, 2004). The avian microbiota has been better understood since the arrival of cultivation-independent methods, such as 16S rRNA gene amplicon sequencing (Zhu *et al*, 2002).

In broiler chicken production, microbiota studies have been conducted mainly at the broiler chicken level rather than at the breeder hen level, and these studies mainly focused on describing the microbiota composition of different segments of the gastrointestinal tract of those birds (Zhu *et al*, 2002; Lu *et al*, 2003; Gong *et al*, 2006), with only a few that included feces (Kaakoush *et al*, 2014; Videnska *et al*, 2014; Pauwels *et al*, 2015; Hou *et al*, 2016). It has been reported that the avian microbiota composition is affected by multiple factors including birds' age (Knarreborg *et al*, 2002; Videnska *et al*, 2013). Even though, the effect of age has been

demonstrated for the few days old chick (Knarreborg *et al*, 2002), and between a pullet and an adult commercial laying hen (Videnska *et al*, 2013), but the picture remains unclear for laying hens (e.g. broiler breeder hens). Studies have demonstrated that some specific foodborne and poultry pathogens found on the eggshell surface could colonise the hatchlings and therefore affect the growing broiler health, as well as the meat products derived from those birds (Glávits *et al*, 1984; Cox *et al*, 1997a; Forgetta *et al*, 2011; Poulsen *et al*, 2017). Therefore, describing the identity and the diversity of the bacterial communities present at upstream stages of the broiler chicken production pyramid via molecular approaches could help better manage the risk associated with the transmission of those pathogenic microorganisms.

Immediately after oviposition, the egg temperature, which is around 42°C in the hen's reproductive tract, brutally drops due to its contact with an external colder environment, thereby creating a negative pressure that increases the chances for bacteria present on the eggshell surface to penetrate the shell and to contaminate the egg content (Gantois *et al*, 2009). Several studies have reported that the presence of bacterial contamination on the surface of the eggshell could be attributed to various environmental factors such as the type of birds' housing (Jones *et al*, 2016), the laying rate (Chemaly *et al*, 2009), food, water, feces, dust (Im *et al*, 2015), litter (Quarles *et al*, 1970), fluff (Sivaramalingam *et al*, 2013) and/or cuticle's state (Sparks *et al*, 1985). Even the presence of moist organic matter facilitates survival or even growth of pathogenic bacteria on eggshells (Gantois *et al*, 2009). Broiler breeder hens' fecal microbial communities are among the first bacteria encountered by the egg during and after the egg laying process but the contribution of these microorganisms to the establishment of the microbiota on the egg surface is still unknown.

Bacterial communities present on the eggshell surface are still poorly characterized though they are the first bacteria encountered by the broiler chicks after hatching and though they may impact both the poultry and public health. The majority of data available on eggshell bacterial communities comes from research conducted primarily on eggs intended for human consumption and these data come from culture-based studies. The few 16S rRNA gene sequencing studies conducted on wild birds (Shawkey *et al*, 2009; Lee *et al*, 2014; van Veelen *et al*, 2017) and laying hens (Neira *et al*, 2017) have investigated the eggshells microbiota but could not document the inter-flocks' diversity, the diversity in between an interval of time, neither provide information on first steps of the broiler production, i.e. on eggs of incubation.

Here, we evaluated the transfer of the parental fecal microbial ecosystem to the establishment of the eggshell's microbiota. To do so, a 16S rRNA gene sequencing approach was used to describe both the fecal microbiota of broiler breeder hens and the microbiota found on the surface of the eggs laid by these birds at two different sampling time points separated by a 4-week interval and among different flocks. The objectives of this study was to describe the microbiota of the broiler breeder hens' feces and of the surface of the eggs laid by these birds in order to evaluate the transfer of the parental fecal microbial ecosystem to the surface of its eggs.

4.3 Materials and methods

Sample collection

From October 2016 to June 2017, 12 flocks of broiler breeder flocks housed in the province of Quebec, Canada were sampled twice (n=24) at a 4-week interval (Supplementary Table S1). A flock was defined as a group of birds raised in the same barn at the same period of time.

Feces sampling

For each sampling date and using a new pair of nitrile gloves for the collection of pool, four pooled samples of 10 fresh droppings each were collected on the pen floor following a stratified sampling plan. The samples were pooled as described above in order to represent a flock (Larivière-Gauthier *et al*, Manuscript in preparation). Droppings from a same pool were manually homogenized after collection. Pooled fecal samples were immediately and individually transferred to a 2 ml freezing tube (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany) that were dipped into liquid nitrogen. On arrival to the laboratory, samples were stored at -80 °C until further analysis. Sample collection represented a total of 94 pools of fecal material.

Eggshell sampling

During each visit, eggs were taken directly from the nests following a stratified sampling plan. For each sampled egg, the entire surface was rubbed for one minute with sterile wipes that was previously soaked in 0.85% NaCl (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) before being returned to the nests. For each sampling time in each sampled flock, the surface of 70 eggs was scrubbed, at the rate of ten eggshells per wipe (7 samples per visit), while ensuring that new

clean nitrile gloves were used between each wipe. The samples were pooled as described above in order to represent a flock (Larivière-Gauthier *et al*, Manuscript in preparation). In addition, during each farm visit, an extra sterile wipe serving as a negative control was opened in the farm environment for 30 seconds and returned to the bag, without coming into contact with any surfaces. Immediately after collection, each wipe was frozen in liquid nitrogen after being placed in a 50 ml conical tube (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany). Samples were stored at -80 °C upon arrival at the laboratory. Sample collection represented a total of 1640 eggshells surfaces.

DNA extraction and 16S rRNA gene amplicon sequencing

For the eggshell samples, each frozen wipe was aseptically transferred to a 24 oz sterile plastic bag (Whirlpak, Nasco, Fort Atkinson, WI, USA) containing 20 ml of phosphate buffered saline (PBS) and was stomached for 1 min 30 s. Each wipe was twisted in order to extract as much liquid as possible. The recovered volume was transferred to a 50 ml conical tube (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany) and centrifuged for 25 minutes at 4 500 x g. The supernatant was discarded and the remaining pellet was used for DNA extraction.

The total bacterial DNA recovered from both the eggshell and feces samples were extracted using the PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit (QIAGEN, Toronto, Ontario, Canada) according to the manufacturer instructions with slight modifications as follows. A total of 250 mg (± 10 mg) of fecal material or the entire pellet from eggshell wipes was transferred to the bead-beating tube. Two heat treatments were subsequently performed: 65°C for 10 minutes and 95°C for 10 minutes. Cells were then mechanically lysed twice using MP Fastprep (Santa

Ana, MP Biomedicals) for 45 sec at 6,5 m/s, with 10 minutes waiting time on ice between the two bead-beating runs. The glass bead tubes were centrifuged at 10, 000 x g for 5 minutes at room temperature (20°C) and the remaining steps of the DNA extraction protocol were conducted according to the manufacturer's instructions. DNA concentrations were measured using the Qubit 3.0 broad range assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) for feces samples and the Qubit 3.0 high sensitivity assay for eggshell samples using a DeNovix QFX Fluorometer (Fisher Scientific, Ottawa, Canada). Purified DNA samples were stored at -20 °C.

The 16S ribosomal RNA gene amplicons to be subjected to the Illumina Miseq sequencing were prepared using Invitrogen™ Platinum™ SuperFi™ DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). As the DNA concentrations obtained from the extractions performed on eggshell samples were very low (< 1ng/μl), 14.5 μl of the total DNA extraction were used for each 30 μl reaction volume. For the feces samples, 12 ng of DNA were used per 30 μl reaction volume. A 291 bp segment of the V4 region of the 16S rRNA gene was amplified using the following primers 515FP1-CS1F ACACTGACGACATGGTTCTACAGTGCCAGCMGCCGCGGTAA and 806RP1-CS2R TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTGGACTACHVGGGTWTCTAAT (Caporaso et al, 2012). The thermal cycling protocol started with an initial denaturation at 95 °C for 15 mins, an amplification step comprising 23 cycles of denaturation step at 95°C for 30 s, annealing step at 55 °C for 30 s, and of elongation step at 72 °C for 180 s. A final elongation step at 72 °C for 10 min was added. A negative control (H₂O) and a positive control (Mock community) (Cedarlane, Burlington, US) were included during the amplification. A 5 μl volume of each reaction was used to run on a 2% agarose gel to confirm the PCR product amplification and then, samples

were sent on dry ice to McGill University and Génome Québec Innovation Centre (Montréal, Québec, Canada) for Illumina Miseq PE250 sequencing.

Sequence data processing

All the sequenced samples were processed using Mothur v.1.39.5 following the Miseq standard operation procedure (https://www.mothur.org/wiki/Miseq_SOP, accessed April 2018). To begin, eggshell and feces sequences were analyzed together. As a first step, reads from each sample set were combined using the `make.contigs` command. Sequences that contained polymers or ambiguity were rejected using `screen.seqs` and identical sequences were merged with the `unique.seqs` command. The remaining sequences were aligned using the Silva database `silva.nr_v128` (https://www.mothur.org/wiki/Silva_reference_files) and the chimeras were removed. Feces and eggshells sequences were segregated using `remove.groups`. Sequences originating from the control eggshell sample were removed from the eggshell sequences. The new eggshellsdataset and the fecesdataset were merged (`merge_dataset`) for the remaining analysis using `merge.count` and `merge.files` commands. The sequences were classified using both Silva `silva.nr_v128` (https://www.mothur.org/wiki/Silva_reference_files) and RDP `trainset16_022016.pds` (https://www.mothur.org/wiki/RDP_reference_files) databases to describe the samples microbiota composition at the phylum and family-level. Only the bacterial and archaeal sequences were kept and clustered into operational taxonomic units (OTU) at a genetic distance dissimilarity of 3%. For alpha diversity analysis, the number of observed OTUs, the Inverse Simpson and the Shannon even indices were calculated using a subsample with the size of the smallest library with 1000 iterations; feces and eggshell samples were treated separately. The results obtained were compared between groups using Kruskal-Wallis test and

Student's t-test (unpaired and paired where applicable) with a significance level of 0.05. These statistical analyses were run on GraphPad Prism 7 (Prism, LaJolla, USA). For beta diversity analysis, a distance matrix comparing all the samples was created using the Jaccard and the Yue & Clayton indices. The different groups were statistically compared using the Analysis of molecular variance test (AMOVA) with a significance level of 0.05 and the results were visualized using a Non-metric multidimensional scaling 2 axis plot (NMDS). Biomarkers that were associated with specific conditions were highlighted using the linear discriminant analysis effect size (LEfSe). Finally, OTUs that were observed rarely in the final merge_dataset (nseqs=1) were removed using the remove.rare command and a Venn diagram was generated to compare the OTU shared among groups. Command lines used in Mothur are available at <https://github.com/CRSV>.

4.4 Results

Bacterial communities of feces

A total of 5,876,676 sequences were identified from the feces samples. Most of the sequences were bacterial sequences (99.8%), followed by the archaeal sequences (0.2%). An average of 62,661 sequences were found, this number varying between 39,680 and 105,243 sequences among the analyzed samples.

Following the taxonomic classification of the obtained sequences, a total of twenty-two and twenty different phyla were identified according to Silva and RDP databases, respectively (Supplementary Table 2). An average of thirteen phyla were found per sample, again this number varying between seven and eighteen phyla depending on the sample. Figure 1. illustrates the phyla identified with a relative abundance superior to 1% of total microbiota according to each of the database used.

A total of 169 and 193 families were identified from feces samples according to Silva and RDP databases, respectively (Supplementary Table 2). The samples contained an average of 75 families, with minimum and maximum numbers ranging from 56 to 104 families, respectively. The major families (>1% of total microbiota) are represented in Figure 2. Results generated by the two databases differed only by the presence of one major family each, i.e. *Clostridiaceae* (3%) for Silva and *Bacteroidales_unclassified* (1%) for RDP.

Bacterial communities on eggshells

For eggshells samples, a total of 207,225 sequences were identified. Bacterial sequences represented over 99.6% of the sequences, followed by archaeal sequences that represented over 0.1% of the sequences obtained. An average of 1,264 sequences were identified, this number varying between 546 and 6,216 sequences among samples.

Sequence classification generated a total of thirty-six and twenty-nine different phyla were identified depending on assignation with Silva and RDP databases, respectively (Supplementary Table 2). An average of twelve phyla were identified per sample, this number varying between six and twenty-two phyla. Figure 1B illustrates the phyla found with a relative abundance superior to 1% of total microbiota according to Silva and RDP. Slight differences were observed when comparing results based on the two classifications. For Silva, Tenericutes and Bacteria-unclassified also represented 3% and 1%, respectively. Contrariwise, for RDP, Bacteria-unclassified represented 6%.

A total of 344 and 257 families were found on eggshell surface according to Silva and RDP databases, respectively (Supplementary Table 2). The samples contained an average of 76 families ranging from 48 to 138 families. The main families (>1% of total microflora) are displayed in Figure 2. Several noticeable differences were however identified between the two databases.

Overall, when comparing the two databases used, several differences were observed. These differences were mainly related to the ability of the database to assign an identity to the

sequences obtained. Indeed, sequences that remained unclassified with one database were assigned an identity when using the other database. These databases seem complementary, but since the use of Silva generated unknown sequences while RDP did not, RDP database was retained for the rest of the analyses.

Potential pathogens and spoilage bacteria detection

Potential pathogens and potential spoilage bacteria were found in broiler breeder hens' feces and on eggshells (Table 1). A flock was considered positive when at least one sample contained the sequence. Our results showed that the percentages of positive flocks and samples varied greatly depending on the bacterial genus considered. In most cases, the relative abundances of these genus were very low. However, it should be highlighted that some bacterial genera were over represented on eggshells: *Acinetobacter*, *Campylobacter*, *Proteus* and *Salmonella* were 100 times more represented in the bacterial communities identified on egg surfaces communities than in feces, *Listeria* and *Pseudomonas* were 10 times more represented on eggshells communities compared to feces and other genera such as *Escherichia/Shigella*, *Helicobacter* and *Staphylococcus* were equally represented in feces and eggshells communities.

Alpha and beta diversities

For each feces and eggshell samples, a total of 25,038 OTUs were identified. For feces, an average of 975 OTUs were identified per sample, this number varying between 506 and 1,608 OTUs among samples. For egg surfaces, an average of 358 OTUs were identified per sample, again this number ranging between 190 and 667 OTUs among samples.

For alpha diversity, the flock and the sampling time were identified as important factors. They both had a significant effect on the different diversity indices calculated for eggshell samples, and the sampling time only had a significant effect on the feces samples (Table 2).

For beta diversity, the Jaccard index, which considers the presence or absence of specific OTUs, and the Yue & Clayton measure, which considers the relative abundance of OTUs, were used to compare the structure of bacterial communities between the different sample groups. Examples of Jaccard distances matrices plotted using 2 dimensions NMDS comparing feces samples at Day 0 and after 4 weeks (Figure 3A), eggshell samples at Day 0 and after 4 weeks (Figure 3B) and feces and eggshell samples (Figure 3C) are presented. All the groups were statistically compared using an analysis of the molecular variance (AMOVA) (Table 3, Supplementary Table 3). The results showed that the fecal microbiota, as well as the eggshell bacterial communities significantly evolved during the 4- week sampling interval ($p < 0.05$). The magnitude of this change also appeared to be flock specific ($p < 0.001$). In addition, the fecal bacterial community composition and structuration significantly differed from the one observed for the egg surface ($p < 0.001$). Biomarkers that were most strongly associated with each group (LDA Score [\log_{10}] > 4) were highlighted using LEfSe. Six genera were detected with high LDA scores representing marked abundances in feces, such as *Lactobacillus* and *Streptococcus* genera, and seven were overrepresented in proportion on eggshells, such as *Ruminococcaceae_unclassified* and *Clostridiales_unclassified* genera (Figure 4).

Transfer of bacterial communities

In order to identify the bacterial communities that were systematically shared between the feces of broiler breeders and their laid eggs, a Venn diagram was created at the OTU level with the final merge_dataset without singletons (Figure 5). Only OTUs that were shared between the two sample types for both sampling time points were considered, representing a total of 1790 OTUs. Among them, some OTUs were found more than 1000 times belonged to the genera *Lactobacillus*, *Brachy bacterium*, *Staphylococcus*, *Lachnospiraceae_unclassified*, *Jeotgalicoccus*, *Bacteroides*, *Ruminococcaceae_unclassified*, *Corynebacterium*, *Salinicoccus* and *Clostridiales_unclassified*. Also, some of these 1790 OTUs were found more than 500 times and belonged to the genera *Enterococcus*, *Yaniella* and *Brevibacterium*, *Romboutsia* and *Bacteria_unclassified*.

Finally, some sequences associated with each of the potentially pathogenic and spoilage bacteria were shared between feces and eggshell samples (Tableau 4). A flock was considered to have positive feces or positive eggshells when at least a sequence of a potential pathogen or spoilage bacteria was identified from one of the four or one of the seven samples, respectively. It should be highlighted that in some flocks, certain sequences associated with potentially pathogenic and spoilage bacteria present on eggshells (*Acinetobacter*, *Listeria*, *Salmonella*, *Proteus* and *Campylobacter*) could not be related to their presence in the feces (Tableau 4). For example, for 58% of the sampled flocks, some sequences associated with the genus *Campylobacter* were identified on eggshells whereas these sequences were not identified from their related feces samples. However, 17% of the sampled flocks (different flocks), were

harboring some other sequences associated with *Campylobacter* in both the eggshell and feces samples.

4.5 Discussion

The current study describes, for the first time, the contribution of the bird's fecal microbiota to the establishment of the microbiota found on the surface of the laid eggs. The current study was conducted at the breeder bird level of broiler production chain. A first step towards describing the transfer of the parental microbiota to the eggshell highlighted the bacterial community structuration of breeder feces and eggshells, an information that is presently absent from the scientific literature. The analyses of the broiler breeder hens' fecal bacterial community composition, as well as of the microbiota of the surface of the eggs laid by these birds at two sampling times and between different flocks, are therefore also innovative elements of this work.

The fecal microbiota of broiler breeder hens was mainly (>90%) composed of the Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria and Bacteroidetes phyla. Similar results have been reported for wild birds (Banks *et al*, 2009; Lu *et al*, 2009), for laying hens (Videnska *et al*, 2013, 2014) and for broiler chickens (Kaakoush *et al*, 2014; Videnska *et al*, 2014; Pauwels *et al*, 2015; Hou *et al*, 2016). It should be noted that, in addition to these major phyla commonly represented, the current study identified nineteen other phyla that were found in the bird's feces, among which some have never been described in chickens feces to our knowledge, i.e. Elusimicrobia, Nitrospirae, Planctomycetes, Saccharibacteria, and Hydrogenedentes,

Results showed that *Lactobacillaceae* was the most dominant family found in feces, a result which is in agreement with those reported by other studies (Forgetta *et al*, 2011; Kaakoush *et al*, 2014; Pauwels *et al*, 2015; Stanley *et al*, 2015; Oakley and Kogut, 2016; Yan *et al*, 2017).

The reported role of *Lactobacillaceae* in improving gut health through a modulation of the immune system conferring antagonistic activities against pathogens (De Maesschalck *et al*, 2015) suggests that birds with higher relative abundance of *Lactobacillaceae*, while still having a diverse microbiota, might be healthier than those with lower proportions of *Lactobacillaceae* (Singh *et al*, 2012; Deusch *et al*, 2014). *Streptococcaceae* and *Peptostreptococcaceae* were also part of the most abundant families belonging to Firmicutes, a result that is in agreement with the experiment conducted by Kaakoush and al. (2014). However, these authors and others reported that *Ruminococcaceae* was also dominant in Firmicutes (Singh *et al*, 2012; Videnska *et al*, 2014; Kaakoush *et al*, 2014), whereas this family represented only 1% of the families identified in the present work. Some studies indicated that the presence of *Ruminococcaceae* was negatively correlated with the feed conversion ratio and therefore with the weight gain (Singh *et al*, 2012; Menni *et al*, 2017). Broiler breeders are genetically selected for their high conversion index supporting the fact that the birds sampled in this study had low proportions of *Ruminococcaceae* in their fecal microbiota. Results also revealed that *Enterobacteriaceae*, *Corynebacteriaceae* and *Bacteroidaceae* dominated respectively the Proteobacteria, Actinobacteria and Bacteroidetes phyla, an observation also made by other authors (Singh *et al*, 2012; Videnska *et al*, 2014; Kaakoush *et al*, 2014). In addition to corroborate the information of the few studies of birds' fecal microbiota, our results also revealed greater bacterial community richness.

The majority of the known information on eggshell bacterial composition comes from culture-based studies. It has been reported that a clean eggshell harbored around 10^3 bacteria per egg (Sauveur, 1978). Only a few studies have investigated the eggshells microbiota using a high-throughput sequencing approach (Shawkey *et al*, 2009; Lee *et al*, 2014; van Veelen *et al*,

2017; Neira *et al*, 2017). The current work identified a total of 37 phyla from the eggshell surface. A similar richness was reported on wild birds' eggs (Shawkey *et al*, 2009; Lee *et al*, 2014), while a lower richness was reported for laying hens living in a free-range system (22 phyla) (Neira *et al*, 2017). Our work also indicated that more than 90% of the eggshell microbiota was represented by members of the Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria and Bacteroidetes phyla, phyla that were also dominant in the feces samples analyzed. Such microbiota structuration was also reported in other studies describing the eggshell surface of wild birds (Lee *et al*, 2014) and of laying hens from free-range system (Neira *et al*, 2017). Interestingly for cage-housed hens (Neira *et al*, 2017), Fusobacteria was reported as the second predominant phylum, suggesting a role of the hen housing system on eggshell bacterial major communities. With the exception of two phyla, i.e Nitrospinae and Thermo-desulfobacteria, the phyla reported by Neira and al. (2017) were also identified in the present study. The present study allowed for the identification of ten phyla that had never been associated with eggshells, i.e. Candidatus Saccharibacteria, Euryarchaeota, Parcubacteria, SR1, Thaumarchaeota, FBP, RsaHf231, TM6_(Dependentiae), BJ-169 and candidate_division_WPS-1.

Results showed that at least 257 families were found on the surface of the eggshells sampled, a richness also reported on wild birds' eggs (Shawkey *et al*, 2009). However, the identity of the major families clearly differ from one study to another. For example, the current work showed that *Ruminococcaceae* was the most abundant member of Firmicutes, while *Lachnospiraceae* was the dominant family in the work from Neira and al. (2017) on free-range birds. To our knowledge, some of the major families identified in the current study have never been described on eggshells, i.e. *Bacillaceae_2*, *Family_XI* and *Mollicutes_RF9_fa*. Factors

such as the birds breed, the production system and the sampling procedure could all contribute to these differences (Neira *et al*, 2017).

In the current study, potential animal and human pathogens (Lu *et al*, 2003; Hameed and Amin, 2010; Nasrin *et al*, 2012; Crespo *et al*, 2013; Thomas *et al*, 2013; Ebringer and Rashid, 2014; Humphrey *et al*, 2014; Rouger *et al*, 2017), and spoilage bacteria (Techer *et al*, 2013; Neira *et al*, 2017), identified at the genus level, were reported from both the feces and eggshell samples analyzed. Even if most genera were present in low abundances, they can have important consequences on chicks, on their congeners and ultimately on public health. For feces, studies conducted on broiler chickens identified also some of these genera in fecal (Chien *et al*, 2011; Singh *et al*, 2012; Yan *et al*, 2017) or cecal samples (Zhu *et al*, 2002) with different relative abundances. Eggshells from laying hens presented these genera in different relative abundances (Neira *et al*, 2017) or detection rates (Cook *et al*, 2003; Jones *et al*, 2012). Interestingly according to our results some genera were over represented in eggshell microbial communities as compared to fecal ones. Then, considering that the fecal bacterial communities contribute to the contamination of the egg surface, this suggests a non-homogeneous transfer, suggesting a bacterial selection clearly observed here on the freshly laid eggs and factors affecting this selective transfer should be further described.

Analyses revealed that the alpha-diversity of feces and eggshell microbiotas were differentially affected by the sampling time and by the flock. For feces, alpha-diversities changes were supported only by the sobs index and for some specific flocks only. Significant changes in richness and community diversity among the two sampling time points were

previously reported in a study conducted on broiler chickens (Oakley and Kogut, 2016). These differences suggest that alpha-diversity of the fecal microbiota is more stable in adult laying hens than in younger birds. For eggshells, alpha-diversity appeared strongly affected by the flock and to lesser extent by the sampling time point, an observation that has not been previously reported.

This study also showed that the beta-diversity of feces, as well as eggshell microbiota was affected by both the sampling time and the flock. For feces, some studies have already reported significant differences over time for broiler chickens fecal microbiota (van der Wielen *et al*, 2002; Sekelja *et al* 2012; Oakley and Kogut, 2016), but none has investigated this parameter for adult breeder hens. Some authors have also reported inter-flock fluctuations for commercial laying hens (Videnska *et al*, 2013) and broiler chickens (Kaakoush *et al*, 2014; Hou *et al*, 2016), these fluctuations that had been associated to different parameters such as the birds' origins (Videnska *et al*, 2014), or types of litter or feed (Stanley *et al*, 2015). In the current study, over time differences were supported by the presence of minor communities according to the Jaccard index which considers the presence or absence of specific OTUs, still relevant when considering pathogenic bacteria. For eggshells, our results showed a quite systematic evolution of the egg surface microbiota structure for a flock during a 4-week interval and were not previously reported in the actual literature. In a production chain perspective, our results suggested that the chicks, during hatching, will be exposed to different bacterial populations, depending on the flock of origin and on a specific moment during the lay period. Moreover, according to the LEfSe, some OTUs that were highly represented in the fecal microbiota (e.g. OTUs associated with *Lactobacillus* and *Streptococcus* genera) were not present on egg

surfaces. These results reinforce the idea of a selection during the microbiota transfer, probably explained by the differential capacity of some bacteria to attach to or survive on the eggshell surface. These analyses suggested other origin than fecal for some OTU identified on shell. The majority of the OTUs systematically shared between shell and feces were previously reported along the gastrointestinal tract and/or in the feces of broiler chickens (Lu *et al*, 2003; Hou *et al*, 2016; Le Gall-David *et al*, 2017; Qioa *et al*, 2018). Some others have been also identified in sample from the environment of poultry farms (i.e. in air, litter and dust samples) (Collins *et al*, 1988; Weidhaas *et al*, 2010; Martin *et al*, 2011; O'Brien *et al*, 2016). A recent study involving passerine birds revealed that the eggshells had richer and more diverse bacterial communities than those found in the female cloaca. The authors identified the skin and feather bacterial communities as major contributors to the eggshell microbiota (van Veelen *et al*, 2017). Another study conducted on Eurasian Magpie reported that the eggshell microbiota was largely influenced by the microorganisms found in the nests (especially the feathers), whereas the maternal gut or cloaca appeared to be minor contributors (Lee *et al*, 2014). In the present study on broiler breeders, the 1790 shared OTUs represented 31% of the OTUs detected in eggshells samples and 15% of the OTUs found in feces samples, suggesting once more that if feces would contribute to the establishment of the microbiota found on the eggshell, other sources could be contributors as well.

For numerous OTU found on eggshells, including potentially pathogenic bacteria e.g. *Listeria*, *Salmonella*, *Proteus* and *Campylobacter*, their presence could not be explained by their presence in feces, suggesting once again an environmental contribution. A study on wild birds suggested that parental care could affect the eggshell microbiota by protecting the egg by

increasing the abundance of some antibiotic-producing bacteria, e.g. *Bacillus*, on the eggshells, or by transferring these bacteria from their feathers (Lee *et al*, 2014). As the poultry production and its environment seem to be a favorable reservoir for *Proteus* (Yeh *et al*, 2018), *Listeria* (Dahshan *et al*, 2016), *Salmonella* and *Campylobacter* (Jones *et al*, 2016), improved biosecurity measures would contribute to prevent the colonization of the hatchlings by pathogens coming from the contamination found on the eggshell surface.

The current study identified several potential pathogens and spoilage bacteria that were shared between the broiler breeder feces and the surface of their laid eggs such as *Acinetobacter*, *Campylobacter*, *Escherichia*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Salmonella* and *Staphylococcus*. For *Campylobacter*, a recent research work conducted on laying hens also reported this sharing for birds living in cage-free systems (Jones *et al*, 2016). A recent study reported transmission of *Escherichia* from the breeder parents (fecal samples) to the shell of their laid eggs (Projahn *et al*, 2016). Regarding *Salmonella*, it is known that the bacterium can contaminate both the outer shell of the egg and, for some serotype, the inside of eggs through an infection of the hen's reproductive tract or feces (Gantois *et al*, 2009). For *Pseudomonas*, it's been reported that, in presence of water, e.g. the water present in fecal matters, Pseudomonads have the capacity to digest the cuticle, giving the bacteria better access to the pores and consequently increasing the risks of internal contamination of the egg by pathogens (Cook *et al*, 2003, 2005). Given the possible involvement of these bacteria in diseases or in food spoilage, these sharings are relevant both in term of bird health, egg conservation and food safety.

4.6 Conclusions

This study documented for the first time the contribution of the fecal microbiota of laying hens (i.e. broiler breeders) to the establishment of the microbiota of their eggs laid. This work also provided the first description of eggshell and feces microbiomes of broiler breeding birds using high throughput sequencing approach. Our results showed that these microbiomes were dynamic over time and varied among flocks in these conditions. It also revealed the presence of potentially pathogenic bacteria on the surface of eggs, a presence that could not always be related to their identification in fecal matters. Therefore, we believe that all stakeholders, including producers, breeders, veterinarians, inspectors and researchers, should be aware of the microorganisms present higher up in the production pyramid in order to better manage the risks present for animal and for public health.

Acknowledgments:

We would like to thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), JEFO Nutrition Inc. and the Quebec consortium for industrial bioprocess research and innovation (CRIBIQ), financial partners of the Industrial Research in Meat. We also thank Ludovic Lahaye and Benoît Lanthier from JEFO Nutrition Inc. for their collaboration, and La Coop fédérée for their participation.

Author contributions:

Designed the experiments: AT, MG, PF. Performed the experiments: ST. Analyzed the results: ST, AT, PF. Discussed the results and wrote the manuscript: ST, AT, MG, PF.

Conflict of interest statement:

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Tables

Table 1. Data¹ on potential pathogens and spoilage bacteria found in the feces and on the eggshells.

	Positive flocks (%)		Positive samples (%)		Relative abundance (%)	
	Feces	Eggshells	Feces	Eggshells	Feces	Eggshells
<i>Acinetobacter</i> (S)	92	100	43	87	2.5 x 10 ⁻²	1.7 x 10 ⁰
<i>Campylobacter</i> (P)	25	75	5	8	2.4 x 10 ⁻⁴	1.2 x 10 ⁻²
<i>Escherichia/Shigella</i> (P)	100	100	88	22	2.9 x 10 ⁻²	4.2 x 10 ⁻²
<i>Helicobacter</i> (P)	100	83	66	15	1.7 x 10 ⁻²	2.2 x 10 ⁻²
<i>Listeria</i> (P)	33	17	4	1	2.2 x 10 ⁻⁴	9.7 x 10 ⁻⁴
<i>Pseudomonas</i> (S)	100	100	40	75	2.0 x 10 ⁻²	3.1 x 10 ⁻¹
<i>Proteus</i> (P, S)	58	83	12	10	3.1 x 10 ⁻⁴	1.3 x 10 ⁻²
<i>Salmonella</i> (P)	17	25	2	3	3.4 x 10 ⁻⁵	6.3 x 10 ⁻³
<i>Staphylococcus</i> (P)	100	100	100	100	9.9 x 10 ⁻¹	8.6 x 10 ⁻¹

¹According to RDP database.

(P): Potential pathogens bacteria, (S): Spoilage bacteria

Table 2. Comparison of alpha-diversity indices of feces and eggshells across broiler breeder flocks according to the time and the flock. The means were based on 1000 subsampling of 39,680 sequences for the feces and the eggshells, respectively.

Broiler breeder Groups	Feces			Eggshells		
	Sobs	Inv. Simpson's	Shannon even	Sobs	Inv. Simpson's	Shannon even
Flock 1 Day0 vs 4weeks	748	11	0.50	207	51	0.86
Flock 2 Day0 vs 4weeks	799	12	0.51	173	13	0.71
Flock 3 Day0 vs 4weeks	893	15	0.50	235	101	0.91
Flock 4 Day0 vs 4weeks	908	16	0.53	219	62	0.88
Flock 5 Day0 vs 4weeks	900	17	0.52	245	65	0.85
Flock 6 Day0 vs 4weeks	880	18	0.53	223	63	0.84
Flock 7 Day0 vs 4weeks	825	16	0.51	240	85	0.90
Flock 8 Day0 vs 4weeks	740	11	0.48	246	105	0.92
Flock 9 Day0 vs 4weeks	658	12	0.47	253	89	0.91
Flock 10 Day0 vs 4weeks	794	13	0.50	276	97	0.91
Flock 11 Day0 vs 4weeks	719	11	0.47	207	36	0.77
Flock 12 Day0 vs 4weeks	786	14	0.50	251	80	0.88
All Flocks Day0 vs 4weeks*	806*	14*	0.50*	230*	70*	0.86*
All Flocks**	0.09**	0.2**	0.5**	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**

p value under significant level ($p < 0.05$) are represented in bold according to a T-Test unpaired or a T-Test paired*

** P value of Kruskal Wallis Test

Table 3. Microbiota structure comparison of feces and eggshells across broiler breeder flocks according to the time and the flock.

AMOVA (p value)

Compared Groups	Feces		Eggshells	
	Jaccard	Yue & Clayton	Jaccard	Yue & Clayton
Flock 1 Day0 vs 4weeks	0.066	0.786	0.001	0.005
Flock 2 Day0 vs 4weeks	0.035	0.074	<0.001	0.484
Flock 3 Day0 vs 4weeks	0.038	0.005	0.004	0.14
Flock 4 Day0 vs 4weeks	0.047	0.006	0.001	<0.001
Flock 5 Day0 vs 4weeks	0.287	0.609	0.004	0.002
Flock 6 Day0 vs 4weeks	0.044	0.229	0.002	<0.001
Flock 7 Day0 vs 4weeks	0.028	0.032	0.001	<0.001
Flock 8 Day0 vs 4weeks	0.006	0.039	<0.001	0.001
Flock 9 Day0 vs 4weeks	0.096	0.039	0.001	<0.001
Flock 10 Day0 vs 4weeks	0.024	0.032	<0.001	<0.001
Flock 11 Day0 vs 4weeks	0.068	0.032	0.001	0.017
Flock 12 Day0 vs 4weeks	0.382	0.368	0.001	0.014
All Flocks Day0 vs 4weeks	0.019	0.86	0.006	0.007
All Flocks*	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
		Jaccard		Yue & Clayton
All Flocks Feces vs Eggshells		<0.001		<0.001

P value under significant level ($p < 0.05$) are represented in bold

*All the comparisons are represented in Supplementary Table S2

Table 4. Percentage of flocks for which genus sequence¹ were detected* on both eggshells and feces samples, and for which genus sequence¹ were detected* on the eggshells, but that were found to be absent in feces.

Genus sequence	Flock (%)	
	Eggshells+ / Feces+	Eggshells+ / Feces-
<i>Acinetobacter</i> (S)	92	8
<i>Campylobacter</i> (P)	17	58
<i>Escherichia/Shigella</i> (P)	100	0
<i>Helicobacter</i> (P)	83	0
<i>Listeria</i> (P)	8	8
<i>Proteus</i> (P, S)	50	0
<i>Pseudomonas</i> (S)	100	33
<i>Salmonella</i> (P)	8	17
<i>Staphylococcus</i> (P)	100	0

The taxonomic assignment is according to RDP database.

*At least one sample within the flock contained sequences of the bacterial genus.

(P): Potential pathogens bacteria, (S): Spoilage bacteria.

Figures

Figure 1. Stacked-bar chart illustrating the major phyla (>1% of total microbiota) found in feces and eggshell samples according to Silva and RDP databases.

Figure 2. Stacked-bar chart illustrating the major families (>1% of total microbiota) found in feces and eggshell samples according to Silva and RDP databases.

Figure 3. Examples of the 2 dimensions NMDS plots using Jaccard distances matrices to compare A) broiler breeder fecal microbiota beta-diversity according to the time of sampling, B) eggshell microbiota beta-diversity according to the time of sampling, and C) overall microbiota according to the sample type.

Figure 4. Comparison of the broiler breeder fecal microbiota and eggshell microbiota using LEfSe. Histogram of the LDA scores for significantly differentially abundant biomarkers among groups (LDA Score [\log_{10}] > 4). Red = Feces and Blue = Eggshells.

Figure 5. Comparison of the shared OTUs by groups using a Venn diagram. The groups compared were: i) eggshells at Day 0 of the study; ii) eggshells 4 weeks after; iii) feces at Day 0 of the study; iv) and feces 4 weeks after.

Figure 1

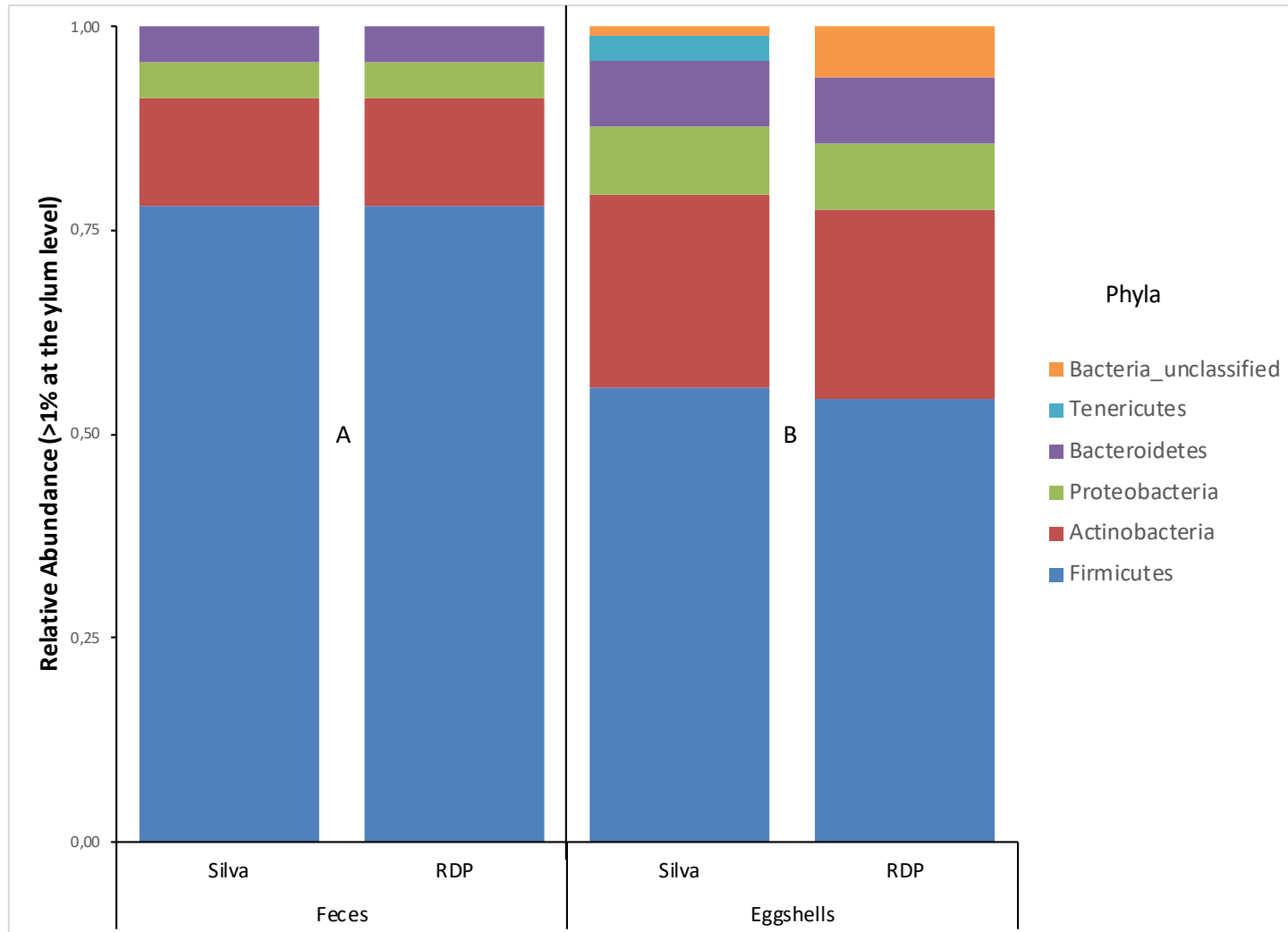


Figure 2

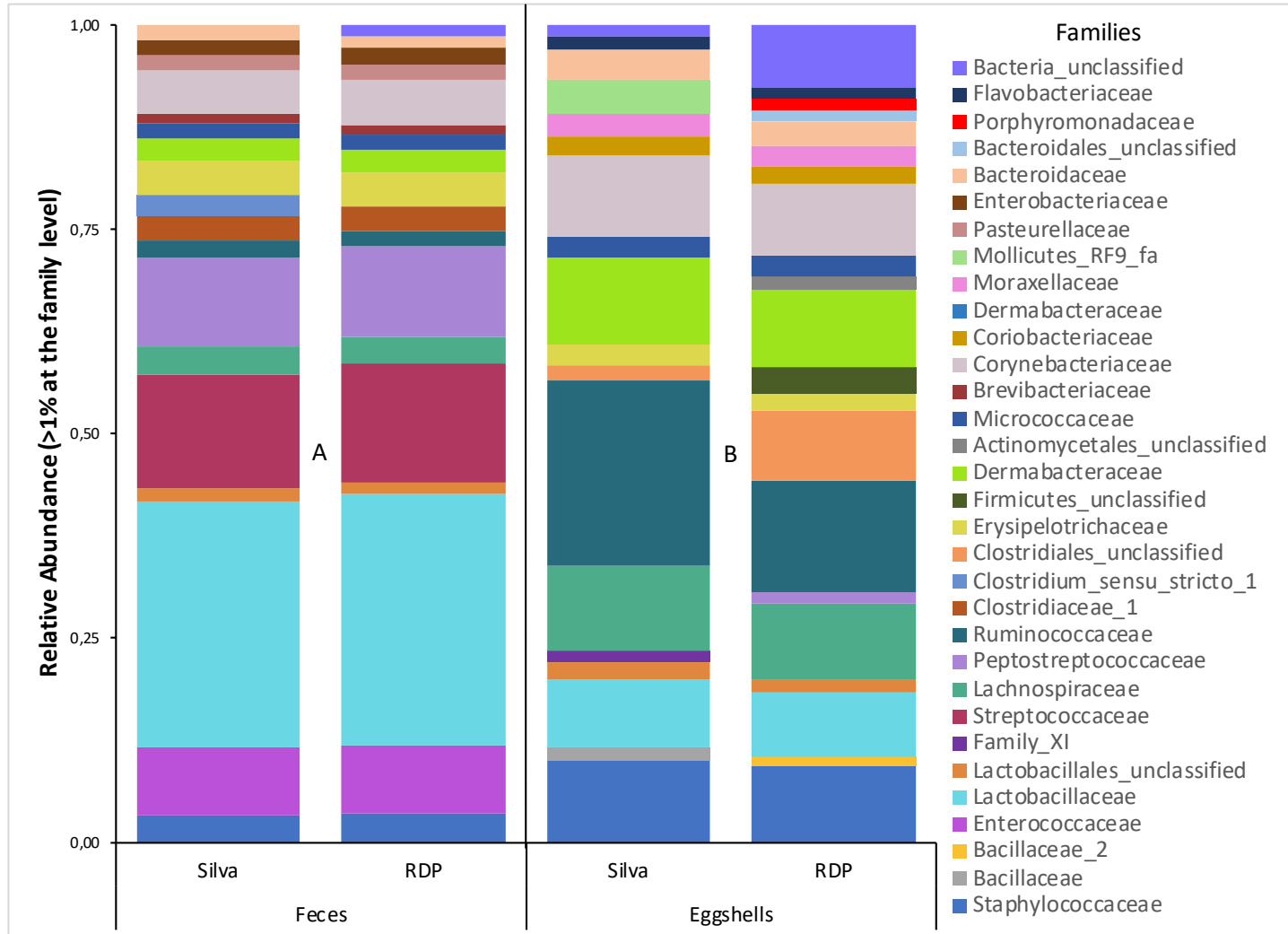


Figure 3A

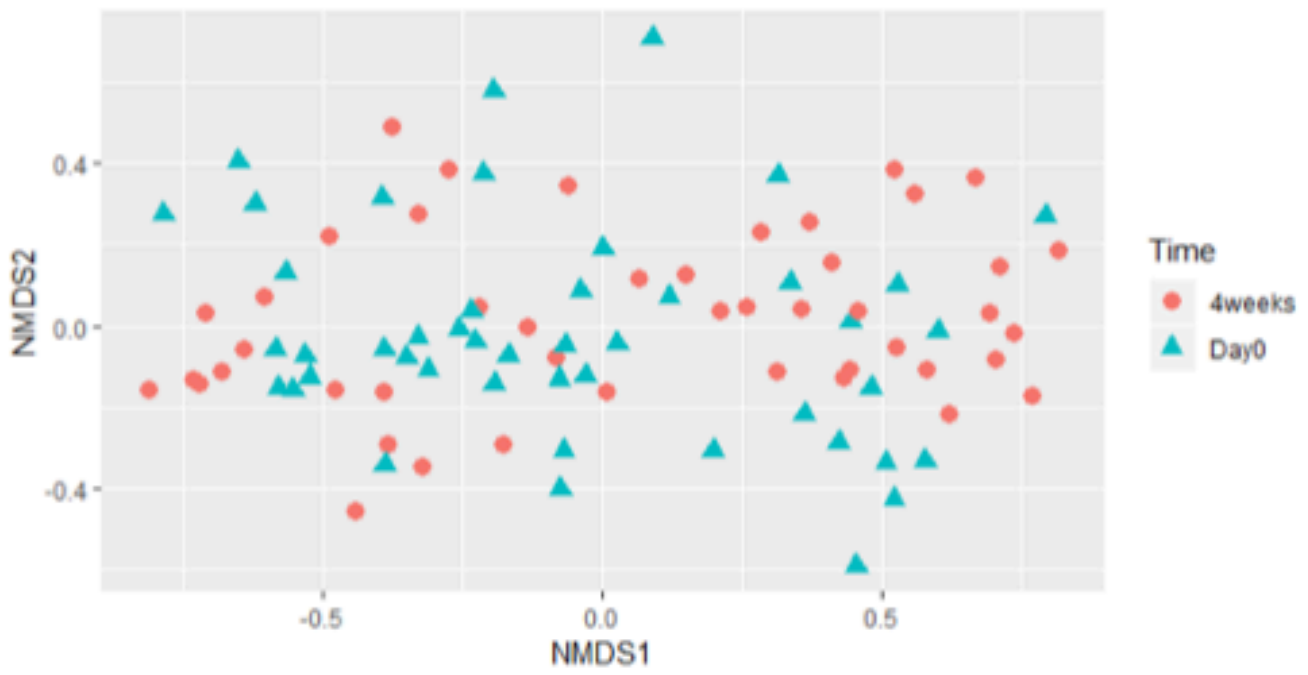


Figure 3B



Figure 3C

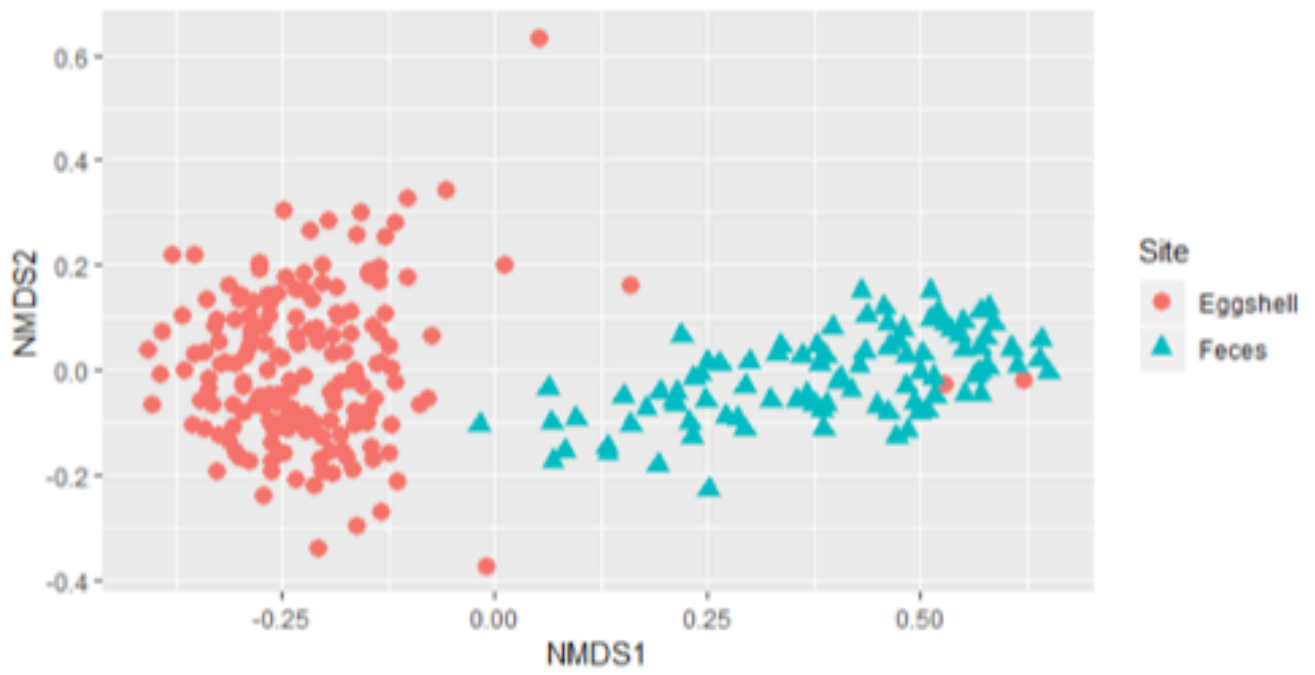


Figure 4

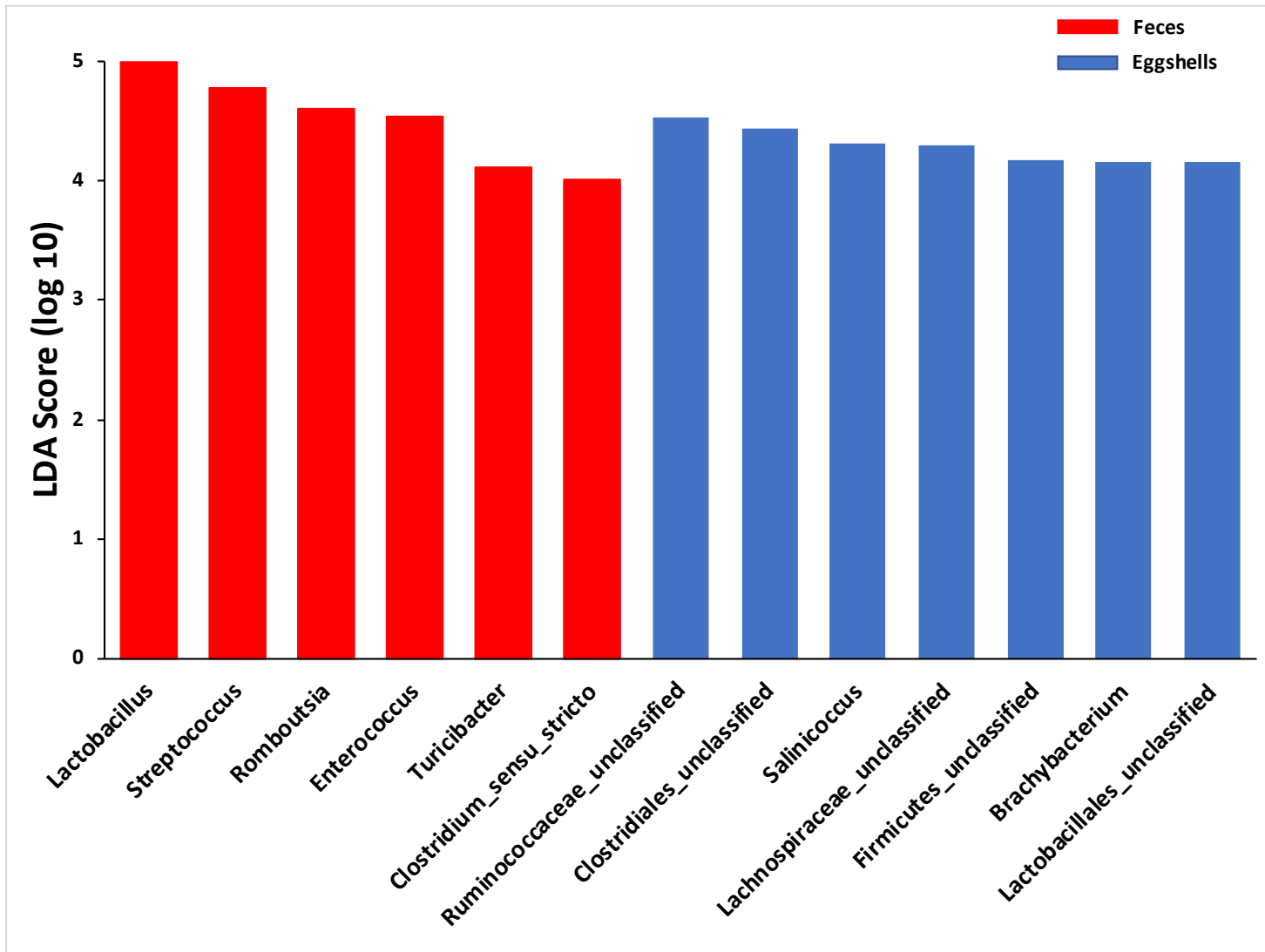
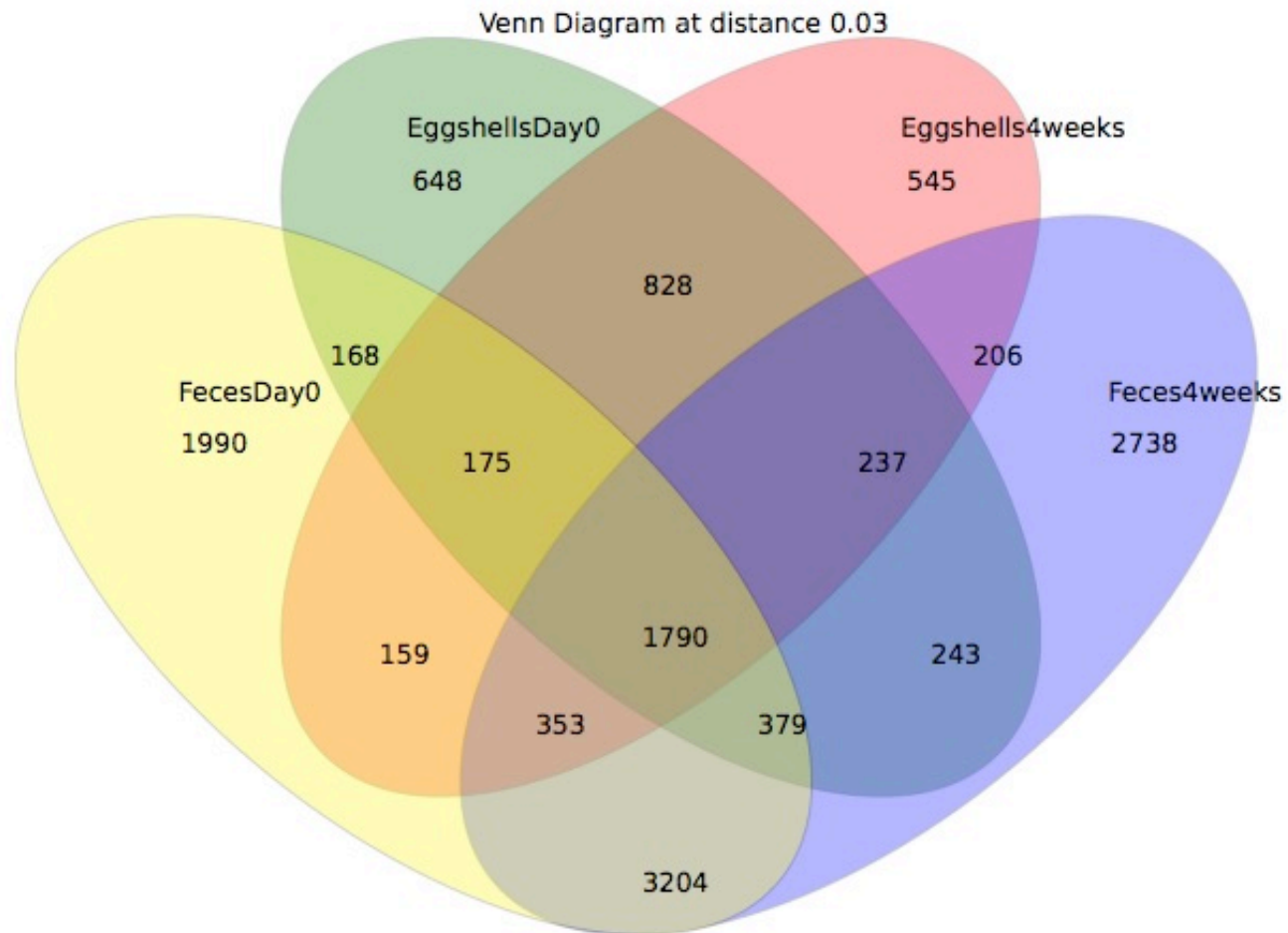


Figure 5



Supplementary Table S1. Information on the broiler breeder flocks.

ID	Race	Age at Day 0	Age at 4 weeks
Flock 1	Ross	36 weeks	40 weeks
Flock 2		45 weeks	49 weeks
Flock 3	Cobb 500	40 weeks	44 weeks
Flock 4			
Flock 5			
Flock 6			
Flock 7		28 weeks	32 weeks
Flock 8			
Flock 9			
Flock 10			
Flock 11			
Flock 12			

Supplementary Table S2

Total phyla and families found in the samples			
FECS		EGGSHELLS	
Phyla	Families	Phyla	Families
Bacteroidetes_unclassified	Rhodospirillaceae	DNA11	Polynonadaceae
Formicidae	Rhodospirillales_incertae_sedis	Rhodospirillaceae	Vibrionaceae
Porphyromonadaceae	Rhodospirillum_unclassified	Rhodospirillaceae	Campylobacteraceae
Planctonaceae	Moraxellaceae	Rhodospirillaceae	Helicobacteraceae
Rhizobiaceae	Rickettsiaceae	Rickettsiales_incertae_sedis	Aeromonadaceae
Bacteroidia_unclassified	Rickettsiales_fa	Rickettsiaceae	Succinivibrionaceae
Cytophaga	Rickettsiales_unclassified	Fr3	Alcinonadaceae
Chitinophagaceae	Fr8	Hydrogenophagaceae	Halomonadaceae
Saprospiraceae	Fr9	Methylobacteriaceae	Duonospirillales_incertae_sedis
Saprospiraceae	Fr10	Hydrogenophagaceae	Duonospirillum_unclassified
Saprospiraceae	Fr11	Hydrogenophagaceae	Orinaceae
Sphingobacteriales_unclassified	Fr12	Hydrogenophagaceae	Phloeobacteraceae
Chloroflexaceae	Fr13	Hydrogenophagaceae	Moraxellaceae
Haloquadraceae	Fr14	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
Sphaerobacteriaceae	Fr15	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
Calditerraceae	Fr16	Hydrogenophagaceae	Vibrionaceae
Chloroflexi_unclassified	Fr17	Hydrogenophagaceae	Sinobacteraceae
	Fr18	Hydrogenophagaceae	Moraxellaceae
	Fr19	Hydrogenophagaceae	Ablonomadaceae
	Fr20	Hydrogenophagaceae	Ablonomadus_incertae_sedis
	Fr21	Hydrogenophagaceae	Ablonomadaceae
	Fr22	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr23	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr24	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr25	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr26	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr27	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr28	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr29	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr30	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr31	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr32	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr33	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr34	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr35	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr36	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr37	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr38	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr39	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr40	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr41	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr42	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr43	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr44	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr45	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr46	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr47	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr48	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr49	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr50	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr51	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr52	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr53	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr54	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr55	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr56	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr57	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr58	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr59	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr60	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr61	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr62	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr63	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr64	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr65	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr66	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr67	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr68	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr69	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr70	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr71	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr72	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr73	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr74	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr75	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr76	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr77	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr78	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr79	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr80	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr81	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr82	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr83	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr84	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr85	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr86	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr87	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr88	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr89	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr90	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr91	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr92	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr93	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr94	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr95	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr96	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr97	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr98	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr99	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae
	Fr100	Hydrogenophagaceae	Planctonaceae

Supplementary Table S3. Microbiota structure comparison of feces and eggshells across broiler breeder flocks according to the flock.

A)	Flock 1	Flock 2	Flock 3	Flock 4	Flock 5	Flock 6	Flock 7	Flock 8	Flock 9	Flock 10	Flock 11	Flock 12	
Flock 1		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
Flock 2	0.305		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	
Flock 3	<0.001	<0.001		0.06	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
Flock 4	<0.001	<0.001	0.104		0.009	0.008	0.006	0.004	<0.001	0.004	0.004	0.005	
Flock 5	<0.001	0.001	0.343	0.01		0.001	0.006	<0.001	<0.001	<0.001	0.009	0.004	
Flock 6	0.001	0.001	0.002	<0.001	0.019		<0.001	0.001	<0.001	<0.001	0.004	0.002	
Flock 7	<0.001	<0.001	0.18	0.11	0.399	<0.001		0.015	<0.001	0.003	0.011	0.014	
Flock 8	<0.001	<0.001	0.035	0.013	0.06	<0.001	0.403		<0.001	<0.001	0.015	0.006	
Flock 9	<0.001	<0.001	0.01	<0.001	0.031	0.003	0.006	<0.001		<0.001	<0.001	0.001	
Flock 10	<0.001	<0.001	0.019	<0.001	0.03	<0.001	0.028	0.001	0.059		<0.001	<0.001	
Flock 11	<0.001	<0.001	0.015	<0.001	0.042	<0.001	0.112	0.032	<0.001	<0.001		0.09	
Flock 12	<0.001	<0.001	0.017	0.012	0.077	<0.001	0.387	0.412	0.001	<0.001	0.019		
Yue & Clayton													
B)	Flock 1	Flock 2	Flock 3	Flock 4	Flock 5	Flock 6	Flock 7	Flock 8	Flock 9	Flock 10	Flock 11	Flock 12	
Flock 1		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
Flock 2	<0.001		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
Flock 3	<0.001	<0.001		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
Flock 4	0.001	<0.001	<0.001		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
Flock 5	<0.001	<0.001	0.001	<0.001		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
Flock 6	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
Flock 7	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.003	<0.001		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
Flock 8	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
Flock 9	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		<0.001	<0.001	<0.001	
Flock 10	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001		<0.001	<0.001	
Flock 11	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.059	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		<0.001	
Flock 12	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.007	0.001	<0.001	0.004	<0.001	<0.001	0.002		
Yue & Clayton													

P value under significant level (p<0.05) are represented in bold

5. DISCUSSION GÉNÉRALE

Les bactéries retrouvées dans les matières fécales des poules reproductrices de poulet de chair représentent les premières bactéries rencontrées par l'œuf durant et après la ponte. Toutefois, la contribution de ces micro-organismes à l'établissement du microbiote retrouvé à la surface de la coquille de l'œuf reste encore pratiquement inconnue. Cette étude est une première étape dans la description de la structure (distribution) et de la diversité des communautés bactériennes présentes au niveau de la production primaire de poulets de chair au Québec, i.e. dans les matières fécales des oiseaux reproducteurs et à la surface de leurs œufs pondus. Ce projet a également fourni les premières données concernant la contribution du transfert de l'écosystème microbien fécal des poules reproductrices à l'établissement du microbiote présent à la surface de la coquille des œufs pondus par celles-ci.

5.1 Interprétation des résultats

Dans le cadre de ce projet de maîtrise, les troupeaux d'oiseaux reproducteurs de poulet de chair ont été sélectionnés de façon complètement aléatoire. Les oiseaux étaient de races Cobb et Ross; deux races prédominantes dans la filière de type chair au Québec. Il s'agit en fait d'un premier projet exploratoire mené au niveau de la production primaire des poulets de chair au Québec. Les résultats de composition et de diversité des différents microbiotes à l'étude (i.e. fécal et de surface des œufs) se sont avérés en grande partie comparables avec ce qui avait déjà été rapporté dans d'autres pays chez différents types d'oiseaux sauvages et de volailles. Bien sûr, plusieurs facteurs comme la génétique des oiseaux peuvent engendrer des différences de résultats entre les études. Les données obtenues quant au transfert de l'écosystème microbien fécal des oiseaux reproducteurs de poulet de chair vers le microbiote de surface des œufs sont

très novateurs. De ce fait, et étant conscient des limites du présent projet exploratoire (i.e. choix des troupeaux, régie dans les fermes, âge et race des oiseaux différents), la prochaine étape sera de mettre en place une seconde étude, cette fois-ci mieux structurée, afin d'avoir des résultats plus solides et plus représentatifs de la réalité de l'industrie avicole au Québec.

La présente étude a été conduite de façon à représenter la dynamique présente au sein d'un troupeau (lot d'oiseau). Un projet de recherche a été effectué récemment dans notre laboratoire afin de définir les conditions d'échantillonnage pour aboutir à la description stabilisée du microbiote fécal d'un lot d'oiseaux et de la flore de surface d'un lot d'œufs pondus en mesurant la variance entre différents groupes d'échantillons. Les résultats ont montré que le regroupement de 7 fèces étaient nécessaires minimalement afin de représenter un lot d'oiseaux (Larivière-Gauthier *et al*, Manuscrit en préparation). Cependant, puisque les fèces utilisées dans leur étude proviennent de poulets de chair gardés en confinement de niveau 2, il est possible que la variance du microbiote soit plus faible que dans un troupeau classique et donc, qu'un plus grand nombre d'échantillon soit nécessaire afin de représenter un troupeau semblable à ceux impliqués dans le présent projet de maîtrise. Pour cette raison, 10 fèces ont été regroupés dans ce projet-ci. Finalement, les œufs utilisés dans leur étude proviennent de l'un des troupeaux d'oiseaux reproducteurs de poulet de chair échantillonné dans le présent projet de maîtrise et ont été prélevés de la même manière (i.e. échantillonnage stratifiée). Les auteurs ont montré que le regroupement de 7 œufs étaient nécessaires minimalement afin de représenter un troupeau (Larivière-Gauthier *et al*, Manuscrit en préparation). En regroupant 10 œufs dans le présent projet, cela a permis d'assurer la représentativité d'un lot d'œufs pondus.

Dans le présent projet, la proportion des micro-organismes composants le microbiote variait en fonction du type d'échantillon (i.e. fèces des oiseaux reproducteurs de poulet de chair et surface des coquilles d'œufs), de la période d'échantillonnage et du troupeau échantillonné. Pour les fèces, la composition du microbiote des oiseaux reproducteurs de poulet de chair apparaît comparable à celles déjà rapportées chez des poulets de chair (Singh *et al*, 2012; Videnska *et al*, 2014; Kaakoush *et al*, 2014). Pour les surfaces de coquilles d'œufs, les différences de composition relevées entre les œufs pondus par les oiseaux reproducteurs de poulet de chair du présent projet et ceux pondus par des oiseaux sauvages ou des poules pondeuses d'autres études peuvent entre autres être expliquées par les races d'oiseaux, le système d'hébergement des oiseaux, l'état des œufs et finalement la régie des différents intrants (eau, moulée, litière, etc.) (Lee *et al*, 2014 ; Neira *et al*, 2017 ; Van Veelen *et al*, 2017). Puis, plusieurs différences au niveau des résultats ont été observées selon la base de données utilisée pour faire l'assignation taxonomique. Une partie de ces différences peut être expliquée par l'assignation avec une base de données d'une séquence qui n'était pas référencée dans l'autre base. Dans ce cas l'interprétation est aisée : il est donc très pertinent d'utiliser plus d'une base de données pour faire une étude plus complète du microbiote. Cependant, dans certains cas, les différences ne peuvent s'expliquer que par un traitement algorithmique différent des séquences, donc l'interprétation des différences de résultats selon la base de données utilisée pour l'assignation est plus ambiguë.

Les résultats de cette étude ont révélé la présence de genres bactériens potentiellement pathogènes pour les poules et l'humain, mais aussi de bactéries d'altération à la surface des coquilles d'œufs et dans les fèces des oiseaux reproducteurs de poulet de chair. Malgré le fait

que ces bactéries soient présentes en faibles proportions, cela peut avoir d'importantes conséquences sur le poussin (futur poulet de chair), sur ses congénères et ultimement sur la santé publique. Les résultats de la présente étude suggèrent un transfert non homogène des communautés bactériennes fécales vers celles présentes sur l'œuf et donc, suggère une sélection bactérienne sur les œufs fraîchement pondus. Cette sélection peut être associée à la capacité de certaines bactéries à s'attacher plus facilement à la surface de l'œuf que d'autres ou à mieux survivre sur l'œuf. Ces résultats sont pertinents autant dans une perspective de santé animale que de santé publique puisque cette sélection de bactéries transférées peut par la suite initier la formation de biofilms à la surface des coquilles d'œufs lors du stockage ou l'incubation des œufs comme il a déjà été observé pour certains genres, incluant *Listeria* (Minhui *et al*, 2016), *Salmonella* (Pande *et al*, 2016), *Staphylococcus* (Neira *et al*, 2017) et *Pseudomonas* (Jung *et al*, 2017).

Les résultats de ce projet ont aussi montré que la diversité bêta des communautés bactériennes dans les fèces et à la surface des coquilles d'œufs variait selon les troupeaux et étaient dynamiques dans le temps dans les conditions de notre étude. Pour les fèces, ces différences significatives à travers le temps pourraient être associées au vidage des différentes sections du tractus gastro-intestinal donnant des mélanges finaux de matières fécales distincts (Sekelja *et al*, 2012; Oakley *et al*, 2016). Pour les œufs, cette fluctuation temporelle indique que les poussins seront exposés à différentes populations bactériennes lors de l'éclosion, dépendamment de la période de temps à laquelle les œufs sont pondus. Ainsi, les poussins nés d'un même troupeau de poules (qui pondent de l'âge de 21 à 56 semaines de vie) peuvent avoir des microbiotes digestifs et/ou fécaux significativement différents. Finalement, les différences

inter-troupeaux concernant les deux types de microbiotes pourraient être associées à une panoplie de facteurs environnementaux comme l'origine des oiseaux (Videnska *et al*, 2014), le type de litière, le type de nourriture (Stanley *et al*, 2015), des pratiques et des employés différents d'un bâtiment à un autre, l'emplacement géographique de la ferme, etc.

Cette étude a documenté pour la première fois la contribution de l'écosystème microbien fécal de poules pondeuses (i.e. oiseaux reproducteurs de poulet de chair) à l'établissement du microbiote retrouvé à la surface des œufs pondus et a montré que ce transfert n'était pas systématique. Les OTUs partagées entre les fèces et les surfaces de coquilles d'œufs aux deux temps d'échantillonnage représentaient 15% des OTUs détectées dans les échantillons de fèces et 31% des OTUs détectées dans des échantillons de surfaces de coquilles d'œufs. Cette observation suggère que les matières fécales auraient contribué à l'établissement du microbiote trouvé sur la coquille de l'œuf, mais que d'autres sources ont aussi pu être d'importants contributeurs. Les récentes études menées sur des oiseaux sauvages ont rapporté plusieurs éléments contribuant à l'établissement du microbiote à la surface des coquilles d'œufs, principalement les plumes des oiseaux (Lee *et al*, 2014 ; van Veelen *et al*, 2017). Cependant, il est possible que les communautés bactériennes présentes à la surface des coquilles d'œufs soient des populations minoritaires des fèces qui n'ont pas été détectées lors du séquençage. En fait, le niveau de détection de la métagénomique 16S ne sera pas la même pour les fèces et les œufs (nombre beaucoup plus important de micro-organismes dans des fèces qu'à la surface d'une coquille d'œuf. Je suis d'avis que les fèces pourraient être un contributeur majeur du microbiote retrouvé à la surface des coquilles d'œufs puisque ce sont les premières bactéries (celles du tube digestif maternel) qui entrent en contact avec l'œuf complètement formé, mais la conduite d'une

étude avec une méthodologie différente et incluant d'autres types d'échantillons sont nécessaires afin de mieux identifier le(s) contributeur(s). Finalement, des séquences associées à toutes les bactéries potentiellement pathogènes et d'altération identifiées précédemment ont été trouvées comme étant partagées entre les fèces et les surfaces de coquilles d'œufs à au moins un des deux temps d'échantillonnage. Ces partages sont significatifs en termes de santé animale et de salubrité des aliments.

La filière chair, contrairement à la filière ponte, n'est pas munie pour l'instant d'un système de surveillance standardisé pour les agents pathogènes, comme *Salmonella* (Fédération des producteurs d'œufs du Québec, 2015). Comme mentionné précédemment, la surveillance (e.g. tests de dépistages, prélèvements) dépend de la compagnie qui possède le troupeau d'oiseaux reproducteurs de poulet de chair et/ou des exigences des pays importateurs. Par contre, un comité est mis en place actuellement au Québec et un programme pour la surveillance de *Salmonella* pour les oiseaux reproducteurs de poulet de chair sera disponible d'ici quelques années. D'ici ce temps, il conviendrait de rendre les normes de biosécurité plus sévères et obligatoires sur les sites de production primaire de poulets de chair. Cela diminuerait de beaucoup les risques de contamination des troupeaux par des agents pathogènes, ainsi que la propagation de ces derniers vers la chaîne alimentaire. Une surveillance accrue et l'obligation d'adopter les BPP proposées par l'industrie tout au long de la chaîne de production sont indispensables afin de promouvoir la santé et le bien-être animal, ainsi que la salubrité des aliments destinés aux consommateurs. Les séquences bactériennes identifiées au niveau de la production primaire de poulets de chair dans la présente étude pourront être comparées avec celles identifiées à d'autres niveaux de production dans la filière, et ce, à l'aide de méthodes de

biologie moléculaire tel que le « High Resolution melt » (HRM). Cette technique s'appuie sur le principe de la PCR et mesure la température de dissociation de différents ADN doubles brins (Gundry *et al.*, 2003). Le HRM nous permettra donc de connaître si les souches retrouvées plus haut dans la pyramide (i.e. l'étage de la multiplication) sont celles retrouvées dans les élevages de poulets de chair, à l'abattoir, mais également dans le produit final. Si les souches circulantes chez les oiseaux reproducteurs sont celles présentes dans le produit final, ces résultats seront très pertinents dans une perspective de santé publique afin de mettre en place des mesures correctives pour éviter une telle contamination le long de la chaîne de production.

Enfin, les résultats de ce projet pourront aider l'industrie avicole à mettre en place des stratégies alimentaires plus efficaces pour les poules pondeuses, autant chez la poule reproductrice que chez la poule pondeuse commerciale, afin de modifier le microbiote retrouvé à la surface des coquilles d'œufs. En effet, la présente étude a démontré que certaines communautés bactériennes semblent mieux adaptées à survivre sur la coquille de l'œuf que d'autres. Par exemple, la famille des *Ruminococcaceae*, qui représentait seulement 1% de la totalité du microbiote fécal, était la famille la plus abondante du microbiote présent à la surface des coquilles d'œufs. Inversement, certaines OTUs associées au genre *Lactobacillus* dominaient les matières fécales sans se retrouver à la surface des coquilles d'œufs. Ces résultats sont indispensables afin de pouvoir établir une stratégie alimentaire qui modulera de façon importante les communautés microbiennes du TGI qui ont un réel impact sur la microbiologie de l'œuf, comme la famille des *Ruminococcaceae*. Pour la filière avicole de type chair, ces nouvelles stratégies alimentaires pourront ultérieurement permettre de moduler le microbiote du poussin selon le microbiote maternel via la coquille de l'œuf.

5.2 Aspects innovateurs

Cette étude a fourni des données de biologie moléculaire sur le microbiote fécal des oiseaux reproducteurs de poulet de chair en production au Québec et sur le microbiote retrouvé à la surface des coquilles d'œufs pondus par ces oiseaux grâce à des approches de biologie moléculaire les plus novatrices. De plus, une évaluation du transfert de l'écosystème microbien fécal parental vers la surface de la coquille de l'œuf a également été effectuée grâce à ce projet de recherche. À notre connaissance, c'est la première fois qu'une étude de microbiote est effectuée au niveau de la production primaire de poulets de chair, décrivant la composition et la structure des communautés bactériennes des fèces d'oiseaux reproducteurs de poulet de chair et celles à la surface des œufs pondus en utilisant le séquençage à haut débit du gène codant pour l'ARNr 16S. Aussi, cette étude a démontré la pertinence de décrire le microbiote à plusieurs niveaux taxonomiques, en plus d'utiliser plus d'une base de données pour faire l'assignation taxonomique des séquences microbiennes. En effet, plusieurs différences ont été observées selon la base de données utilisée, ce qui se distingue de la majorité des études de microbiote antérieures qui n'avaient utilisé qu'une seule base de données, ce qui reflète moins fidèlement la diversité taxonomique présente au sein d'un microbiote. La présente étude a identifié des phyla et des familles jamais associées auparavant avec des fèces de poules ou des surfaces de coquilles d'œufs. De plus, cette étude a révélé pour la première fois que tant la diversité alpha que la diversité bêta retrouvées à la surface des coquilles d'œufs évoluaient dans le temps et étaient spécifiques au troupeau. Les données recueillies ont permis d'étudier l'influence du temps (i.e. intervalle de 4 semaines) sur la stabilité du microbiote fécal de poules reproductrices adultes et de mettre en évidence des différences significatives quant à cette diversité, une première chez des oiseaux de la filière chair. Finalement, ce travail est le premier

à démontrer que le transfert du microbiote fécal d’oiseaux en ponte vers la surface des coquilles d’œufs n’est pas systématique et que les genres bactériens partagés ne sont pas nécessairement associés aux communautés majoritaires présentes dans les matières fécales et à la surface des coquilles d’œufs.

5.3 Limites de l’étude

Les récentes technologies de séquençage à haut débit mises en œuvre dans des approches de métagénomique 16S ont grandement contribué à mieux caractériser les microbiotes de volailles, nous donnant un portrait plus réaliste de la dynamique bactérienne dans la chaîne de production animale en regard de la salubrité alimentaire, de la santé animale et de la santé publique (Deusch *et al*, 2014). Néanmoins, ces approches moléculaires peuvent présenter plusieurs limites. Des travaux d’optimisation des méthodes d’échantillonnage (Musgrove *et al*, 2005; Grizard *et al*, 2014) et des protocoles d’extraction d’ADN, une meilleure prise en compte de l’impact de congélations et décongélations répétées des échantillons, de la sensibilité des étapes de la PCR (Zhu *et al*, 2002; Sergeant *et al*, 2012) et de la nécessité de l’harmonisation des bases de données utilisées pour faire l’attribution taxonomique des séquences (Balvociute *et al*, 2017), susceptibles de favoriser ou de défavoriser certaines communautés microbiennes, sont aujourd’hui des limites inhérentes à l’ensemble des études faisant appel à la métagénomique 16S et sont des défis à relever dans le futur afin d’améliorer la reproductibilité et la comparabilité des analyses de communautés microbiennes.

Dans cette étude, différents facteurs circonstanciels liés au plan d’échantillonnage ont mené à la congélation de l’ensemble des échantillons directement après leur collecte et ce, pour

plusieurs semaines. De plus, lors des différentes étapes du protocole expérimental réalisées au laboratoire, d'autres procédures de congélation et décongélation ont lieu, entraînant potentiellement une diminution du nombre de lectures Miseq et donc, du nombre d'OTUs détectées dans les échantillons. Cela a donc possiblement causé une perte de diversité, mais aussi un déséquilibre de la distribution des communautés microbiennes présentes au sein des deux types d'écosystèmes, en favorisant celles qui sont plus résistantes à ces variations. Cependant, compte tenu du fait que tous les échantillons ont été soumis aux mêmes étapes, l'influence de cette approche n'influence aucunement la possibilité de comparaison des échantillons entre eux pour la présente étude.

Pour les œufs de poules, il a déjà été rapporté que la méthode utilisée pour étudier les bactéries présentes à la surface de la coquille influençait significativement sur l'identité et la quantité des communautés observées (Musgrove *et al*, 2005). Ainsi, le fait de froter la surface de la coquille résulterait en de plus faibles abondances relatives lors de l'extraction d'ADN que lorsque la coquille est mise en pièces. Effectivement, lors du frottement, il a été rapporté que la totalité du microbiote ne pouvait pas être échantillonnée considérant que les bactéries présentes dans les pores de la coquille ne pouvaient pas être récupérées (i.e. bactéries aérobiques). La mise en pièces de la coquille permettrait une description plus complète en termes de structure des communautés et de diversité de ces micro-organismes (Grizard *et al*, 2014). Dans la présente étude, le frottement des coquilles a pu donc entraîner une diminution de la quantité, mais aussi de la diversité des communautés bactériennes présentes à la surface des coquilles d'œufs. Il est toutefois important de noter que la destruction des œufs n'était pas envisageable d'un point de

vue du bien-être animal et des pertes économiques pour le producteur dans le cadre de la présente étude.

Lors de la réalisation des analyses, étant donné que les séquences associées aux lingettes contrôles ont dû être retirées des échantillons de surfaces de coquilles d'œufs afin de garder au final que les séquences présentes uniquement sur les surfaces de coquilles d'œufs, la perte d'une quantité non négligeable de séquences a pu entraîner une réduction de la couverture d'échantillonnage pour ces échantillons-ci. Les séquences retirées attribuables aux lingettes auraient potentiellement pu provenir de l'air ambiant des bâtiments visités, contribuant peut-être au microbiote retrouvé à la surface des coquilles, mais aussi des lingettes autoclavées elles-mêmes. Cependant, dans ces circonstances, cette méthodologie était la meilleure à adopter. L'utilisation de lingettes ayant un meilleur statut microbiologique initial optimiserait peut-être les résultats lors de prochaines études.

Finalement, l'effet d'une modification alimentaire sur le microbiote fécal des poules, sur le microbiote retrouvé à la surface de la coquille de l'œuf et sur le transfert du microbiote fécal vers la surface de l'œuf devait être évalué. Cependant, l'hétérogénéité imprévue de l'âge des oiseaux au jour zéro (J0) de l'étude ou au J0 du traitement a empêché toute conclusion sur l'effet de l'additif alimentaire ajouté à la moulée de certains des troupeaux échantillonnés. Cette hétérogénéité de l'âge des oiseaux échantillonnés est également un facteur limitant dans les analyses de résultats, principalement pour les comparaisons regroupant les échantillons de J0 de l'étude ensemble et de ceux prélevés 4 semaines plus tard. Au final, le facteur temps a

simplement été évalué en fonction de l'intervalle de 4 semaines entre les deux périodes d'échantillonnage et non en fonction de l'âge des oiseaux à proprement dit.

5.4 Perspectives

Plusieurs études complémentaires seront nécessaires afin de mieux comprendre le rôle des communautés bactériennes transmises à la surface des coquilles d'œufs sur la santé des poussins et ultérieurement sur la santé publique. La méthodologie utilisée pour notre étude a permis de faire l'assignation taxonomique des séquences et a fourni leur abondance relative, mais elle n'a pas permis d'assigner leurs fonctions dans l'échantillon (Deusch *et al*, 2014). Aussi, puisque les bases de données utilisées ont permis de décrire les microbiotes jusqu'au niveau du genre seulement, il serait intéressant de faire une confirmation par culture, surtout en ce qui concerne les genres potentiellement pathogènes et ceux d'altération identifiés dans les deux types d'échantillons afin de mieux évaluer les risques dépendamment des espèces et souches bactériennes identifiées.

Notre étude a démontré que certaines bactéries semblaient s'attacher/survivre préférentiellement à la surface de la coquille de l'œuf que d'autres. Des études complémentaires sont nécessaires afin de comprendre les mécanismes d'adhésion des communautés bactériennes retrouvées sur l'œuf, car pour certaines bactéries ne possédant pas de propriété particulière de fixation (e.g. flagelle, fimbriae, lipopolysaccharide, SPI-1 pour *Salmonella*) (Van Immerseel *et al*, 2005), leur représentation dans les fèces et dans l'environnement ne permet pas d'expliquer leur présence sur la coquille de l'œuf.

Comme notre étude suggère que les matières fécales ne sont pas entièrement responsables de la composition du microbiote à la surface des coquilles d'œufs, les expériences futures devraient inclure davantage d'échantillons maternels et environnementaux tels que des plumes, de la litière provenant des nids, des écouvillons de convoyeurs et plus dans le but d'identifier d'autres éléments contributeurs. D'ailleurs, les résultats d'une étude récente menée sur les œufs d'oiseaux sauvages couvés ont bien démontré que les communautés microbiennes retrouvées sur la coquille étaient plus riches et plus diverses que celles du cloaque, indiquant que plusieurs sources participent à l'établissement du microbiote retrouvé à la surface des œufs (van Veelen *et al*, 2017).

Afin de rendre plus complète l'étude du microbiote à la surface des coquilles d'œufs, des travaux complémentaires devraient inclure l'étude des champignons. Il a déjà été rapporté que les champignons utilisaient leurs hyphes afin de pénétrer la cuticule de l'œuf et de la digérer augmentant ainsi le nombre de pores disponibles pour la contamination de l'intérieur de l'œuf par des bactéries pathogènes environnantes (Grizard *et al*, 2015). Par ailleurs, la contamination du contenu de l'œuf par les bactéries a déjà été positivement corrélée avec la présence de champignons sur la coquille de celui-ci (Cook *et al*, 2003).

Il n'y a pas de standardisation concernant la méthode d'analyse des échantillons traités dans les études utilisant la méthodologie du marqueur ADN du gène codant pour l'ARNr 16S ce qui empêche, jusqu'à un certain point, la comparaison de résultats entre différents travaux. L'une des nombreuses raisons est que plusieurs bases de données nécessaires pour faire l'assignation taxonomique des séquences sont disponibles. Il serait intéressant pour les études

futures d'utiliser la base de données OTT comme taxonomie de référence. D'ailleurs, une récente étude a démontré qu'OTT est la plus vaste et la plus complète parmi les cinq bases de données les plus utilisées (Silva, RDP, GreenGenes, NCBI et OTT) dans les études ciblant le gène codant pour l'ARNr 16S et qu'en plus, toutes les autres se mappaient bien dans celle-ci (Balvociute *et al*, 2017). Cette approche représenterait une étape vers une standardisation.

Enfin, tel que mentionné précédemment, la planification d'un échantillonnage plus rigoureux, i.e. avec des oiseaux de même race et de même âge, à des temps de vie plus ciblés et en uniformisant davantage les éléments de régime entre les troupeaux permettrait de mieux décrire l'influence de certains facteurs spécifiques, comme l'ajout ou non d'un additif alimentaire, entre différents troupeaux à l'étude.

6. CONCLUSION

Cette étude a fourni la première description de la structuration des communautés bactériennes présentes dans les fèces d'oiseaux reproducteurs de poulet de chair et sur la surface des coquilles de leurs œufs pondus en utilisant la technologie de séquençage à haut débit du gène codant pour l'ARNr 16S. De plus, la stabilité et la variabilité de ces microbiotes ont été décrites à travers le temps pour un même lot, mais aussi entre différents troupeaux. Finalement, ce projet de recherche a permis d'évaluer pour la première fois la contribution du transfert du microbiote fécal parental à l'établissement du microbiote retrouvé à la surface des œufs pondus. Les principales conclusions de cette étude sont que :

- Les communautés bactériennes majoritaires (plus de 1% de la composition totale) et leur abondance relative dans les fèces des oiseaux reproducteurs de poulet de chair et à la surface de leurs œufs sont différentes. La base de données utilisée pour faire l'assignation taxonomique des séquences contribue à l'expression de cette différence.
- Le temps d'échantillonnage et le troupeau sont deux facteurs qui influencent significativement la diversité alpha du microbiote des fèces et de celle de la surface des coquilles d'œufs, mais de façon différente. L'influence de ces facteurs sur la diversité alpha est plus marquée pour le microbiote retrouvé à la surface de l'œuf que pour celui des fèces.
- Le temps d'échantillonnage et le troupeau sont deux facteurs qui influencent significativement la diversité bêta du microbiote des fèces et celle retrouvé à la surface des coquilles d'œufs.

- La contribution de l'écosystème microbien fécal de poules pondeuses reproductrices à l'établissement du microbiote retrouvé à la surface de leurs œufs pondus n'est pas directe et systématique.
- Il y a une sélection qui s'effectue lors du transfert du microbiote fécal parental vers celui retrouvé à la surface des coquilles d'œufs pondus qui pourrait être influencée par la capacité de certaines bactéries de s'attacher à la coquille ou de persister sur celle-ci.
- D'autres sources que les fèces des oiseaux reproducteurs de poulet de chair semblent contribuer à la composition du microbiote retrouvé à la surface de la coquille de l'œuf.
- 1790 OTUs ont été systématiquement partagées entre les fèces d'oiseaux reproducteurs de poulet de chair et la surface des œufs pondus et ceux-ci n'étaient pas nécessairement associées aux communautés majoritaires présentes dans chacun des deux types d'échantillons.
- Des séquences associées aux bactéries potentiellement pathogènes et d'altération *Acinetobacter*, *Campylobacter*, *Escherichia*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Salmonella* et *Staphylococcus* ont été partagées entre les deux types d'échantillons à au moins un des deux temps d'échantillonnage.

Compte tenu de l'implication possible des bactéries retrouvées dans les deux types d'échantillons, tant dans une perspective de santé animale que de santé publique, tous les intervenants impliqués aux différents maillons de la chaîne de production des volailles (différents étages de la pyramide des filières de ponte et de chair) devraient être informés de ces résultats. Rendre obligatoire la mise en place de mesures de biosécurité strictes, mais aussi une surveillance et un contrôle des principaux agents pathogènes colonisant les oiseaux

reproducteurs de poulet de chair et la surface des œufs contribuerait à prévenir la colonisation des poussins par ces agents.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Abdellah, M.B. (2010). Analyse Microbiologique des Aliments. *Mémoire. Université Sidi. Faculté des Sciences et techniques*. [En ligne]. < www.memoirepfe.fst-usmba.ac.ma/get/pdf/792 >. Consulté le 17 février 2017.
- Agence Canadienne d'Inspection des Aliments. (2017a). Rapport d'enquête sur l'éclosion d'influenza aviaire en Colombie-Britannique, 2014. [En ligne]. < <http://www.inspection.gc.ca/animaux/animaux-terrestres/maladies/declaration-obligatoire/ia/cas-anterieurs/influenza-aviaire-en-colombie-britannique-2014/fra/1475593889073/1506003977167?chap=0> >. Consulté le 18 avril 2019.
- Agence Canadienne d'Inspection des Aliments. (2017b). Rapport d'enquête sur l'éclosion d'influenza aviaire H5N2 en Ontario, 2015. [En ligne]. < <http://www.inspection.gc.ca/animaux/animaux-terrestres/maladies/declaration-obligatoire/ia/cas-anterieurs/influenza-aviaire-en-colombie-britannique-2014/fra/1475593889073/1506003977167?chap=0> >. Consulté le 18 avril 2019.
- Agence canadienne d'inspection des aliments. (2018). Norme nationale de biosécurité pour les fermes avicoles (deuxième édition). *Bureau de la biosécurité animale*. ISBN : 978-0-660-27247-4.
- Agriculture Canada. (1990). Soins des œufs avant l'incubation. *Ministre des Approvisionnements et Services Canada*. ISBN : 0-662-96090-4.
- Agriculture et Agroalimentaire Canada. (2018a). L'industrie canadienne des œufs d'incubation. [En ligne]. < <http://www.agr.gc.ca/fra/industrie-marches-et-commerce/renseignements-sur-les-secteurs-canadiens-de-lagroalimentaire/volaille-et-ufs/information-sur-le-marche-de-la-volaille-et-des-oeufs-industrie-canadienne/oeufs-d-incubation/?id=1384971854395> >. Consulté le 6 avril 2019.
- Agriculture et Agroalimentaire Canada. (2018b). L'industrie canadienne du poulet. [En ligne]. < <http://www.agr.gc.ca/fra/industrie-marches-et-commerce/renseignements-sur-les-secteurs-canadiens-de-lagroalimentaire/volaille-et-ufs/information-sur-le-marche-de-la-volaille-et-des-oeufs-industrie-canadienne/poulet/?id=1384971854392> >. Consulté le 17 janvier 2019.
- Akinde, S.B., Obire, O. (2008). Aerobic heterotrophic bacteria and petroleum-utilizing bacteria from cow dung and poultry manure. *J. Microbiol. Biotech.* doi: 10.1007/s11274-008-9700-z.
- Apajalahti, J., Kettunen, A., Graham, H. (2004). Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *Poult. Sci.* 60,223-232.
- Arnold, M.E., Martelli, F., McLaren, I., Davies, R.H. (2013). Estimation of the Rate of Egg Contamination from *Salmonella*-infected Chickens. *Zoonoses and Public Health.* 61, 18-27. doi: 10.1111/zph.12038.
- Banks, J.C., Cary, S.C., Hogg, I.D. (2009). The phylogeography of Adelie penguin faecal flora. *Appl. Environ. Microbiol.* 11, 577-588. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01816.x.
- Batut, B. (2016). Métagénomique. [En ligne]. < http://bebatut-edu.github.io/metagenomique_cm/metagenomique.html#/ >. Consulté le 27 février 2017.
- Bäumler, A.J., Sperandio, V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature.* 535, 85-93. doi: 10.1038/nature18849.

- Berrang, M.E., Cox, N.A., Frank, J.F., Buhr, R.J. (1999). Bacterial penetration of the eggshell and shell membranes of the chicken hatching egg: a review. *J. Appl. Poult. Res.* 8:499-504.
- Board, R.G., Ayres, J.C., Kraft, A.A., Forsythe, R.H. (1964). The microbiological contamination of egg shells and egg-packing materials. *Poult. Sci.* 43, 584-594. doi: 10.3382/ps.0430584.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., et al. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME.* 6, 1621-1624. doi: 10.1038/ismej.2012.8.
- Centre technique agroalimentaire. (2015). La métagénomique au CTCPA: une technique d'analyse innovante. [En ligne]. < <http://www.ctcpa.org/la-metagenomique-au-ctcpa-une-technique-d-analyse-innovante> >. Consulté le 3 février 2017.
- Chemaly, M., Huneau-Salaün, A., Labbe, A., Houdayer, C., Petetin, I., Fravalo, P. (2009). Isolation of *Salmonella enterica* in Laying-Hen Flocks and Assessment of Eggshell Contamination in France. *J. Food Prot.* 72:2071-2077.
- Chien, Y.C., Chen, C.J., Lin, T.H., Chen, S.H., Chien, Y-C. (2011). Characteristics of Microbial Aerosols Released from Chicken and Swine Feces. *Journal of the Air & Waste Management Association.* 61, 882-889. doi: 10.3155/1047-3289.61.8.882.
- CNSAE (Conseil national pour les soins aux animaux d'élevage). Code de pratiques pour le soin et la manipulation des œufs d'incubation, reproducteurs, poulets et dindons. (2016). ISBN 978=0=9936189-9-4.
- Collins, M.D., Brown, J., Jones, D. (1988). *Brachy bacterium faecium* gen. nov., sp. nov., a Coryneform Bacterium from Poultry Deep Litter. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 45-48.
- Cook, M.I., Beissinger, S.R., Toranzos, G.A., Arendt, W.J. (2005). Incubation reduces microbial growth on eggshells and the opportunity for trans-shell infection. *Ecology Letters.* 8, 532-527. doi: 10.1111/j.1461-0248.2005.00748.x.
- Cook, M.I., Beissinger, S.R., Toranzos, G.A., Rodriguez, R.A., Arendt, W.J. (2003). Trans-shell infection by pathogenic micro-organisms reduces the shelf life of non-incubated bird's eggs: a constraint on the onset of incubation? *Ecology Letters.* 270, 2233-2240. doi: 10.1098/rspb.2003.2508.
- Cox, N.A., Bailey, J.S., Berrang, M.E., Mauldin, J.M. (1997a). Diminishing Incidence and Level of Salmonellae in Commercial Broiler Hatcheries. *J Appl. Poult. Res.* 6, 90-93. doi: 10.1093/jpar/6.90.
- Cox, N.A., Berrang, M.E., Cason, J.A. (2000). *Salmonella* Penetration of Egg Shells and Proliferation in Broiler Hatching Eggs – A Review. *Poult. Sci.* 79, 1571-1574. doi: 10.1093/ps/79.11.1571.
- Crespo, R., Garner, M.M., Hopkins, S.G., Shah, D.H. (2013). Outbreak of *Listeria monocytogenes* in an urban poultry flock. *BMC Vet. Res.* 9, doi: 10.1186/1746-6148-9-204.
- Dahshan, H., Merwad, A.M.A., Mohamed, T.S. (2016). *Listeria* Species in Broiler Poultry Farms: Potential Public Health Hazards. *J. Microbiol. Biotech.* 26, 1551-1556, doi : 10.4014/jmb.1603.03075.
- Davies, A., Board, R.G. (1998). The microbiology of meat and poultry. *Blackie Academic & Professional. London. New York.* [En ligne]. < <https://books.google.ca/books?id=w3adQSPSrD8C&pg=PA16&lpg=PA16&dq=proteus+spoilage+poultry&source=bl&ots=kcMwikCSD8&sig=ACfU3U0N8FVmX49pp9hk3> >

HD--4CSW5EM-

A&hl=fr&sa=X&ved=2ahUKEwjY_I7FgOLhAhXunuAKHQEiCC4Q6AEwAHoECAgQAQ#v=onepage&q=proteus%20spoilage%20poultry&f=false >. Consulté le 18 avril 2019.

- Davies, R. H., Wray, C. (1996). Persistence of Salmonella Enteritidis in poultry units and poultry food. *Br. Poult. Sci.* 37, 589-596. doi: 10.1080/00071669608417889.
- De Buck, J., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. (2004). Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination of Salmonella. *J. Appl. Microbiol.* 97, 233-245. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02294.x.
- de la Cuesta-Zuluaga, J., Escobar, J.S. (2016). Considerations For Optimizing Microbiome Analysis Using a Marker Gene. *Front. Nut.* 3 :26. doi : 10.3389/fnut.2016.00026.
- De Maesschalck, C., Eeckhaut, V., Maertens, L., De Lange, L., Marchal, L., Nezer, C., De Baere, S., Croubels, S., Daube, G., Dewulf, J., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Taminiau, B., Van Immerseel, F. (2015). Effects of Xylo-Oligosaccharides on Broiler Chicken Performance and Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 5880-5888. doi: 10.1128/AEM.01616-15.
- De Reu, K., Grijspeerdt, K., Heyndrickx, M., Zoons, J., Debaere, K., Uyttendaele, M., Debevere, J., Herman, L. (2005). Bacterial eggshell contamination in conventional cages, furnished cages and aviary housing systems for laying hens. *Br. Poult. Sci.* 46, 149-155. doi: 10.1080/00071660500065359.
- De Reu, K. (2006). Bacteriological contamination and infection of shell eggs in the production chain. *University of Ghent. Thèse.* ISBN-number: 90-5989-124-4.
- Deusch, S., Tilocca, B., Camarinha-Silva, A., Seifert, J. (2014). News in livestock research – use of *Omic*s-technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals. *Computational and Structural Biotechnology Journal.* 13, 55-63. doi: 10.1016/j.csbj.2014.12.005.
- Diarra, M.S., Malouin, F. (2014). Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Front. Microbiol.* 5:282. doi: 10.3389/fmicb.2014.00282.
- Donaldson, G.P., Lee, S.M., Mazmanian, S.K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 20-32. doi : 10.1038/nrmicro3552.
- Doyle, M.P. (1984). Association of *Campylobacter jejuni* with laying hens and eggs. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:533-536.
- Duguid, J. P., North, R. A. E. (1991). Eggs and salmonella food-poisoning: an evaluation. *J. Med. Microbiol.* 34, 65-72. doi: 10.1099/00222615-34-2-65.
- Ebringer, A., Rashid, T. (2014). Rheumatoid arthritis is caused by a *Proteus* urinary tract infection. *APMIS.* 122, 363-368. doi: 10.1111/apm.12154.
- Ecole inter-etats des sciences et medecine veterinaires de Dakar., [En ligne] <http://www.beep.ird.fr/collect/eismv/index/assoc/TD99-5.dir/TD99-5.pdf> >
- El-Tras, W. F., Tayel, A. A., Samir, A. (2010). Potential zoonotic pathways of Salmonella Enteritidis in laying farms. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10, 739-742. doi : 10.1089/vbz.2009.0080.
- Faugier, A. (2010). Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs minoritaires " the rare biosphère". Sciences du vivant [q-bio]. Ecole Centrale de Lyon. < Tel-005021051 >.
- Favier, G. I., Escudero, M. E. and De Guzmán, A. M. S. (2005). Genotypic and phenotypic characteristics of *Yersinia enterocolitica* isolated from the surface of chicken eggshells

- obtained in Argentina. *J. Food Prot.* 68, 1812-1815. doi : 10.4315/0362-028X-68.9.1812.
- Fédération des producteurs d'œufs du Québec. (2015). Programme de certification contrôle optimal de la salubrité dans la production d'œufs de consommation (COSPOC). [En ligne]. < <https://oeuf.ca/wp-content/uploads/2015/06/cahier-des-charges-cospoc-fpoq-version-finale-2015-05-04.pdf> >. Consulté le 3 février 2017.
- Feuillet, L. (2007). Étude comparée des vaccins et des flores bactériennes dans la lutte contre les salmonelles en élevage de poules pondeuses. *Thèse - La faculté de médecine de Créteil*.
- Forgetta, V., Rempel, H., Malouin, F., Vaillancourt, R.Jr., Topp, E., Dewar, K., Diarra, S. (2011). Pathogenic and multidrug-resistant *Escherichia fergusonii* from broiler chicken. *Poult. Sci.* 91, 512-525. doi: 10.3382/ps.2011-01738.
- Francour, P. (2014). Comment mesurer la Biodiversité?. Écosystème Côtiers Marins et Réponses aux stress. Université Nice. [En ligne]. < ftp://nephi.unice.fr/users/francour/3_Cours_Mesures_Biodiversite.pdf >. Consulté le 3 février 2017.
- Gabriel, I., Maillet, S., Sibille, P. (2005). La microflore digestive des volailles: facteurs de variation et conséquences pour l'animal. *INRA Prod. Anim.* 18:309-322.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T.J., Van Immerseel, F. (2009). Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol Rev.* doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00161.x.
- Garcia, C., Soriano, J. M., Benitez, V., Catala-Gregori, P. (2011). Assessment of *Salmonella* spp. in feces, cloacal swabs, and eggs (eggshell and content separately) from a laying hen farm. *Poult. Sci.* 90, 1581-1585. doi: 10.3382/ps.2010-01104.
- Gast, R. K.Holt, P. S. (2001). Multiplication in egg yolk and survival in egg albumen of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis strains of phage types 4, 8, 13a, and 14b. *J. Food Prot.* 64:865-868.
- Gast, R.K., Beard, C.W. (1990). Production of *Salmonella* Enteritidis-contaminated eggs by experimentally infected hens. *Avian Disease.* 34, 438-446. doi: 10.2307/1591433.
- GATC Biotech. (2017). Séquençage du microbiome. Séquençage ciblé. [En ligne]. < <https://www.gatc-biotech.com/fr/expertise/sequencage-cible/sequencage-du-gene-de-larnr-16s.html> >. Consulté le 27 février 2017.
- Gentry, R.F. Quarles, C.L. (1972). The measurement of bacterial contamination on egg shells. *Poult. Sci.* 51, 930-933. doi: 10.3382/ps.0510930.
- Glávits, R., Ratz, F., Fehervari, T., Povazsan, J. (1984). Pathological studies in chicken embryos and day-old chicks experimentally infected with *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *Acta Veterinaria Hungarica.* 32:39-49.
- Gonçalves-Tenorio, A., Nunes Silva, B., Cadavez, V., Gonzales-Barron, U. (2018). Prevalence of Pathogens in Poultry Meat: A Meta-Analysis of European Published Surveys. *Foods.* 7:69. doi: 10.3390/foods7050069.
- Gong, J., Si, W., Forster, R.J., Huang, R., Yu, H., Yin, Y., Yang, C., Han, Y. (2006). 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. *FEMS Microbiol Ecol.* 59, 147-157. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00193.x.
- Guémené, D. (2014). Les schémas de sélection génétique répondent-ils aux besoins des productions biologiques des filières avicoles?. *SYSAAF, Centre INRA Val de Loire,*

- Unité de Recherches Avicoles*. [En ligne]. < http://www.itab.asso.fr/downloads/jt-select-animale/4_guemene.pdf >.
- Guinebretière, M., Huonnic, D., de Tréglodé, M., Huneau-Salaün, A., Michel, V. (2009). Cages aménagées pour poules pondeuses: influence de la taille du groupe et de l'apport de litière sur la consommation d'aliment, les performances zootechniques et la mortalité. Résultats préliminaires, *AFSSA, Unité Épidémiologie et Bien-Être en Aviculture et Cuniculture. Huitièmes Journées de la Recherche Avicole*. [En ligne]. < <https://docplayer.fr/storage/49/25167580/1553957941/T7aDn2nBN8cybv1S-oiN4w/25167580.pdf> >. Consulté le 22 janvier 2017.
- Gundry, C.N., Vandersteen, J.G., Reed, G.H., Pryor, R.J., Chen, J., Wittwer, C.T. (2003). Amplicon Melting Analysis with Labeled Primers: A Closed-Tube Method for Differentiating Homozygotes and Heterozygotes. *Clinical Chemistry*. 49, 396-406. doi : 10.1373/49.3.396.
- Grizard, S., Dini-Andreote, F., Irene Tieleman, B., Salles, J.F. (2014). Dynamics of bacterial and fungal communities associated with eggshells during incubation. *Ecology and Evolution*. 4, 1140-1157. doi: 10.1002/ece3.1011.
- Haas, B.J., Gevers, D., Earl, A.M., Feldgarden, M., Ward, D.V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S.K., Sodergren, E., Methé, B., DeSantis, T.Z., The Human Microbiome Consortium, Petrosino, J.F., Knight, R., Birren, B.W. (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Research*. 21, 494-504. doi: 10.1101/gr.112730.110.
- Hameed, K.G.A., Amin, W.F. (2010). Using of PCR assay for identification of helicobacter species in hens' eggs. *Vet. World*. 3:404-408.
- Hébert, G. (2017). Vétérinaire consultant avicole.
- Hou, Q., Kwok, L.Y., Zheng, Y., Wang, L., Guo, Z., Zhang, J., Huang, W., Wang, Y. Leng, L., Li, H., Zhang, H. (2016). Differential fecal microbiota are retained in broiler chicken lines divergently selected for fatness traits. *Scientific Reports*. 6:37376. doi: 10.1038/srep37376.
- Humphrey, S., Chaloner, G., Kemmett, K., Davidson, N., Williams, N., Kipar, A., Wigley, P. (2014). *Campylobacter jejuni* Is Not Merely a Commensal in Commercial Broiler Chickens and Affects Bird Welfare. *mBio*. 5, doi: 10.1128/mBio.01364-14.
- Humphrey, T.J., Whitehead, A., Gawer, Henley, A., Rowe, B. (1991). Numbers of Salmonella Enteritidis in the contents of naturally contaminated hen's eggs. *Epidemiol Infect*. 106:489-496.
- Huneau-Salaün, A., Michel, V., Huonnic, D., Balaine, L., Le Bouquin, S. (2010). Factors influencing bacterial eggshell contamination in conventional cages, furnished cages and free-range systems for laying hens under commercial conditions. *Br. Poult. Sci*. 51, 163-169. doi: 10.1080/00071668.2010.482462.
- Illumina. (2019). Sequencing systems. [En ligne]. < <https://www.illumina.com/systems.html> >. Consulté le 18 avril 2019.
- Im, M. C., Jeong, S. J., Kwon, Y.-K., Jeong, O.-M., Kang, M.-S., Lee, Y. J. (2015). Prevalence and characteristics of Salmonella spp. isolated from commercial layer farms in Korea. *Poult. Sci*. 94, 1691-1698. doi: 10.3382/ps/pev137.
- Jones, D.R., Anderson, K.E., Guard, J.Y. (2012). Prevalence of coliforms, *Salmonella*, *Listeria*, and *Campylobacter* associated with eggs and the environment of conventional

- cage and free-range egg production. *Poult. Sci.* 91, 1195-1202. doi: 10.3382/ps.2011-01795.
- Jones, D.R., Guard, J., Gast, R.K., Buhr, R.J., Fedorka-Cray, P.J., Abdo, Z., Plumblee, J.R., Bourassa, Cox, N.A., Rigsby, L.L., Robison, C.I., Regmi, P., Karcher, D.M. (2016). Influence of commercial laying hen housing systems on the incidence and identification of *Salmonella* and *Campylobacter*. *Poult. Sci.* 95, 1116-1124. doi: 10.3382/ps/pew036.
- Jung, S.J., Park, S.Y., Kim, S.E., Kang, I., Park, J., Lee, J., Kim, C.M., Chung, M.S., Ha, S.D. (2017). Bactericidal Effect of Calcium Oxide (Scallop-Shell Powder) Against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm on Quail Egg Shell, Stainless Steel, Plastic, and Rubber. *J. Food. Sci.* 82, 1682-1687. doi: 10.1111/1750-3841.13753.
- Kaakoush, N.O., Sodhi, N., Chenu, J.W., Cox, J.M., Riordan, S.M., Mitchell, H.M. (2014). The interplay between *Campylobacter* and *Helicobacter* species and other gastrointestinal microbiota of commercial broiler chickens. *Gut Pathog.* 6:18. doi: 10.1186/1757-4749-6-18.
- Knarreborg, A., Simon, M.A., Engberg, R.M., Jensen, B.B., Tannock, G.W. (2002). Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5918-5924. doi : 10.1128/AEM.68.12.5918-5924.2002.
- Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, B.C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., Gonzalez, A., Kosciolk, T., McCall, L.I., McDonald, D., Melnik, A.V., Morton, J.T., Navas, J., Quinn, R.A., Sanders, J.G., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Tripathi, A., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhu, Q., Caporaso, G., Dorrestein, P.C. (2018). Best practices for analysing microbiomes. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 410-422. doi : 10.1038/s41579-018-0029-9.
- Le Gall-David, S., Meuric, V., Benzonii, G., Valière, S., Guyonvarch, A., Minet, J., Bonnaure-Mallet, M., Barloy-Hubler, F. (2017). Effect of Zeolite on Small Intestine Microbiota of Broiler Chickens: A Case Study. *Food. Nut. Sci.* 8, 163-188. doi: 10.4236/fns.2017.81011.
- Lee, W.Y., Kim, M., Jablonski, P.G., Choe, J.C., Lee, S.I. (2014). Effect of Incubation on Bacterial Communities of Eggshells in a Temperate Bird, the Eurasian Magpie (*Pica pica*). *PLoS ONE.* 9, doi: 10.1371/journal.pone.0103959.
- Leeson, S., Summers, J.D. (2005). Commercial Poultry Nutrition, Third Edition. *University of Guelph*. INSN 978-1-904761-78-5.
- Les Producteurs de poulet du Canada. (2018). Rapport annuel 2017. [En ligne]. < <https://www.producteursdepoulet.ca/ressources/rapport-annuel-2017/> >. Consulté le 10 décembre 2018.
- Lu, J., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer, J., Lee, M.D. (2003). Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6816-6824. doi: 10.1128/AEM.69.11.6816-6824.2003.
- Lu, J., Santo Domingo, J.W., Hill, S., Edge, T.A. (2009). Microbial diversity and host-specific sequences of Canada goose feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5919-5926. doi: 10.1128/AEM.00462-09.
- Mahecha, M.D., Martinez, A., Lischeid, G., Beck, E. (2007). Nonlinear dimensionality reduction: Alternative ordination approaches for extracting and visualizing biodiversity patterns in tropical montane forest vegetation data. *Ecological Informatics.* 2,138-149. doi: 10.1016/j.ecoinf.2007.05.002.

- Martin, E., Klug, K., Frischmann, A., Busse, H.J., Kämpfer, P., Jäckel, U. *Jeotgalicoccus coquinae* sp. nov. and *Jeotgalicoccus aerolatus* sp. nov., isolated from poultry houses. 61, 237-241. doi: 10.1099/ijms.0.021675-0.
- Mayes, F.J., Takeballi, M.A. (1983). Microbial contamination of the hen's egg: a review. *J. Food Prot.* 46, 1092-1098. doi: 10.4315/0362-028X-46.12.1092.
- McClure, J. (2008). Conventional and rapid analytical microbiology. *Elsevier*. 545-570. doi: 10.1533/9781845694883.3.545.
- Menni, C., Jackson, M.A., Pallister, T., Steves, C.J., Spector, T.D., Valdes, A.M. (2017). Gut microbiome diversity and high-fibre intake are related to lower long-term weight gain. *International Journal of Obesity*. 41,1099-1105. doi: 10.1038/ijo.2017.66.
- Messens, W., Grijspeerdt, K., Herman, L. (2006). Eggshell penetration of hen's eggs by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis upon various storage conditions. *Br. Poult. Sci.* 47, 554-560. doi: 10.1080/00071660600954601.
- Ministère fédéral de l'agriculture. (1949). Le manuel de l'aviculteur canadien. *Service de la production*. Ottawa. [En ligne]. < http://publications.gc.ca/site/archivee-archived.html?url=http://publications.gc.ca/collections/collection_aac-aafc/agrhist/A12-8-90-1949-fra.pdf >. Consulté le 23 février 2017.
- Minhui, K., Shin, Y.P., Sang-Do, H. (2016). Synergistic effect of a combination of ultraviolet-C irradiation and sodium hypochlorite to reduce *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel and eggshell surfaces. *J. Food Control*. 70,103-109. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.05.003.
- Musgrove, M.T., Jones, D.R., Northcutt., J.K., Harrison, M.A., Cox, N.A., Ingram, K.D., Hinton, A.J. (2005). Recovery of *Salmonella* from Commercial Shell Eggs by Shell Rinse and Shell Crush Methodologies. *Poult. Sci.* 84, 1955-1958.
- Nasrin, S., Islam, M.A., Khatun, M., Akhter, L., Sultana, S. (2012). Characterization of bacteria associated with omphalitis in chicks. *The Bangladesh Vet.* 29, 3-68. doi: 10.3329/bvet.v29i2.14344.
- Neira, C., Laca, A., Laca, A., Diaz, M. (2017). Microbial diversity on commercial eggs as affected by the production system. A first approach using PGM. *Int. J. of Food Microbiol.* 262, 3-7. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.008.
- Nitcheva, L., Yonkova, V., Popov, V. and Manev, C. (1990). *Listeria* isolation from foods of animal origin. *Acta Microbiol. Hung.* 37:223-225.
- O'Brien, K.M., Chimenti, M.S., Farnell, M., Tabler, T., Bair, T. Bray, J.L., Nonnenmann, M.W. (2016). High throughput genomic sequencing of bioaerosols broiler chicken production facilities. *Microbial Biotechnology*. 9, 782-791. doi: 10.1111/1751-7915.12380.
- Oakley, B.B., Kogut, M.H. (2016). Spatial and Temporal Changes in the Broiler Chicken Cecal and Fecal Microbiomes and Correlations of Bacterial Taxa with Cytokine Gene Expression. *Front. Vet. Sci.* 3:11. doi: 10.3389/fvets.2016.000111.
- Pande, V.V., McWhorter, A.R., Chousalkar, K.K. (2016). *Salmonella enterica* isolates from layer farm environments are able to form biofilm on eggshell surfaces. *Biofouling*. 32, 699-710. doi: 10.1080/08927014.2016.1191068.
- Pauwels, J., Taminiou, B., Janssens, G.P.J., De Beenhouwer, M., Delhalle, L., Daube, G., Coopman, F. (2015). Cecal drop reflects the chickens' cecal microbiome, fecal drop not. *J. Microbiol. Methods*. 117,164-170. doi: 10.1016/j.mimet.2015.08.006.

- Poulsen, L.L., Thofner, I., Bisgaard, M., Olsen, R.H., Christensen, J.P., Christensen, H. (2017). *Staphylococcus agnetis*, a potential pathogen in broiler breeders. *Vet. Microbiol.* 212, 1-6. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.10.018.
- Projahn, M., Daehre, K., Roesler, U., Friese, A. (2016). ESBL-/pAmpC-producing enterobacteria in the broiler hatchery – a ode of pseudo-vertical transmission? *Appl. Environ. Microbiol.* doi: 10.1128/AEM.02364-16.
- Producteurs de poulet du Canada. (2019a). Élevage de reproducteurs de poulets de chair. [En ligne] < <https://parlonspoulet.ca/de-la-ferme-jusqua-chez-vous/elevage-de-reproducteurs-de-poulet-de-chair/> >. Consulté le 20 mars 2019.
- Producteurs de poulet du Canada. (2019b). Couvoir. [En ligne] < <https://parlonspoulet.ca/de-la-ferme-jusqua-chez-vous/couvoir/> >. Consulté le 20 mars 2019.
- Producteurs d'œufs d'incubation du Canada. (2015). Modifications du PCQOI^{MC} – 2015. [En ligne] < http://chep-poic.ca/cheq_f.html_20151222-POIC-Manuel.pdf > Consulté le 4 février 2019.
- Protais, J., Queguiner, S., Boscher, E., Piquet, J.C., Nadard, B., Salvat, G. (2003). Effect of housing systems on the bacterial flora of the air. *Br. Poult. Sci.* 43:788-789.
- Radkowski, M. (2002). Effect of moisture and temperature on survival of Salmonella Enteritidis on shell eggs. *Arch. Geflügelk.* 66, 119-123. ISSN 0003-9098.
- Rouger, A., Tresse, O., Zagorec, M. (2017). Bacterial Contaminants of Poultry Meat : Sources, Species, and Dynamics. *Microorganisms.* 5, doi: 10.3390/microorganisms5030050.
- Qioa, H., Zhang, L., Shi, H., Song, Y., Bian, C. (2018). Astragalus affects fecal microbial composition of young hens as determined by 16S rRNA sequencing. *AMB Express.* 8:70. doi: 10.1186/s13568-018-0600-9.
- Quarles, C.L., Gentry, R.F., Bressler, G.O. (1970). Bacterial contamination in poultry houses and its relationship to egg hatchability. *Poult. Sci.* 49, 60-66. doi: 10.3382/ps.0490060.
- Quince, C., Walker, A.W., Simpson, J.T. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat. Biotechnol.* 35, 833-844. doi: 10.1038/nbt.3935.
- Renvoisé, A. (2012). Applicabilité de la PCR « universelle » 16 s comme outils d'identification et de détection bactérienne en laboratoire hospitalier de bactériologie. *Aix-Marseille Université, Faculté de médecine de Marseille, Thèse de doctorat.* 109 pages. p. 5;12;16.
- Sanz, Y., De Palma, G. (2009). Gut Microbiota and Probiotics in Modulation of Epithelium and Gut-Associated Lymphoid Tissue Function. *International Reviews of Immunology.* 28, 397-413. doi: 10.3109/08830180903215613.
- Sauveur, B. (1978). La qualité des œufs objet de recherches françaises. *Cah. Nut. Diét.* 1, 35-45.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S., Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 12:R60. doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60.
- Sekelja, M., Rud, I., Knutsen, S.H., Denstadli, V., Westereng, B., Naes, T., Rudi, K. (2012). Abrupt Temporal Fluctuations in the Chicken Fecal Microbiota Are Explained by Its Gastrointestinal Origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 2941-2948, doi: 10.1128/AEM.05391-11.
- Sergeant, M.J., Constantinidou, C., Cogan, T., Penn, C.W., Pallen, M.J. (2012). High-Throughput Sequencing of 16S rRNA Gene Amplicons : Effects of Extraction

- Procedure, Primer Length and Annealing Temperature. *PLoS ONE*. 7:5. doi: 10.1371/journal.pone.0038094.
- Shoeni, J.L., Glass, K.A., McDermott, J.L., Wang, A.C. (1995). Growth and penetration of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium in eggs. *Int J Food Microbiol.* **24**, 385-393. doi: 10.1016/0168-1605(94)00042-5.
- Singh, K.M., Shah, T., Deshpande, S., Jakhesara, S.J., Koringa, P.G., Rank, D.N., Joshi, C.G. (2012). High throughput 16S rRNA gene-based pyrosequencing analysis of the fecal microbiota of high FCR and low FCR broiler growers. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 10595-10602. doi: 10.1007/s11033-012-1947-7.
- Sivaramalingam, T., Pearl, D.L., McEwen, S.A., Ojkic, D., Guerin, M.T. (2013). A temporal study of *Salmonella* serovars from fluff samples from poultry breeder hatcheries in Ontario between 1998 and 2008. *Can J Vet Res.* **77**, 12-23.
- Smith, A.H., Rehberger, T.G. (2018). Bacteria and fungi in day-old turkeys vary among companies, collection periods, and breeder flocks. *Poult. Sci.* **0**, 1-11 doi: 10.3382/ps/pex429.
- Sparks, N. H. C., Board, R. G. (1985). Bacterial penetration of the recently oviposited shell of hens' eggs. *Aust. Vet.* **62**, 169-170. doi: 10.1111/j.1751-0813.1985.tb07281.x.
- Stanley, D., Geier, M.S., Chen, H., Hughes, R.J., Moore, R.J. (2015). Comparison of fecal and cecal microbiotas reveals qualitative similarities but quantitative differences. *BMC Microbiology.* **15**:51. doi: 10.1186/s12866-015-0388-6.
- Swakey, M.D., Firestone, M.K., Brodie, E.L., Beissinger, S.R. (2009). Avian Incubation Inhibits Growth and Diversification of Bacterial Assemblages on Eggs. *PLoS ONE*. **4**, doi: 10.1371/journal.pone.0004522.
- Techer, C., Baron, F., Jan, S. (2013). Microbial spoilage of eggs and egg products. *World's Poult. Sci. J.* **69**. Supplement.
- Thibodeau, A., Fravallo, P., Yergeau, É., Arsenault, J., Lahaye, L., Letellier, A. (2015). Chicken Caecal Microbiome Modifications Induced by *Campylobacter jejuni* Colonization and by a Non-Antibiotic Feed Additive. *PLoS ONE*. **10**, doi: 10.1371/journal.pone.0131978.
- Thomas, M.K., Murray, R., Flockhart, K., Pintar, K., Pollari, F., Fazil, A., Nesbitt, A., Marshall, B. (2013). Estimates of the Burden of Foodborne Illness in Canada for 30 Specified Pathogens and Unspecified Agents, Circa 2006. *Foodborne Pathogens and Disease.* **10**:7. doi: 10.1089/fpd.2012.1389.
- Tlaskalová-Hogenová, H., Stepánková, R., Hudcovic, T., Tucková, L., Cukrowska, B., Lodinová-Zadniková, R., Kozáková, H., Rossmann, P., Bártová, J., Sokol, D., Funda, D.P., Borovská, D., Reháková, Z., Sinkora, J., Hofman, J., Drastich, P., Kokesová, A. (2004). Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters.* **93**, 97-108. doi: 10.1016/j.imlet.2004.02.005.
- Torok, V.A., Allison, G.E., Percy, N.J., Ophel-Keller, K., Hughes, R.J. (2011). Influence of antimicrobial feed additives on broiler commensal posthatch gut microbiota development and performance. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 3380-3390. doi: 10.1128/AEM.02300-10.
- Trawinska, B., Chmielowiec-Korzeniowska, A., Nowakowicz-Debek, B., Tymczyna, L., Bombik, T., Pyrz, M., Tymczyna-Sobotka, M. (2016). Evaluation of microbial

- contamination of feces and soil on a laying-hen farm depending on sampling site and season. *Revista Brasileira de Zootecnia*. ISSN 1806-9290.
- Van der Wielen, P. W., D. A. Keuzenkamp, L. J. Lipman, F. van Knapen, and S. Biesterveld. 2002. Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. *Microb. Ecol.* 44:286–293.
- Van Immerseel, F., De Buck, F., Pasmans, F., Bertrand, S., Collard, J.M., Saegerman, C., Hooyberghs, J., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. (2005). *Salmonella* dans la viande de volaille et dans les œufs: un danger pour le consommateur qui demande la mise en place d'un programme de lutte efficace. *Ann. Méd. Vét.* 149 :34-48.
- Van Veelen, H.P.J., Salles, J.F., Tieleman, B.I. (2017). Microbiome assembly of avian eggshells and their potential as transgenerational carriers of maternal microbiota. *ISME J.* doi: 10.1038/s41396-018-0067-3. 12, 1375-1388.
- Videnska, P., Faldynova, M., Juricova, H., Babak, V., Sisak, F., Havlickova, H., Rychlik, I. (2013). Chicken faecal microbiota and disturbances induced by single or repeated therapy with tetracycline and streptomycin. *BMC Vet. Res.* 13, 9:30. doi: 10.1186/1746-6148-9-30.
- Videnska, P., Rahman, M.M., Faldyova, M., Babak, V., Matulova, M.E., Prukner-Radovic, E., Krizek, I., Smole-Mozina, S., Kovac, Szmolka, A., Nagy, B., Sedlar, K., Cejkova, D., Rychlik, I. (2014). Characterization of Egg Laying Hen and Broiler Fecal Microbiota in Poultry Farms in Croatia, Czech Republic, Hungary and Slovenia. *PLoS ONE*. 9. doi: 10.1371/journal.pone.0110076.
- Weidhaas, J.L., Macbeth, T.W., Olsen, R.L., Sadowsky, M.J., Norat, D., Harwood, V.J. (2009). Identification of a *Brevibacterium* marker gene specific to poultry litter and development of a quantitative PCR assay. *J. Appl. Microbiol.* 109, 334-347. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04666.x.
- Yan, W., Sun, C., Yuan, J., Yang, N. (2017). Gut metagenomic analysis reveals prominent roles of *Lactobacillus* and cecal microbiota in chicken feed efficiency. *Scientific Reports*. 7, doi: 10.1038/srep45308.
- Yeh, H.Y., Line, J.E., Jr, A.H. (2018). Molecular Analysis, Biochemical Characterization, Antimicrobial Activity, and Immunological Analysis of *Proteus mirabilis* Isolated from Broilers. *J. Food. Sci.* 83, 770-779. doi: 10.1111/1750-3841.14056.
- Youssef, N., Sheik, CS., Krumholz, LR., Najar, FZ., Roe, BA., Elshahed, MS. (2009). Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 227-236. doi: 10.1128/AEM.00592-09.
- Zhu, X.Y., Zhong, T., Pandya, Y., Joerger, R.D. (2002). 16S rRNA-Based Analysis of Microbiota from the Cecum of Broiler Chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 124-137. doi: 10.1128/AEM.68.1.124-137.2002.