**RECHERCHES SUR LES CHAMPIGNONS
PRODUISANT DES ALTÉRATIONS DANS LES ŒUFS
DESTINÉS A LA CONSOMMATION**

Par **M. BAEZA** (1)

Sur le conseil du professeur Brumpt, j'ai examiné systématiquement plusieurs lots d'œufs altérés provenant des Halles centrales de Paris et saisis par l'inspection vétérinaire. J'ai étudié ainsi 250 œufs, dans le but de rechercher les relations pouvant exister entre ces altérations et la présence de champignons parasites, notamment du genre *Sporotrichum*, qui, d'après J. Csontos (2) (1927), se rencontreraient dans 20 à 50 p. 100 des œufs altérés en Hongrie (3).

Voici la technique que j'ai suivie pour effectuer cet examen :

1° Examen de chaque œuf par lumière transmise devant une lampe de forte intensité (lampe de Stiassnie pour éclairage à fond noir) de manière à marquer sur la coquille la place des taches. Pour chaque œuf, j'ai tracé un croquis et rédigé une description de toutes les particularités observées.

2° Au niveau de la tache la plus caractéristique, j'ai lavé la coquille à l'alcool, je l'ai flambée très délicatement, puis j'ai pratiqué, avec une pince fine, une petite ouverture, à travers laquelle j'ai prélevé, avec le fil à ensemencer, une particule d'œuf altéré. Avec cette prise, j'ai ensemencé en 4 ou 5 points un tube de gélose peptonée, glycosée à 2 p. 100.

3° Une autre particule d'œuf altéré était prélevée avec le fil, dissociée sur une lame avec les aiguilles et montée entre lame et lamelle dans une goutte de gomme au chloral additionnée de bleu coton.

(1) Traduit de l'espagnol par le Dr Maurice Langeron.

(2) CSONTOS (J.). — La sporotrichose des œufs. *Közlemenyek az orszhasoulito eletes kortun*, Kerehol, XX, 1927, p. 160. Analysé dans *Bull. Inst. Pasteur*, XXVI, 1928, p. 457.

(3) Les altérations des œufs ont fait l'objet, il y a 41 ans, d'un travail fondamental : ARTAULT (S.). — *Recherches bactériologiques, mycologiques, zoologiques et médicales sur l'œuf de poule et ses agents d'infection*. Thèse Fac. méd., Paris, 1893.

4° Ouverture complète de l'œuf pour en observer toutes les altérations et compléter les notes prises lors de l'examen en lumière transmise.

5° Examen de la préparation faite avec le matériel frais, revue de l'observation. On place enfin le tubeensemencé à l'étuve à 37°.

Les œufs que j'ai ainsi examinés étaient de provenance très variée : France, Yougoslavie, Roumanie, Pologne, Danemark. Ils ont présenté les caractères suivants :

I. A la simple *inspection par transparence*, devant la lampe, on pouvait distinguer trois types fondamentaux d'œufs altérés.

A. Œufs présentant des *taches* en général *petites, nombreuses, noires, arrondies, à contours nets* (A, fig.). Quelquefois, ces taches étaient confluentes, de manière à former une tache plus grande, à contour festonné.

B. Œufs présentant généralement *une seule tache, grande, à contour diffus, moins nette* que les précédentes (B, fig.). Je crois que la raison pour laquelle les taches de ce type sont toujours grandes est que, lorsqu'elles sont petites, elles passent inaperçues à cause de leur peu de contraste.

C. Œufs plus ou moins complètement et *uniformément opaques* (C, fig.).

Il y a, en outre, des œufs qu'il est difficile de ranger dans un de ces trois groupes, mais ils sont peu nombreux et la séparation peut être effectuée dans 80 p. 100 des cas.

II. A ces trois types d'altérations, reconnaissables à l'examen externe, par transparence, correspondent trois types qui apparaissent à l'*examen du contenu de l'œuf*, après ouverture.

A. Œufs présentant, adhérant à la coquille, de *petites zones gélatino-filamenteuses*, de couleur vert grisâtre plus ou moins foncé. Dans ces taches, on observe un mycélium. Elles occupent les places marquées lors de l'examen par transparence, le reste de l'œuf étant inaltéré.

B. Œufs présentant, adhérant à la coquille, une *vaste zone gélatineuse*, de couleur gris clair, tirant souvent sur le rougeâtre. Le reste de l'œuf est inaltéré. Cette zone est toujours un peu plus étendue que les limites observées par transparence.

C. Œufs *putréfiés*, avec blanc et jaune troubles, formant un liquide jaunâtre, grumelleux. Au moment de la piqûre, il s'échappe des gaz sous pression, d'odeur presque toujours sulfhydrique. Dans ces œufs, on ne peut indiquer aucune zone caractéristique, l'altération est uniforme.

III. Ces trois types d'altération se retrouvent très distincts à l'examen microscopique.

Dans les types A et B, on trouve toujours le mycélium d'un champignon. Dans le type C, il n'y a pas de mycélium, mais seulement une altération d'origine bactérienne.

On peut donc affirmer que les champignons se développent à l'intérieur de l'œuf sans produire sa décomposition. Leur croissance se produit toujours sous la forme d'un foyer qui s'irradie à partir du point d'inoculation. Au contraire, les bactéries diffusent dans la masse de l'œuf, l'envahissent complètement et produisent sa putréfaction.

Dans les œufs des types A et B, le mycélium ne présente aucun appareil sporifère qui puisse permettre d'en faire la détermination. Dans le cas des taches noires circonscrites (type A), il s'agit de filaments de couleur foncée, très cloisonnés, à paroi épaisse. Dans les grandes taches diffuses du type B, le mycélium est plus fin, plus transparent et moins cloisonné.

Dans certains cas (7 sur 250), on peut reconnaître le groupe auquel appartient le champignon parasite par le seul examen de la préparation extemporanée. Dans deux cas, il s'agissait d'un *Hormiscium* et dans un cas, d'un *Zygodesmus*. Dans ces trois cas, le champignon était complètement plongé dans le blanc de l'œuf. Dans quatre autres cas, il s'agissait d'infections mixtes par *Penicillium*, *Hormodendron* et *Alternaria*. Dans ces quatre derniers cas, les œufs étaient extraordinairement desséchés par des fissures invisibles. Les champignons s'étaient développés à la limite du contenu desséché et de la grande chambre à air.

Une fois cultivés, les œufs du groupe A donnent des colonies vert foncé ou gris noirâtre, ceux du groupe B, des colonies blanches ou légèrement colorées en rouge ou en jaune. Ceux du groupe C donnent des colonies bactériennes. Comme ces dernières ne faisaient pas l'objet de nos recherches, je me suis contenté de signaler leur présence.

En ce qui concerne les champignons, je n'ai rencontré aucun *Sporotrichum*, genre dont la recherche était pourtant le but de ce travail. 30 p. 100 des champignons visibles à l'examen direct ne se développent pas à 37°. 70 p. 100 peuvent vivre à 37°, mais se développent pauvrement, ils ne supportent pas la température de 40°, mais, au contraire, prospèrent à la température du laboratoire. La plupart de ces derniers appartiennent à des groupes abondamment répandus comme saprophytes dans le milieu extérieur et non considérés jusqu'ici comme pathogènes, au moins pour les animaux à

sang chaud. Je suis donc porté à les regarder comme des saprophytes vulgaires, sans nier pour cela la possibilité qu'un champignon pathogène puisse se rencontrer dans un œuf.

Voici le résumé des résultats de mes ensemencements :

Groupe C, 54 œufs (bactéries) (C. fig.)	donnant des cultures à 37° : 54	46 cultures bactériennes pures et 8 cultures bactériennes associées à un <i>Fusarium</i> .
Groupe A œufs avec petites taches noires et nettes 96 (A. fig.)	Ne végétant pas à 37° : 39.	<i>Hormodendron</i> 20. <i>Cladosporium</i> 7. <i>Alternaria</i> 10. <i>Stemphylium</i> 4. <i>Penicillium</i> 6. <i>Chætomium</i> 4.
	Donnant des cultures à 37° : 39	<i>Hormodendron</i> avec bactéries 2. <i>Cladosporium</i> avec bactéries 3. <i>Penicillium</i> avec bac- téries 1.
Groupe B œufs avec grande tache diffuse, unique : 88 (B. fig.)	Ne végétant pas à 37° : 26.	<i>Fusarium</i> 48. <i>Cephalosporium</i> 5. <i>Tilachlidium</i> 1.
	Donnant des cultures à 37° : 62	<i>Myceliophthora</i> 1. <i>Zygodesmus</i> avec bactéries 1. <i>Fusarium</i> avec bac- téries 6.

Pour faire la contre-épreuve des cultures et pour m'assurer que les champignons cultivés provenaient bien des œufs infectés et non de contaminations accidentelles des milieux de culture, j'ai inoculé 11 œufs frais, récemment pondus, avec un nombre égal de champignons représentant chacun un des principaux types obtenus en culture. Voici les noms de ces types : *Hormodendron*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Chætomium*, *Fusarium* rouge, *Fusarium* jaune, *Cephalosporium*, *Tilachlidium*, *Myceliophthora*, *Zygodesmus* et une bactérie.

Dans chaque œuf inoculé, j'ai vu se reproduire l'aspect et le mode d'altération d'où avait été isolé le champignon. Les taches noires des œufs du groupe A étaient visibles au quatrième jour et les autres au huitième (les œufs avaient été placés à l'étuve à 25-27°).

Pour l'inoculation des œufs, j'ai employé la technique suivante :

1° Pour chaque champignon à inoculer, faire une suspension de spores dans un petit tube à hémolyse.

2° L'œuf à inoculer est percé au gros pôle, en donnant des coups secs et légers au moyen d'une fine pince à dissection. On doit obtenir un orifice punctiforme qui n'intéresse que la portion calcaire de la coquille (D, o, fig.).

3° Avec une effilure de pipette très fine, aspirer quelques gouttes

FIG. — A, œufs du groupe A, à nombreuses taches petites et noires. B, œufs du groupe B, à grande tache diffuse. C, œufs putréfiés par les bactéries, chacune des figures représente, en haut l'œuf miré sur ses deux faces, en bas la coupe schématique sagittale de l'œuf). D, œuf prêt à être ensemencé : *j*, jaune ; *bl*, blanc ; *c*, chambre à air ; *o*, orifice obtenu par perforation. E, coupe schématique de l'œuf ensemencé : *j*, jaune ; *bl*, blanc ; *p*, pipette d'ensemencement ; *v*, colonie du champignon *l*, lut obturant l'orifice et maintenant en place la pipette.

de la suspension des spores et flamber très légèrement la pointe de la pipette pour éliminer les spores qui peuvent adhérer à la paroi externe.

4° Plonger verticalement la pipette dans l'œuf jusqu'au jaune et insuffler une goutte de l'émulsion de spores. Immédiatement et en ayant soin que la pipette ne bascule pas, couper sa partie externe et sceller avec la veilleuse du bec de gaz l'orifice de la partie qui dépasse l'œuf (E, fig.).

5° Sceller le pourtour de l'orifice avec du lut de du Noyer à la lanoline ; mettre l'œuf avec la pipette à l'étuve à 25°.

Résultats. — Les résultats de ce travail sont négatifs en ce qui concerne les œufs comme réservoirs *habituels* de champignons pathogènes pouvant causer l'apparition de maladies. Pourtant, le fait de la présence de champignons à l'intérieur d'un œuf pose le problème de leur mode de pénétration.

Sans nier la possibilité que, dans des circonstances anormales, un champignon puisse pénétrer dans l'œuf pendant qu'il est encore dans l'ovaire, comme l'admettait Gayon (1) en 1875, je ne crois pas que, normalement, les choses se passent ainsi, ni qu'habituellement, l'œuf s'infecte au niveau de l'oviducte. La contamination se produit généralement après la ponte.

Voici les raisons qui plaident en faveur de cette manière de voir :

1° Les champignons trouvés dans les œufs ne se développent pas à 40° qui est la température de la poule.

2° En admettant que le champignon pénètre dans l'œuf avant la ponte, soit au moment du coït, comme l'admettent Carles et Réaumur (2), soit par suite de quelque autre cause, la végétation commencerait immédiatement et les œufs contaminés seraient inutilisables avant que 15 jours se soient écoulés depuis la ponte, surtout dans les pays chauds, ce qui ne se produit pas.

Nous avons reconnu, dans nos expériences d'inoculation à l'étuve à 25-27°, qu'ils sont inutilisables en 4 à 7 jours. Les œufs altérés sont donc les œufs anciens.

3° Les œufs fissurés (à fissures invisibles) étaient tous infectés le long de la fissure et cette infection ne différait en rien de celle qu'on observe dans les œufs non fissurés.

4° Le champignon est toujours à la surface de l'œuf, contre la coquille, et jamais au centre de l'œuf. Dans les œufs que nous avons inoculés expérimentalement, même quand l'inoculation était profonde, les colonies étaient superficielles, mais non adhérentes à la coquille comme dans l'infection naturelle. On comprend que les colonies soient superficielles (en dehors du fait que le jaune de l'œuf ne paraît pas être un bon milieu de culture pour les champignons, tant par sa composition que parce qu'il est à l'abri de l'air) parce qu'en injectant la goutte d'émulsion de spores, faute de place au centre, cette goutte remonte le long de la pipette jusqu'à la chambre à air, et c'est là que la germination commence.

(1) U. GAYON. — *Altération spontanée des œufs*. Thèse Fac. Sc., Paris, 1875 (cité d'après Artault).

(2) RÉAUMUR. — *Art de faire éclore et d'élever en toute saison des oiseaux domestiques*, I, 1751, p. 253 (cité d'après Artault).

5° Les œufs salis ou pondus sur de la paille humide s'altèrent plus rapidement que les œufs propres conservés dans de bonnes conditions (Cartier). Ces derniers se dessèchent au lieu de pourrir. D'autre part, la conservation peut être facilitée en renforçant la coquille avec du lait de chaux.

6° 90 p. 100 des œufs sont mycologiquement stériles au moment où ils sont pondus, comme le montrent les travaux de Maurer, Mason, Genkis, Normand, Hendrickson, Pennington. La possibilité de la pénétration de moisissures venant de l'extérieur est établie depuis Réaumur.

Le mécanisme de l'infection est probablement le suivant :

Les spores ou les filaments de champignons arrivent sur la coque de l'œuf avec les poussières atmosphériques et surtout par l'intermédiaire de la paille humide et des déjections qui y adhèrent. Ces éléments mycéliens rencontrent une première barrière dans l'espèce de vernis qui couvre la coque calcaire et qui est détruit par l'humidité (on voit là un des motifs de l'importance de ce facteur) ; une seconde barrière est constituée par la coquille calcaire elle-même. Mais cette coquille présente un grand nombre de points faibles, de véritables pores, comme on peut le voir en mirant l'œuf, c'est-à-dire en l'éclairant avec une forte lumière transmise.

Une spore, venant à être déposée sur un de ces pores, germe avec difficulté si le milieu ambiant est sec et avec facilité si ce milieu est humide et si la température est favorable. Au moment de la germination, le tube mycélien s'insinue dans un pore et arrive au contact de la partie nutritive de l'œuf sur laquelle il continue à se développer. Beaucoup de spores échouent certainement dans cette tentative ; mais comme elles sont très nombreuses, surtout si l'œuf est sale, quelques-unes parviennent à passer. Même si les fissures sont imperceptibles, elles suffisent à assurer la pénétration des germes, de même que les coquilles minces opposent une moindre résistance à leur entrée.

Le vieillissement des œufs favorise aussi la pénétration des germes, parce que, dans la chambre à air qui se forme par suite de l'évaporation de l'eau, la pression augmente lorsque la température monte (on sait que les gaz sont très dilatables), et le gaz s'échappe.

Par contre, lorsque l'œuf se refroidit, sa pression intérieure diminue et il se produit à son intérieur un vide que l'air extérieur tend à combler ; il s'établit ainsi un courant d'air qui facilite certainement la pénétration des spores. Les effets de la chambre à air sont d'autant plus énergiques que cette chambre est plus grande.

RÉSUMÉ

1. L'examen de 250 œufs, saisis par le service vétérinaire des Halles de Paris, a été négatif en ce qui concerne la présence de champignons des genres *Sporotrichum* ou *Rhinocladium*.

2. Parmi les œufs présentant des altérations, on peut distinguer trois catégories :

A. Œufs avec taches foncées, petites, nombreuses et très nettes, produites par des champignons à thalle fuligineux.

B. Œufs avec une seule grande tache diffuse, produite par des champignons à thalle incolore ou de couleur claire.

C. Œufs putréfiés, à contenu trouble homogène, la putréfaction étant produite par des bactéries.

3. Les altérations des catégories A et B ont pu être reproduites expérimentalement, en inoculant des œufs frais avec les champignons isolés de ces deux catégories.

4. Cette étude expérimentale, ainsi que la disposition des taches, montrent que les œufs doivent être infectés après avoir été pondus, lorsqu'ils sont souillés de déjections de poules ou lorsqu'ils sont en contact avec de la paille humide.

5. L'infection avant la ponte paraît devoir être exceptionnelle, car aucun des champignons que nous avons isolés ne peut se développer à 40°, c'est-à-dire à la température normale de la poule. Sur 184 souches, 119 seulement peuvent vivre à 37°.

Section de mycologie du Laboratoire de parasitologie de la Faculté de Médecine de Paris (chef de service : D^r M. Langeron).