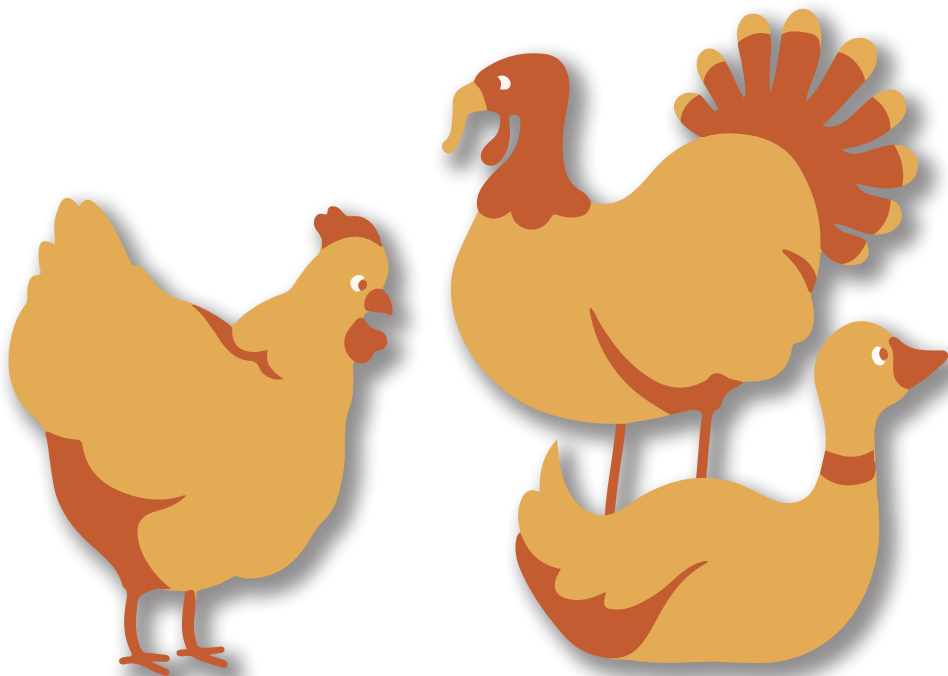


12^e Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras



5 & 6 avril 2017

TOURS - Centre des congrès Vinci



RAISING LIFE



NOTHING IS MORE PRECIOUS THAN LIFE. THAT IS THE PHILOSOPHY DRIVING PHILEO.

With global population increasing, the world faces a growing demand for sustainable food.

Phileo Lesaffre Animal Care works at the crossroads of nutrition and health. We are committed to delivering poultry health and performance solutions that contribute to food safety and the responsible use of antibiotics.

In every country, our progress is led by the most advanced science as well as practical on-farm experience.

phileo-lesaffre.com

 **Phileo**
LESAFFRE ANIMAL CARE

ORVIA GOURMAUD SÉLECTION

5, La Seigneurtière – Saint-André-Treize-Voies
85260 MONTREVERD – FRANCE
Tél : +33 (0)2 40 02 02 00 // Fax : +33 (0)2 40 02 02 07
E-mail : contact@orvia.fr
WWW.ORVIA.FR

MASTERING A WHOLE PROCESS

La maîtrise de tout un process

GENETIC SELECTION / Sélection Génétique

INTEGRAL INDUSTRIAL PROCESS / Processus Industriel Complet

ENVIRONMENT & ANIMAL WELFARE / Environnement & BEA

RISK MANAGEMENT / Management des Risques

CONSULTANCY & SERVICES / Conseils & Services

ST6



MUSCOVY DUCK
Canard de Barbarie

ST5



PEKIN DUCK
Canard Pékin

STIMUL



MULE DUCK
Canard Mulard

SI



WHITE & GREY GEESSE
Oie blanche & grise



Les 12^{èmes} Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras ont été organisées avec le soutien financier des sociétés et organismes suivants :



Ensemble, pour nourrir l'excellence

SESSION
PATHOLOGIE - PREVENTION

Synthèse

DERNIERES AVANCEES SUR LA BIOLOGIE, LA PREVENTION ET LE CONTROLE DE L'HISTOMONOSE

Hess Michael

*CLINIC FOR POULTRY AND FISH MEDICINE & CHRISTIAN DOPPLER LABORATORY
FOR INNOVATIVE POULTRY VACCINES (IPOV); Department for Farm Animals and
Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine, Veterinärplatz 1, 1210
VIENNA, Austria
michael.hess@vetmeduni.ac.at*

L'histomonose a été décrite pour la première fois en 1893 comme une maladie complexe de la dinde. La maladie a ensuite été observée chez le poulet et d'autres oiseaux galliformes avec une sévérité moindre. Des données récentes indiquent cependant que les pertes économiques induites par la maladie peuvent être très substantielles chez l'espèce poule, notamment chez les pondeuses et les reproducteurs de type « chair ». La maladie est causée par le protozoaire parasite *Histomonas meleagridis*, dont la position taxonomique a été révisée après les travaux approfondis de E.E. Tyzzer au début du siècle dernier, comme récemment revu par Williams (2013).

L'étiologie de l'histomonose est restée discutée pendant de nombreuses années, en lien avec le fait que le protozoaire parasite entretient des interactions complexes avec différentes bactéries, tout particulièrement

Escherichia coli (Hess, 2017). En fait, la présence de certaines bactéries est nécessaire pour que l'infection puisse s'établir. Ces synergies compliquées expliquent en partie i) pourquoi les manifestations cliniques de l'infection peuvent varier et ii) pourquoi il peut y avoir des incohérences entre différentes études expérimentales de la maladie (Hauck & Hafez, 2013).

Pendant plusieurs dizaines d'années, la maladie a pu être contrôlée efficacement grâce à la disponibilité de molécules efficaces développées pour sa prévention ou son traitement (Liebhart et al. 2016). Cependant, du fait de l'interdiction récente de ces molécules dans de nombreux pays, parmi lesquels ceux de l'Union Européenne ou les USA, la maladie qui était jusqu'alors bien contrôlée a été décrite bien plus fréquemment jusqu'à prendre la forme d'une vraie maladie ré-émergente (Hess et al. 2015). Un système en ligne de

déclaration des cas observés en élevage a été développé (www.blackheaddisease.info), il devrait permettre d'obtenir des données consolidées sur la maladie et d'accroître sa prise en compte, ce qui est nécessaire pour tenter d'améliorer notre compréhension de l'épidémiologie des épisodes d'augmentation soudaine du nombre des cas terrain.

La ré-émergence de la maladie a suscité un effort de recherche sur le pathogène lui-même et la maladie, tout particulièrement en matière de diagnostic de laboratoire et de stratégies alternatives pour la prévention de la maladie. En plus de la PCR, des techniques plus précises pour détecter le pathogène dans les tissus ont été développées. Différents types de tests ELISA récemment mis au point ont permis pour la première fois de réaliser des screening sérologiques dans les troupeaux de poulets. De nombreuses substances d'origine végétale ont été testées *in vitro* et *in vivo* mais les résultats obtenus semblent peu prometteurs. En comparaison, il a été montré que la vaccination constituait une approche efficace pour prévenir les pertes liées à la maladie. Enfin, la combinaison des cultures clonales d'*Histomonas* et des nouvelles techniques de biologie moléculaire préparent et rendent possible une étude plus précise de la biologie d'*H. meleagridis*. Cependant, et en dépit de ces

progrès, de nombreux défis restent à relever pour contrôler l'histomonose.

Si la maladie chez la dinde se traduit par une mortalité élevée, sa sévérité est moindre chez le poulet (McDougald, 2005). Quelle que soit l'espèce aviaire concernée, la maladie pour laquelle aucun traitement n'est disponible constitue une atteinte importante au bien-être animal, du fait de souffrances considérables chez les oiseaux malades. Sur le plan économique, les pertes de production peuvent être très significatives non seulement chez la dinde mais aussi chez les poules pondeuses ou les reproducteurs de type chair, ce qui souligne l'importance de la maladie.

Différentes approches ont été tentées au cours des dernières années pour tenter de limiter l'impact de l'histomonose chez les volailles et un bon niveau de biosécurité est un facteur important (Callait-Cardinal et al. 2009). Cependant, ce facteur ne permet pas de comprendre comment la maladie apparaît chez les volailles reproductrices. Bien que la paromomycine, un antibiotique aminoglycoside, contribue à minimiser les conséquences de l'infection lorsqu'il est distribué à titre prophylactique, il ne convient pas pour une intervention à titre thérapeutique. Par ailleurs, son usage prophylactique suscite des préoccupations en matière d'induction

d'antibiorésistances (Kempf et al. 2013). Les données expérimentales sur différents extraits végétaux sont quelque peu contradictoires et aucun de ces produits n'a démontré une activité satisfaisante *in vivo*. A l'opposé, une bonne protection a été démontrée avec des parasites vivants atténués, mais des efforts supplémentaires sont encore nécessaires pour arriver à l'enregistrement du premier vaccin vivant atténué jamais développé contre un parasite flagellé (Liebhart et al. 2016).

L'apparition de l'histomonose au début du siècle dernier a suscité un effort de recherche intense qui a cessé après le développement de médicaments efficaces.

En conséquence, aucune recherche n'a été conduite pendant plusieurs dizaines d'années, à l'origine de lacunes substantielles. Avec l'interdiction des médicaments précités, la maladie est réapparue et la recherche a été intensifiée à nouveau. Malgré cette reprise, des lacunes importantes persistent et beaucoup d'efforts sont encore nécessaires pour comprendre la biologie complexe de ce protozoaire parasite, ce qui constitue un préalable indispensable au développement de nouvelles stratégies efficaces de protection qui ont été revues dans leur ensemble dans la présente synthèse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Callait-Cardinal, M.P., Gilot-Fromont, E., Chossat, L., Gonthier, A., Chauve, C. & Zenner, L., 2010. *Epidemiol. Infect.*, (138), 353-363.
- Hauck, R. & Hafez, H.M., 2013. *Parasitol. Res.*, (112), 19-34.
- Hess, M., 2017. *Br.Poult.Sci.*, doi.10.1080/00071668.2016.1245849
- Hess, M., Liebhart, D., Bilic, I., & Ganas, P., 2015. *Vet. Parasitol.*, (208), 67-76.
- Kempf, I., Le, R.A., Perrin-Guyomard, A., Mourand, G., Le, D.L., Bougeard, S., Richez, P., Le, P.G., & Eterradossi, N., 2013. *Vet. J.*, (198), 398-403.
- Liebhart, D., Ganas, P., Sulejmanovic, T. & Hess, M. 2016. *Avian Pathol.*, doi.10.1080/03079457.2016.1229458
- McDougald, L.R., 2005. *Avian Dis.*, (49), 462-476.
- Willimas, R.B., 2013. *Avian Dis.*, (57), 716-729.

SESSION

PATHOLOGIE - PREVENTION

Communications orales

ETUDE EXPERIMENTALE DE LA CINETIQUE DE TRANSMISSION D'UNE SOUCHE EUROPEENNE DU CORONAVIRUS DE LA DINDE SUR DINDONNEAUX EOPS

Paul Brown^{1,2}, Celine Courtillon^{1,2}, Chantal Allée^{1,2}, Anthony Vendembeuche³, Michel Amelot³, Mathieu Andraud⁴, Nicolas Rose⁴ and Nicolas Eterradosi^{1,2}

¹*Unité VIPAC, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES), Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Université Européenne de Bretagne, BP 53-22440 PLOUFRAGAN, France*

²*EPICOREM Consortium, Université de Caen, Unité de Recherche Risques Microbiens (U2RM), F-14000 CAEN, France*

³*Unité SELEAC, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES), Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Université Européenne de Bretagne, BP 53-22440 PLOUFRAGAN, France*

⁴*Unité UBEP, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES), Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Université Européenne de Bretagne, BP 53-22440 PLOUFRAGAN, France*

paul.brown@anses.fr

RÉSUMÉ

Depuis plusieurs décennies, de nombreux virus (réo-, adéno-, picorna-, corona-, astrovirus, etc.) ont été associés à des cas de « poult enteritis complex » (PEC), principalement dans des infections mixtes. Bien connu aux Etats-Unis depuis les années 1970 en tant qu'agent de la maladie de la crête bleue ou « bluecomb », le coronavirus de la dinde n'a par contre pas été détecté en Europe avant 2001. En 2008, un coronavirus (Fr-TCoV 080385d) a été isolé à partir de dindonneaux présentant des signes cliniques compatibles avec PEC. Dans des études publiées en 2011 et plus récemment en 2016, l'analyse de la séquence de génome entier de ce virus a démontré l'existence de recombinaisons complexes entre la souche française, les souches américaines, un coronavirus européen isolé sur la pintade et des souches du virus de la bronchite infectieuse. L'étude présentée vise à déterminer les propriétés de transmission du Fr-TCoV en évaluant sa dose minimale infectieuse chez le dindonneau EOPS et sa vitesse de reproduction (R0) en conditions expérimentales. Les résultats ont révélé i) que le virus était encore infectieux au-delà de la limite de détection du génome en utilisant une qRT-PCR bien caractérisée (Maurel et al., 2011) pour les coronavirus aviaires (AvCoV), ii) que la transmission horizontale était extrêmement rapide (dès 10 heures), et iii) que le génome viral était détecté dans le contenu intestinal jusqu'à cinq semaines post-inoculation. Une aussi longue durée d'excrétion a également été documentée pour les TCoV aux Etats-Unis et des études complémentaires sont en cours afin de déterminer si le virus détecté reste infectieux pendant toute la durée d'excrétion digestive du génome viral.

ABSTRACT

Kinetics of a european turkey coronavirus (fr tcov) during experimental infection of spf turkeys

For several decades, numerous viruses (reo-, adeno-, picorna-, corona-, astroviruses etc), mostly in mixed infections, have been found worldwide to be associated with poult enteritis complex (PEC). Although known in the USA since the 1970 as the agent of bluecomb, no coronavirus was detected in Europe in turkeys until 2001. Since 2003, an increasing number of turkey flocks exhibiting clinical signs compatible with PEC have been observed in different geographical locations in France and presented a major concern for turkey production. In 2008 a coronavirus (Fr-TCoV 080385d) was isolated from turkey poults exhibiting clinical signs compatible with PEC. In studies published in 2011 and most recently in 2016, analysis of the full length sequence of this virus has demonstrated a complex recombination history between Fr-TCoV 080385d, US TCoV, a European coronavirus isolated from guinea fowl and IBVs. The study describes the transmission properties of Fr-TCoV by evaluating its minimal infectious dose and attempts to estimate its reproductive rate (R0) in SPF turkeys under experimental conditions. The results revealed i) that the virus was still infectious beyond the limit of genome detection using a well-characterized qRT-PCR (Maurel et al., 2011) for avian coronaviruses (AvCoV), ii) that horizontal transmission was extremely rapid (within 10 hours), and (iii) that the viral genome was detected in intestinal contents up to five weeks post-inoculation. Such a long duration of excretion has also been documented for TCOVs in the United States. Further studies are under way to determine whether the detected virus genome in digestive excretions correlates with actual infectious virus.

INTRODUCTION

Les Coronavirus sont des virus enveloppés avec un génome constitué d'ARN positif simple brin, classés dans l'ordre des *Nidovirales* et dans la famille des *Coronaviridae*. Celle-ci est composée de quatre genres, alpha, beta, delta et gamma, définis sur la base des regroupements phylogénétiques. Le genre gamma-coronavirus est principalement composé de virus isolés chez les oiseaux (coronavirus aviaires notés AvCoV), avec parmi eux le virus de la bronchite infectieuse (IBV), le coronavirus de la dinde (TCoV) et le coronavirus de la pintade (GfCoV).

L'IBV est un virus hautement contagieux et transmis très rapidement parmi les oiseaux naïfs sur le terrain. Il est responsable dans le monde entier de maladies respiratoires, de chutes de ponte avec une mauvaise qualité des coquilles d'œuf, d'une réduction de l'éclosabilité, de néphrite et parfois, lors de l'infection précoce des futures reproducteurs, d'atrophies génitales responsables du syndrome des « fausses pondeuses » chez l'espèce poule.

Le TCoV, initialement répertorié comme l'un des agents responsables d'une entérite aiguë appelée bluecomb dans les années 70, a maintenant aussi été associé à une maladie multifactorielle dénommée « complexe entéritique du dindonneau » (PEC), qui regroupe plusieurs troubles intestinaux survenant chez la dinde avant sept semaines d'âge, et est répandue dans la plupart des élevages. Les signes cliniques comprennent souvent de la diarrhée, un retard de croissance, une anorexie, une déshydratation, une perte de poids et un dysfonctionnement immunitaire (atrophies du thymus et de la bourse de Fabricius) qui favorise des infections secondaires. La large distribution de ces virus et leur caractère hautement contagieux ont des répercussions économiques considérables.

Le caractère plus ou moins contagieux d'une maladie peut être mesuré par le « taux de reproduction » (R_0) défini comme « le nombre attendu de cas secondaires produits par une seule infection (typique) dans une population totalement susceptible ». Les paramètres nécessaires pour calculer le R_0 sont i) la vitesse de la transmission et ii) la durée d'excrétion des virus infectieux. En règle générale, un virus avec un R_0 inférieur à 1 disparaîtra rapidement car un individu infecté aura une faible capacité à en infecter un autre. En revanche, un virus dont le R_0 est supérieur à 1 se propagera dans la population sensible. Pour l'IBV, un R_0 de 20 a été estimé (de Wit et al., 1998), ce qui est comparable aux R_0 de virus humains hautement contagieux tels que le virus de la rougeole (12-18) (Knipe and Howley, 2013). Pour le TCoV, le R_0 n'a pas encore été évalué à ce jour, en revanche, une étude aux Etats-Unis a pu démontrer qu'une souche virale nord-américaine était détectable jusque 5 semaines post-infection (Breslin et al., 2000). Une longue durée d'excrétion a également été observée

avec le coronavirus entérique félin (FECV), dont le virus peut être excrété jusqu'à un an après infection, ou indéfiniment chez certains sujets (Kipar and Meli, 2014).

Cette étude porte sur la souche TCoV-080385d qui a été détectée en France en 2008, chez des dindes présentant des signes cliniques compatibles avec le PEC. Ce TCoV français (Fr-TCoV) est le seul TCoV européen isolé à ce jour, bien que d'autres souches aient été détectées en Pologne, en Grande-Bretagne et en Italie (Cavanagh et al., 2001; Domańska-Blicharz et al., 2010; Martin et al., 2002). Récemment, la séquence de son génome entier a révélé que les coronavirus de la dinde en Europe et aux Etats-Unis ont suivi des voies d'évolution différentes, chacune comportant des événements de recombinaison avec des souches d'IBV spécifiques à leur continent respectif (Brown et al., 2016).

L'étude présentée ici vise à déterminer les propriétés de transmission du TCoV-080385d en évaluant en premier lieu sa dose minimale infectieuse puis sa vitesse de reproduction (R_0) en conditions expérimentales chez le dindonneau EOPS, pour mieux connaître les possibilités de diffusion de la maladie, et la durée pendant laquelle un lot infecté reste contaminant.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Détermination de la dose minimale infectieuse

Cette expérimentation a été effectuée dans cinq isolateurs notés 1 à 5. Dans chaque isolateur, six dindonneaux EOPS, âgés de 10 jours et de poids homogène, ont été mis en place avec une mangeoire, un abreuvoir et une grille au sol recouverte de carton. A J0, les 6 dindonneaux en isolateur 1, 2, 3 ou 4 ont chacun été inoculés par voie orale, avec 0,25ml d'une dilution à $10^{-1.5}$, 10^{-3} , $10^{-4.5}$ ou 10^{-6} d'une suspension virale de la souche TCoV 080385d titrant à $10^{4.01}$ DIE₅₀/ml. Les 6 dindonneaux en isolateur 5 ont été inoculés par voie orale avec un placebo (même milieu que les dilutions).

A J1 post inoculation (PI), 2 nouveaux dindonneaux EOPS ont été introduits dans chacun des isolateurs 1 à 4, en tant que contacts. Ces animaux ont servi d'indicateurs de transmission horizontale. De J0 à J14 PI, des écouvillonnages cloacaux ont été réalisés quotidiennement sur tous les animaux dans chaque isolateur. Ces prélèvements ont été utilisés pour quantifier la charge virale à l'aide d'une qRT-PCR en temps réel dépistant tous les coronavirus aviaires (AvCoV-qRT-PCR) (Maurel et al., 2011). La limite de détection pour cette qRT-PCR et la zone de linéarité ont respectivement été décrites à 1^E+02 copies/μl et entre 1^E+03 à 1^E+09 copies/μl.

Par conséquent, les échantillons ont été considérés comme positifs avec un nombre de copies par réaction supérieur à 1^E+02 .

1.2. Vitesse de reproduction (R0)

Cette expérimentation a été effectuée dans deux animaleries, notées 1 et 2. L'animalerie 1 contenait un parc de 4,3 m² avec un sol litière de copeaux capable d'accueillir 30 dindonneaux de 10 jours jusqu'à 45 jours d'âge, avec une alimentation et un abreuvement à volonté. Cette densité de 7 sujets par m² respecte celle rencontrée en élevage. L'animalerie 2 a été préparée afin d'accueillir 3 dindonneaux pendant 72 heures.

A un jour d'âge, 29 dindonneaux ont été mis en place au sol dans l'animalerie 1, et 3 dans l'animalerie 2. A 10 jours d'âge, soit J0, des écouvillonnages cloacaux ont été réalisés sur tous les sujets dans les animaleries 1 et 2 pour confirmer leur statut négatif vis-à-vis du génome du TCoV en utilisant l'AvCoV-qRT-PCR. Le même jour, les 3 dindonneaux de l'animalerie 2 ont chacun été inoculés par voie orale avec 0,25 ml de la souche TCoV-080385d ($10^{4.01}$ DIE₅₀/ml) diluée à $10^{-4.5}$. A J1 PI, des écouvillonnages cloacaux ont été réalisés sur les 3 dindonneaux inoculés pour confirmer leur statut positif vis-à-vis du TCoV en utilisant l'AvCoV-qRT-PCR. A J2 PI, l'un des 3 sujets inoculés a été transféré vers l'animalerie 1 pour une mise en contact avec les 29 dindonneaux EOPS. Suite au transfert, des écouvillonnages cloacaux sur tous les sujets ont été réalisés toutes les 2 heures post-contact (PC) jusque 14h PC, puis à 26h, J2, J3 et J6 PC, et enfin de manière hebdomadaire jusqu'à J41 PC. Tous les prélèvements ont été utilisés pour quantifier la charge virale par l'AvCoV-qRT-PCR. Les échantillons ont été considérés comme positifs avec un nombre de copies par réaction supérieur à 10^2 .

2. RESULTATS ET DISCUSSION

L'expérimentation *in vivo* effectuée pour déterminer la dose minimale infectieuse du Fr-TCoV sur dindonneaux EOPS a montré une infection chez l'ensemble des sujets inoculés par TCoV-080385d aux dilutions $10^{-1.5}$ et 10^{-3} , et 50 % à la dilution $10^{-4.5}$ à J1 PI. A J2 PI, une transmission horizontale a été observée chez les sujets en contact avec les sujets inoculés aux dilutions $10^{-1.5}$, 10^{-3} et $10^{-4.5}$. A la dilution 10^{-6} et avec le placebo (dindonneaux témoins), l'ensemble des sujets (inoculés et contacts) sont restés négatifs pendant toute la durée de l'expérimentation (Tableau 1). Le titre viral calculé sur la base de ces résultats à l'aide de la méthode de Reed et Muench (Reed and Muench, 1938) est de $10^{5.12}$ DID₅₀/ml, ce qui tend à prouver que les dindonneaux sont 10 fois plus sensibles que les œufs de dinde embryonnés. Ces résultats montrent également que la dose minimale infectieuse est très faible, à un tel point qu'elle ne peut pas être détectée avec l'AvCoV-qRT-PCR. Une si faible dose minimale infectieuse a déjà été décrite pour le virus de la diarrhée épidémique porcine (PEDV) (Goyal,

2014). Dans cette étude, une diarrhée a toujours été observée chez des porcelets inoculés avec une souche de PEDV diluée à 10^{-8} , une dilution elle aussi au-delà de la limite de détection par qRT-PCR.

L'étude effectuée pour déterminer la vitesse de reproduction a montré que le sujet inoculé et transféré vers l'animalerie 1 parmi les 29 dindonneaux contacts est passé du statut d'indétectable de l'ARN viral extrait à $1,9^E+05$ copies/μl en 24 heures. Ce sujet est resté positif jusqu'à J29 PI. Une transmission horizontale extrêmement rapide a été observée sur les sujets contacts : 2 dès 10 heures post-contact, puis 6 à 14 heures, 24 à 26 heures et enfin l'ensemble des sujets à 48 heures (Fig 1). 21 sujets sont restés toujours positifs à 6 semaines PC. A 48h le moyen valeur été à $1,4^E+06$ copies/μl (min-max 3.6^E+04 - 1.0^E+07 copies /μl) et à 6 semaine PC le moyen valeur été à $1,2^E+03$ copies/μl (min-max 1.0^E+02 - 1.3^E+04 copies/μl). La détection par RT-PCR de l'ARN spécifique du virus inoculé chez un sujet est clairement un bon révélateur d'infection et nous indique également que la réplication virale est active lorsqu'une augmentation de plusieurs log₁₀ en nombre de copies d'ARN est observée. Cependant, ces tests ne nous indiquent pas si la matrice amplifiée dans la RT-PCR provient d'une particule virale infectieuse ou d'un fragment d'ARN viral non infectieux libéré soit dans la cellule infectée, soit dans des débris cellulaires. Ainsi, le statut contagieux ou non d'un individu dont le nombre de copies d'ARN reste positif, mais à un niveau stable sur plusieurs semaines, ne peut être précisé sans utiliser des méthodes virologiques complémentaires. En effet, une étude de transmission du virus de la diarrhée épidémique porcine révèle qu'une détection de l'ARN viral jusqu'à J42 PI est toujours possible alors que le virus infectieux n'a été quant à lui excrété que jusqu'à J14 ou J16 PI (Crawford et al., 2015). En ce qui concerne l'étude présentée ici, les échantillons positifs par qRT-PCR à 6 semaines PC doivent donc maintenant être inoculés aux dindonneaux EOPS afin d'évaluer leur statut «infectieux/non infectieux» pour que le R0 puisse être calculé. Cela dit, étant donné que la dose infectieuse pour ce virus était indétectable par qRT-PCR, on pourrait s'attendre à ce que la majorité des oiseaux restent infectieux à 6 semaines PI, comme cela a été décrit précédemment pour les TCoV américains (Breslin et al., 2000). Si tel est le cas, le R0 devrait alors être supérieur à 20.

CONCLUSION

Ces deux études basées sur la cinétique de transmission d'un TCoV européen isolé en France en 2008 ont montré qu'une dose extrêmement faible de virus est nécessaire pour infecter des dindonneaux EOPS de 10 jours en conditions expérimentales, et que le virus est transmis extrêmement rapidement aux sujets sensibles qui sont en contact avec un sujet infectieux. On s'attend à ce que la durée d'excrétion des particules virales infectieuses s'étende au moins

jusqu'à 6 semaines PI, mais ce paramètre doit être évalué en effectuant une nouvelle expérimentation animale en infectant des sujets à partir des écouvillonnages cloacaux correspondants. Si les résultats obtenus sont corrélés au fait que les prélèvements à 6 semaines PC sont effectivement infectieux, alors le R0 risque d'atteindre au moins

celui des IBV (20). Même sans un R0 défini, l'ensemble de ces données font de cette souche un virus hautement contagieux et souligne l'importance des bonnes pratiques sanitaires à l'entrée des bâtiments d'élevage et la nécessité de considérer que les individus infectés peuvent encore être infectieux longtemps après l'épisode clinique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Breslin, J.J., Smith, L.G., Barnes, H.J. and Guy, J.S., 2000. Avian Dis 44, 624-31.
- Brown, P.A., Touzain, F., Briand, F.X., Gouilh, A.M., Courtillon, C., Allee, C., Lemaitre, E., De Boisseson, C., Blanchard, Y. and Eterradossi, N., 2016. J Gen Virol 97, 110-20.
- Cavanagh, D., Mawditt, K., Sharma, M., Drury, S.E., Ainsworth, H.L., Britton, P. and Gough, R.E., 2001. Avian Pathol 30, 355-68.
- Crawford, K., Lager, K., Miller, L., Opriessnig, T., Gerber, P. and Hesse, R., 2015. Veterinary research 46, 49.
- de Wit, J.J., de Jong, M.C., Pijpers, A. and Verheijden, J.H., 1998. Avian Pathol 27, 464-71.
- Domańska-Blicharz, K., Seroka, A., Lisowska, A., Tomczyk, G. and Minta, Z., 2010. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 54, 473-477.
- Goyal, S., 2014. Environmental stability of PED (porcine epidemic diarrhea virus) University of Minnesota.
- Kipar, A. and Meli, M.L., 2014. Veterinary pathology 51, 505-26.
- Knipe, D.M. and Howley, P.M., 2013. Fields Virology, 6 ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Martin, A.M., Vinco, L.J., Cordioli, P. and Lavazza, A., 2002. 4th International Symposium on Turkey Diseases, 114-119.
- Maurel, S., Toquin, D., Briand, F.X., Queguiner, M., Allee, C., Bertin, J., Ravillion, L., Retaux, C., Turblin, V., Morvan, H. and Eterradossi, N., 2011. Avian Pathology 40, 179-89.
- Reed, L.J. and Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. American journal of hygiene 27, 493-497.

Tableau 1. Détection de l’ARN viral du TCoV-080385d chez les sujets inoculés (I) et en contact direct (C)

Nombre de dindonneaux positifs en q RT-PCR (Sur 6 I et sur 2 C)									
Dilution	10 ^{-1.5}		10 ⁻³		10 ^{-4.5}		10 ⁻⁶		Témoin nég
I: Inoculé C: Contact	I	C	I	C	I	C	I	C	I
JPI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	6	0	6	0	3	0	0	0
	2	6	2	6	2	6	0	0	0
	3	6	2	6	2	6	0	0	0

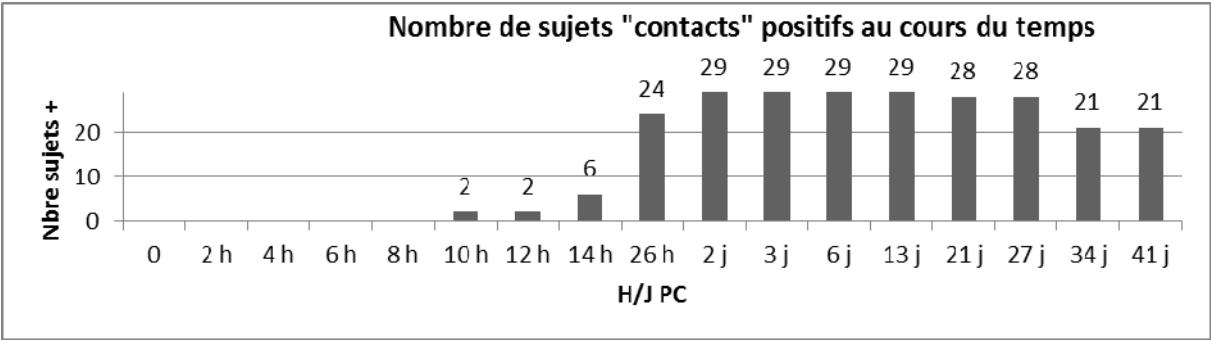


Figure 1. Détection de l’ARN viral du TCoV-080385d en qRT-PCR chez les sujets contact. Nombre des contacts positif sur 29 au cours du temps

EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA BURSITE INFECTIEUSE AVIAIRE EN ALGERIE

M. Abed¹, S. Soubies², C. Courtyllon², F-X. Briand², C. Allée², A. Bellahouel⁴, M. Amelot³
D. Khelef¹, S. Temim¹ et N. Eterradosi²

¹ENSV d'Alger -Rue Issad Abbes, Oued Smar-16000 Alger, Algérie

²ANSES – Unité VIPAC - Rue des Fusillés, 22440 Ploufragan, France

³ANSES - SELEAC - Rue des Fusillés, 22440 Ploufragan, France

⁴Cabinet Vétérinaire, Beni Slimane, 26000 Médéa, Algérie

nicolas.etterradossi@anses.fr

RÉSUMÉ

La bursite infectieuse aviaire est une maladie virale immunodépressive, présente mondialement, qui provoque mortalité, retard de croissance, et favorise les affections secondaires chez le jeune poulet. L'agent responsable, noté IBDV, est un virus non enveloppé au génome constitué de deux segments d'ARN double brin. Le segment A code notamment pour la protéine de capsid, cible des anticorps neutralisants, tandis que le segment B code pour la polymérase virale, les deux protéines contribuant au pouvoir pathogène. Différents pathotypes d'IBDV ont été décrits, allant des souches vaccinales atténuées aux virus hypervirulents (notés vvIBDV). Afin d'étudier l'épidémiologie moléculaire de la bursite infectieuse aviaire en Algérie, les bourses de Fabricius provenant de 35 élevages de poulet de chair suspects de bursite infectieuse ont été analysées. Une caractérisation génétique, antigénique et une étude du pouvoir pathogène de certaines souches ont été effectuées. La présence d'IBDV a été confirmée par RT-PCR dans 69% (24/35) des 35 épisodes cliniques étudiés et le séquençage partiel des segments A et B a permis une analyse phylogénétique des souches détectées, révélant 45% de souches apparentées aux vvIBDV et 16% (proches de souches vaccinales). Par ailleurs, 39% des souches présentaient un profil évocateur de réassortiment, avec un segment A apparenté aux vvIBDV associé à un segment B d'origine indéterminée. La pathogénicité de ces dernières souches sur poulets EOPS s'est avérée expérimentalement comparable à celle des virus hypervirulents de référence. Ces données révèlent la diversité des souches d'IBDV circulant en Algérie et contribueront à une prise en charge plus adaptée de la maladie.

ABSTRACT

Molecular epidemiology of infectious bursal disease in Algeria

Infectious bursal disease (IBD) is an immunosuppressive viral disease, present worldwide, which causes mortality, growth retardation, and leads to secondary affections in young chickens. The causative agent, denoted IBDV, is a non-enveloped virus whose genome consists of two segments (A and B) of double-stranded RNA. Segment A encodes, in particular, the capsid protein, the target of neutralizing antibodies, while segment B encodes the viral polymerase, both proteins contributing to pathogenicity. Different pathotypes of IBDV have been described, ranging from attenuated vaccine strains to hypervirulent viruses (noted vvIBDV). This study aims at characterizing some IBDV strains that circulated in Algeria between 2014 and 2015. The presence of IBDV was confirmed by RT-PCR in 69% of the 35 clinical episodes studied. Partial sequencing of segments A and B allowed a phylogenetic analysis of the detected strains. Forty-five percent of the analyzed strains were related to vvIBDV, 16% were related to vaccine strains and 39% had a reassortant profile, with a segment A related to vvIBDV associated with a segment B of undetermined origin. The pathogenicity of the latter strains for SPF chickens was found experimentally to be comparable to that of the very virulent reference viruses. These data reveal the diversity of strains of IBDV circulating in Algeria and will contribute to a more adapted management of the disease.

INTRODUCTION

La bursite infectieuse aviaire (ou l'IBD pour *Infectious Bursal Disease*), également nommée maladie de Gumboro, est une maladie virale immunodépressive. Elle représente une dominante pathologique dans tous les pays à aviculture industrialisée et cause des pertes directes (forme aiguë de la maladie) ou indirectes (forme immunodépressive favorisant les surinfections). Le virus causal est nommé IBDV (*Infectious Bursal Disease Virus*). Deux sérotypes sont connus pour l'IBDV : les virus du sérotype 1 sont responsables de la maladie chez la volaille tandis que les virus de sérotype 2 ne sont pas pathogènes. Le matériel génétique de l'IBDV se compose de deux segments d'ARN double brin nommés segments A et B. Le segment A code entre autres pour la protéine de capsid VP2, présente à la surface du virus et cible des anticorps neutralisants induits par la vaccination. Le segment B code pour la protéine VP1, la polymérase virale, qui module la vitesse de réplication virale. Il existe différents pathotypes viraux, allant des souches vaccinales atténuées aux virus hypervirulents (notés vvIBDV). Les deux segments contribuent à la pathogénicité virale. Ce matériel génétique permet au virus d'évoluer entre autres par mutations ponctuelles et par réassortiment. Les mutations ponctuelles peuvent modifier la séquence de VP2 et permettre au virus d'échapper aux anticorps vaccinaux, comme dans le cas des virus variants antigéniques détectés aux USA à partir de 1984. Le réassortiment survient lorsque les cellules sont co-infectées par deux souches virales différentes. Le segment A d'un des virus parentaux peut se retrouver associé au segment B de l'autre virus parental, produisant des virus aux propriétés nouvelles. Différents réassortiments ont été décrits pour des virus isolés en Asie, en Afrique, aux Etats-Unis et en Europe (Eterradossi et Saif, 2013, Soubies et al, 2016).

En Algérie, malgré les mesures de prophylaxie déployées, des cas de bursite infectieuse aviaire sont souvent diagnostiqués, sur la base d'éléments cliniques et lésionnels (Alloui, 2015). L'épidémiologie moléculaire des souches d'IBDV algériennes reste méconnue. La présente étude vise à obtenir une vision actualisée de la diversité génétique, antigénique et de la pathogénicité d'un échantillon de souches circulantes en Algérie et contribuera à la mise en place d'une prophylaxie plus adaptée à la situation du terrain algérien.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1 Echantillons

Un total de 190 Bourses de Fabricius a été prélevé entre septembre 2014 et septembre 2015, lors de 35 épisodes cliniques attribués à l'IBD (nombre de bourses varie entre 2 et 8 par élevage) dans des

élevages de poulet de chair situés dans les régions du centre de l'Algérie (Tableau 1). Toutes les bourses présentaient des lésions de congestion, œdème, hémorragie ou atrophie. Les bourses ont été stockées à -20°C jusqu'à leur analyse.

1.2 Virus de référence

Les souches d'IBDV F52/70 (Bygrave et Faragher, 1970) et 89163 (Eterradossi et al, 1992) ont été respectivement utilisées comme référence pour les souches classiques (cvIBDV), ou hypervirulentes (vvIBDV) dans l'étude du pouvoir pathogène.

1.3 Préparation et traitement de l'homogénat de bourses de Fabricius

Les bourses ont été broyées avec du PBS (pds/vol) puis traitées (vol/vol) avec du 1,1,2-Trichloro-1,2,2 Trifluoroéthane pour éliminer les débris cellulaires. Les suspensions virales ainsi obtenues ont été traitées au chloroforme (vol/vol) pendant une nuit à 4°C afin d'inactiver d'éventuels contaminants viraux enveloppés.

1.4 Extraction de l'ARN

L'ARN viral a été extrait à l'aide du Kit QIAamp RNA Mini kit (Qiagen) puis a été conservé à -70°C.

1.5 RT-PCR, Séquençage et analyses phylogénétiques

Le séquençage partiel des deux segments A et B a été effectué à partir des produits de la RT-PCR selon les méthodes du manuel de l'OIE (Anonyme, 2016). Les séquences apparentées aux séquences obtenues ont été recherchées avec BLAST dans la base de données GenBank. Les séquences nucléotidiques disponibles les plus proches ont été récupérées pour l'analyse phylogénétique. Les alignements nucléotidiques et aminopeptidiques ont été réalisés à l'aide de Clustal W (logiciel Mega version 7). Les arbres phylogénétiques ont été construits par Neighbor-joining et la robustesse de leur topologie a été vérifiée par la méthode de Bootstrap avec 1000 répliques. Les valeurs de Bootstrap inférieures à 75 ont été jugées non significatives.

1.6 Recherche de contaminants viraux et titrage sur œufs embryonnés

Les souches virales sélectionnées pour l'étude expérimentale ont fait l'objet d'une recherche de contaminants viraux : après neutralisation de la suspension virale avec un sérum anti-IBDV, trois passages sériés ont été effectués sur œufs embryonnés de poules EOPS (voies intra-vitelline, allantoïdienne et sur la membrane chorio-allantoïdienne) ainsi que sur cultures primaires d'hépatocytes d'embryons de

poulets. Les stocks viraux reconnus comme non contaminés ont été titrés sur œufs EOPS embryonnés de 9 à 11 jours. Le titre viral a été calculé en utilisant la méthode de Reed et Munch.

1.7 Expérimentations animales

Les expérimentations animales ont été approuvées par le comité d'éthique Anses/ENVA/UPEC et le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche.

1.7.1 Production *in vivo* de stocks viraux

Des poulets White Leghorn EOPS âgés de 6 semaines, et élevés en atmosphère protégée ont été inoculés par voie intranasale à raison de 0.1ml par oiseau de suspension virale. Après 4 jours, les poulets ont été euthanasiés, leurs bourses de Fabricius prélevées et traitées comme décrit dans le chapitre 1.3.

1.7.2 Etude du pouvoir pathogène

Deux expérimentations ont été menées pour l'étude du pouvoir pathogène. Des poulets EOPS (même caractéristiques et hébergement qu'en 1.7.1) ont été bagués, pesés et répartis en groupes de 15 à 20 poulets après harmonisation des sexes et des poids. Des prises de sang individuelles ont été réalisées afin de confirmer avant inoculation le statut séronégatif vis à vis de l'IBDV. Tous les groupes ont été inoculés par voie intra-nasale (10^5 EID₅₀ par oiseau). Dans les deux expérimentations, un groupe témoin non infecté (NI) a été inoculé avec une solution saline. La morbidité (index symptomatique tel que décrit par **Soubies et al, 2016**) ainsi que le taux de mortalité ont été notés quotidiennement de J1 à J21.

A J4 post-infection pour 5 sujets et à J21 post-infection pour les survivants, les poulets ont été pesés, euthanasiés et autopsiés. Leurs bourses de Fabricius ont été prélevées et pesées afin de calculer le ratio poids de la bourse/poids du poulet (pB/pP).

1.8 Analyse statistique

Les taux de mortalité ont été comparés avec le test du χ^2 . Les ratios pB /pP ont été comparés avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Diagnostic moléculaire

Des résultats de RT-PCR positifs ont été obtenus chez 24 (69%) des 35 échantillons. Dans 22 de ces prélèvements, les quantités de produit d'amplification obtenues ont été suffisantes pour permettre le séquençage partiel des segments A et B ou le séquençage d'au moins un segment (3 souches avec séquences partielles du segment A et une souche avec

uniquement le séquençage du segment B). L'absence de virus dans les échantillons négatifs peut être expliquée par l'absence du virus dans la bourse de Fabricius (prélèvement trop tardif ou atrophie de la bourse due à une autre étiologie).

2.2 Comparaison des séquences et analyses phylogénétiques

L'analyse phylogénétique du segment A révèle la répartition des 18 souches étudiées en deux groupes: le premier regroupe la majorité des souches séquencées dans un clade contenant aussi les souches vvIBDV asiatiques et européennes (groupe I, valeur de bootstrap de 86%). Le deuxième est apparenté à la souche vaccinale IBDL (valeur de bootstrap à 100%, groupe II dans la figure 1).

L'analyse des séquences aminopeptidiques de la région hypervariable de VP2 (segment A) a révélé i) une identité stricte entre les souches du groupe I et la souche vaccinale IBDL, ii) une identité stricte entre les souches du groupe II et la souche 89163 sauf chez les deux souches 150128 et 150133 où une mutation S→G, déjà observée chez des vvIBDV européens (**Martin et al, 2007**) est observée à la position 254.

L'analyse phylogénétique du segment B révèle également une répartition en deux groupes. Le premier comprend les virus vvIBDV (groupe I) avec six souches algériennes et les vvIBDV européens et asiatiques (bootstrap 96%), ainsi que deux souches (150133 et 150128, groupe I.a, bootstrap 99%), plutôt apparentées à la souche ivoirienne 88180 (bootstrap 78%).

Le second groupe comprend un ensemble de souches atténuées (groupes III), classiques (groupe IV), variantes antigéniques ainsi que les souches du sérotype 2. On retrouve dans ce second groupe trois souches algériennes, qui semblent apparentées à la souche vaccinale IBDL (quoiqu'avec un bootstrap <75%), ainsi que sept souches partageant une origine géographique commune et qui forment un groupe VI (valeur de bootstrap : 100%) ne pouvant être relié à aucune séquence de référence. L'alignement des séquences aminopeptidiques partielles du segment B de ces sept souches révèle l'absence d'un triplet d'acides aminés présenté comme caractéristique des vvIBDV européens (positions 145T, 146D et 147N) et la présence à ces positions d'acides aminés (145N, 146E, 147G) retrouvés chez les souches d'IBDV de sérotype 2 ou adaptées à la culture cellulaire.

Globalement, une co-évolution des segments A et B a été observée, sauf pour les virus du groupe VI, qui représentent des virus réassortants possédant une VP2 apparentée aux vvIBDV et une VP1 d'origine inconnue. Un séquençage complet pourrait contribuer à clarifier les parentés génétiques de ce segment B original.

2.3 Pouvoir pathogène

L'étude du pouvoir pathogène a concerné quatre souches dotées d'un génotype soit typique des vvIBDV (150136), soit apparenté à la souche vaccinale (150127), soit réassortants (150144 et 150124). Voir Tableau 2

Dans l'expérimentation animale 1, le pouvoir pathogène des souches 150136 (vvIBDV typique) et 150127 (apparentée aux souches vaccinales) a été comparé à celui des souches de référence 89163 (vvIBDV) et F52/70 (cvIBDV). A J4 post-infection, les souches 89163 et F52/70 ont induit respectivement 15% et 10% de mortalité. Les souches algériennes 150127 et 150136 n'ont induit aucune mortalité ($p > 0.05$). Les signes cliniques ont été plus sévères (score symptomatique ≥ 2) dans les groupes 89163 (taux de morbidité à 55%), F52/70 (40%), et 150136 (40%) que dans le groupe 150127 (5%) ou NI (0%) ($p \leq 0.05$). Les ratios pB/pP dans les groupes F52/70, 89163 et 150136 étaient significativement plus faibles à J21 p.i que dans le groupe NI (ratios variant entre 0,7 et 0,8‰ versus 3.04‰ pour NI), la souche 150127 induisant quant à elle des ratios intermédiaires entre les groupes précédents (ratio 1.06‰, $p > 0.05$).

Au final, l'expérimentation animale 1 révèle l'absence de mortalité induite par la souche 150136 en dépit d'un profil génétique apparenté aux souches vvIBDV. Ce résultat est à rapprocher de celui de la souche de référence 89163 qui n'a induit que peu de mortalité ($p > 0.05$ avec le groupe NI). L'étude du pouvoir pathogène de ces souches doit être reconduite et si l'absence de mortalité induite par la souche 150136 est confirmée, un séquençage complet sera nécessaire pour déceler les mutations susceptibles d'être responsables de cette caractéristique. En revanche, la souche 150127 présente un pouvoir pathogène cohérent avec son génotype apparenté aux souches vaccinales intermédiaires plus (faible morbidité, absence de mortalité et atrophie de la bourse de Fabricius).

Dans l'expérimentation 2, le pouvoir pathogène des deux souches réassortantes 150144 et 150124 a été comparé au pouvoir pathogène de la souche vvIBDV de référence. A J4 post-infection, la mortalité et la morbidité enregistrées dans les différents groupes inoculés étaient élevées ($p \leq 0.05$ par rapport au groupe NI) mais non significativement différentes entre elles (mortalité de 33 à 55 % et morbidité de 53 à 60%, comme habituellement obtenu avec la souche 89163, Tableau 2). Les souches réassortantes 150124 et 150144 semblent donc comparables à la souche vvIBDV de référence. Dans la littérature scientifique, des souches réassortantes intersérotypiques ou intrasérotypiques possédant un segment A apparenté aux vvIBDV ont été identifiées (Sun et al, 2003 ; Le Nouen et al, 2006 ; Kasanga et al, 2012 ; Jackwood et al, 2011 ; Li et al, 2015, Soubies et al, 2016). La

plupart d'entre elles présentent un pouvoir pathogène diminué à l'exception des réassortants chinois (Li et al, 2015) dont le segment B appartient à une lignée génétique différente (groupe VII, figure 1).

CONCLUSION

Dix-huit souches d'IBDV responsables de cas aigus ayant circulé en Algérie entre 2014 et 2015 ont été caractérisées sur le plan moléculaire. Les résultats obtenus montrent la présence de souches hypervirulentes et apparentées aux vaccins utilisés sur le terrain, mais aussi la circulation de souches réassortantes virulentes. Les séquences aminopeptidiques de la région hypervariable de ces souches ne suggèrent aucun échappement antigénique à la couverture vaccinale. La vaccination reste un moyen incontournable dans la lutte contre l'IBD. Cependant, les échecs de vaccination observés sur le terrain peuvent être liés à i) des mesures de biosécurité insuffisantes, ii) une conduite vaccinale inappropriée et à iii) la vitesse de réplication des souches hypervirulentes qui pourrait contribuer à leur capacité à échapper à l'immunité passive (capacité répliquative à évaluer expérimentalement).

Les résultats de l'étude du pouvoir pathogène montrent l'intérêt de la caractérisation des deux segments A et B. Un séquençage complet des deux segments est en cours pour les souches réassortantes afin de tenter d'identifier l'origine de leur segment B.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alloui N., Sellaoui S., Onzièmes journées de la recherche avicole et palmipèdes à Foie Gras., Tours., les 25 et 26 mars 2015.
- Anonyme., (2016). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: OIE – World Organisation for Animal Health
- Bygrave, A.C., Faragher, J.T., 1970. Vet.Rec. 86, 758–759.
- Etteradossi, N., Picault, J.P., Drouin, P., Guittet, M., L'Hospitalier, R., Bennejean, G., 1992. J. Vet. Med. B39, 683–691.
- Jackwood, D.J., Sommer-Wagner, S.E., Crossley, B.M., Stoute, S.T., Woolcock, P.R., Charlton, B.R., 2011. Virology 420, 98–105.
- Kasanga, C.J., Yamaguchi, T., Munang'andu, H.M., Ohya, K. & Le Nouen, C., Rivallan, G., Toquin, D., Darlu, P., Morin, Y., Beven, V., de Boisseson, C., Cazaban, C., Comte, S., Gardin, Y. & Etteradossi, N. (2006). Journal of General Virology, 87, 209–216.
- Martin, A.M., Fallacara, F., Barbieri, I., Tosi, G., Rivallan, G., Etteradossi, N. & Cordioli, P. (2007). Avian Diseases, 51, 863–872.
- Soubies S., Courtillon C., Briand F-X., Queguiner-Leroux M., Courtois D., Amelot M., Grousson K., Morillon P., Herin J-B., and Etteradossi N., Avian Pathol. 2016 Oct 17:1-9
- Sun JH1., Lu P., Yan YX., Hua XG., Jiang J., Zhao Y., J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2003 Apr;50(3):148-54.
- Wei, Y., Li, J., Zheng, J., Xu, H., Li, L. & Yu, L. (2006). Biochemical and Biophysical Research Communications, 350, 277–287
- Wei, Y., Yu, X., Zheng, J., Chu, W., Xu, H., Yu, X. & Yu, L. (2008). Virus Research, 131, 279–282.

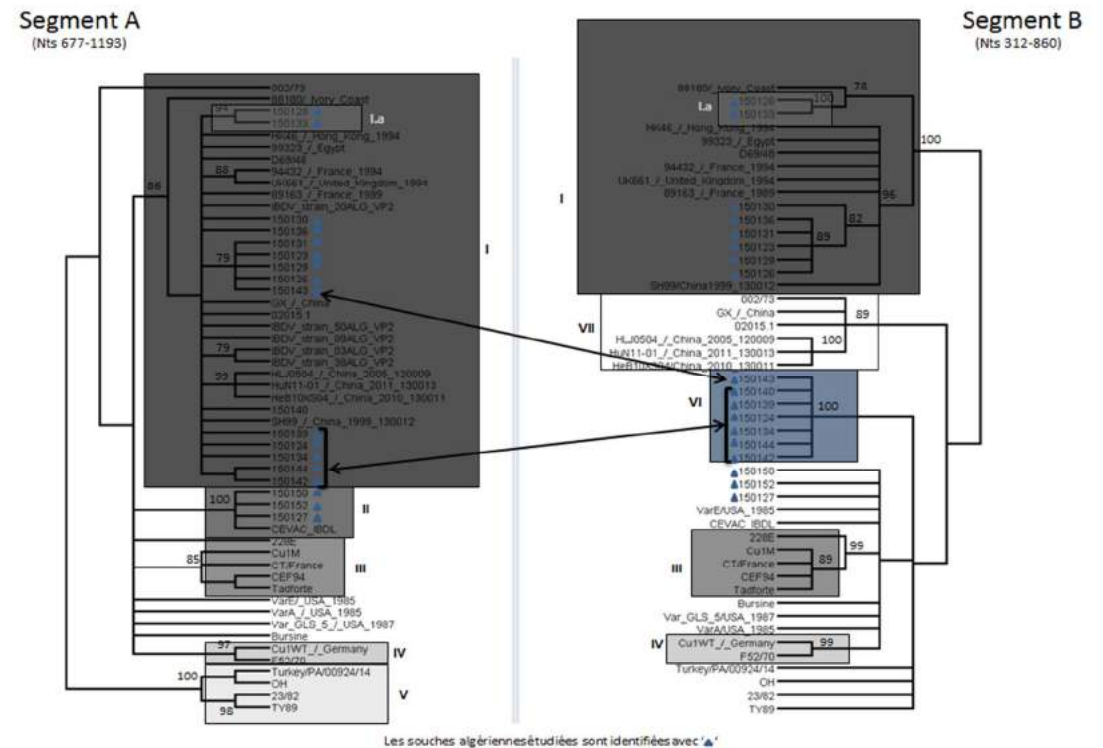
Tableau 1. Commémoratifs des épisodes cliniques correspondant aux 18 virus présentés

Référence de la souche	Régions	Effectif (nombre)	Vaccination	Age des poulets (jours)	Mortalité (nombre)
150124	Tablate	3600	IBDL / 14 jrs	30	100
150142	Berrouaghia	4000	IBDL / 14 jrs	31	10
150123	Alger	4700	Pas de données	33	40
150143	Alger	2000	IBDL / 14 jrs	27	40
150131	Médéa	1400	E228	31	30
150139	TABLATE	3500	INTER GUM L	30	55
150140	Alger	5000	IBDL / 14 jrs	32	40
150134	Alger	2800	IBDL / 14 jrs	52	40
150129	Médéa	1500	IBDL / 14 jrs	37	40
150130	Tablate	1400	E228	28	30
150144	BENI SLIMANE	2500	IBDL / 14 jrs	30	25
150126	Beni Slimane	2500	Non vacciné	38	200
150136	Médéa	1600	IBDL / 14 jrs	29	12
150133	Chelef	2000	Pas de données	27	20
150127	Tizi-Ouzou	5500	Pas de données	36	40
150128	Tizi-Ouzou	3500	Pas de données	31	25
150152	Tizi-Ouzou	3000	Pas de données	30	21
150150	Ain Defla	3000	Non vacciné	28	15

Tableau 2. Pouvoir pathogène des souches étudiées

Paramètre	Expérimentation 1					Expérimentation 2			
	N1	F52/70	89163	150127	150136	N1	89163	150124	150144
Mortalité cumulée à J4 P.I (%)	0 ^a	10 ^a	15 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	33.3 ^b	31.5 ^b	55.5 ^b
Ratio pB/pP									
A J4 P.I	4.3±0.7	4.8±1.02	3.4±0.8	4.2±1.9	5.2±0.8	2.7±0.3	3.7±1.1	4.2±1.2	3.5±0.8
A J21 P.I	3.04±0.5 ^{ac}	0.8±0.1 ^b	0.7±0.2 ^b	1.06±0.2 ^c	0.8±0.2 ^b	3.04±0.5 ^a	0.4±0.1 ^b	0.5±0.1 ^b	0.6±0.1 ^b
Morbidité à J4 P.I (%)	0 ^a	40 ^b	55 ^b	5 ^b	40 ^b	0 ^a	60 ^b	52.6 ^b	61.1 ^b

- a,b,c des lettres différentes sont associées aux valeurs statistiquement différentes ($P \leq 0.05$)

**Figure 1 :** Arbres phylogénétiques des segments A et B partiels des virus IBV : Les cadres soulignent les groupes génétiques ; les flèches relient les segments des souches réassortantes.

DONNEES EPIDEMIO-CLINIQUES ET VIROLOGIQUES SUR L'EMERGENCE DE L'INFLUENZA AVIAIRE H9N2 AU MAROC

El Houadfi Mohammed¹, Fellahi Siham¹, Nassik Saadia¹, Ducatez Mariette², Guérin
Jean-Luc²

¹Unité de Pathologie Aviaire, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc

² Université de Toulouse, ENVT, INRA UMR 1225 IHAP, F-31076, Toulouse, France

elhouadfimohammed@yahoo.fr

RÉSUMÉ

L'influenza aviaire de sous type H9N2 est une maladie contagieuse des volailles, à tropisme essentiellement respiratoire. Au cours de la dernière décennie, le virus a connu une très forte expansion pour devenir enzootique dans plusieurs régions d'Asie, du Moyen Orient et dans certains pays de l'Afrique du Nord. Même si les virus H9N2 sont considérés comme « faiblement pathogènes » au sens de la réglementation sanitaire internationale, leurs impacts pathologiques et économiques sont considérables.

Cette communication décrit l'introduction du virus H9N2 au mois de Janvier 2016 dans les élevages avicoles marocains et sa très rapide propagation à toutes les régions du royaume, fort probablement par le biais des transports. En quelques semaines après son introduction, le virus a affecté tous les types de productions avicoles : chez le poulet de chair, le taux de mortalité variait entre 20 et 70 % ; Dans les élevages de poules pondeuses et de reproducteurs, le taux de mortalité a atteint 15 et 20 %, les chutes de ponte atteignant 70 à 80 %. Des prélèvements ont été réalisés dans 11 élevages avicoles : 4 virus ont été isolés dans des élevages de poulets de chair et 1 sur des reproductrices chair. Le génome complet de ces 5 isolats a été séquencé : leur analyse phylogénétique a démontré que le virus H9N2 introduit au Maroc appartient au génotype G1 et qu'il présente un fort lien phylogénétique avec les virus circulant au Moyen Orient. Les modalités d'introduction du virus sur le territoire du Maroc restent méconnues. Cette expérience marocaine rappelle que le virus H9N2 devrait être considéré comme un danger sanitaire majeur, contre lequel les pays indemnes doivent prendre toutes les mesures préventives pour éviter son introduction.

ABSTRACT

Epidemio-clinical and virological data on emergence of H9N2 avian influenza virus in Morocco

Avian influenza H9N2 is a contagious respiratory disease of avian species. During the last decade, the virus became enzootic in many parts of Asia, Middle East and some countries of North Africa. Despite the fact that AIV H9N2 is known as LPAI, it has been shown that under some circumstances, particularly in some concomitant infections or under some environmental factors, the virus could be responsible for great economic losses.

The present report describes the first introduction of AIV H9N2 in January 2016 to Moroccan poultry farms, and its very quick spread to all parts of the country and affecting all types of poultry production through live poultry market, human movements and vehicles. In broilers, mortality rates observed were between 20 and 70%. In layers and breeders, mortality rates were around 15 to 20%, however, drop in egg production reached 70 to 80%. Samples were collected from 11 chicken flocks with high morbidity and mortality rates. Four viruses were successfully isolated from broiler chickens and one from broiler breeders and fully sequenced. Phylogenetic and molecular markers analyses showed the Moroccan viruses belonged to the G1 lineage and likely originated from the Middle East. How the virus was introduced to the country still unknown. As known for H9N2 viruses, the Moroccan isolates possess several genetic markers that enhance virulence in poultry and transmission to humans. The present study illustrated that under field conditions H9N2 could have a devastating effect on egg production and mortalities and all preventive measures should taken to prevent its entry.

INTRODUCTION

L'influenza aviaire de sous type H9N2, représente un intérêt économique et de santé publique (1). L'agent causal est actuellement enzootique dans plusieurs pays du continent asiatique, le Moyen Orient et les pays Nord Africains. Pendant plusieurs décennies, le virus affectait en Chine les oiseaux aquatiques sans symptômes apparents. Ce n'est qu'en 1992 que le virus fut rapporté pour la première fois chez le poulet dans ce pays (2) et par la suite dans d'autres pays ; Corée du Sud en 1996 (3), Iran en 1998 (4) et le Pakistan en 1999 (5). Au début des années 2000, le virus apparaît dans plusieurs pays du Moyen Orient ; Israël, Arabie Saoudite, les Emirats et Oman (6, 7, 8). En Afrique, avant Janvier 2016, le virus fut détecté dans trois pays de l'Afrique du Nord : Egypte, Libye, Tunisie (9, 10, 25). Le virus influenza aviaire H9N2 (VIA H9N2) est classé parmi les virus faiblement pathogènes (IAFP), cependant, lors des co-infections avec d'autres agents pathogènes de l'appareil respiratoire ou ceux affectant le système immunitaire, ou autres facteurs d'environnement, une maladie respiratoire très sévère peut se déclencher, engendrant des taux de mortalité chez le poulet de chair dépassant les 60 % et chez la poule pondeuse et les reproducteurs des chutes de ponte pouvant atteindre 70% (11, 12). Les VIA H9N2 affectent plusieurs espèces d'oiseaux domestiques et sauvages tels que le faucon, la perdrix, la caille, l'outarde, le moineau. Certaines espèces de mammifères, notamment le chien et le chat, peuvent être infectés (14). Le virus a été isolé chez les humains et fait l'objet d'une surveillance par l'OMS pour ses menaces pandémiques. Plusieurs études ont révélé que le virus H9N2 est un « donneur de gènes » pour d'autres virus influenza de type A (16). Cette présentation décrit quelques données épidémiologiques recueillies lors de la 1^{ère} introduction du virus H9N2 au Maroc, sa dissémination rapide à tous les types d'élevage avicole, ainsi que les résultats des études phylogénétiques réalisées sur les virus isolés (17).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Recueil des prélèvements et des commémoratifs

Durant les 2 dernières semaines de Janvier 2016, des lots de poulets de chair malades, issus de plusieurs régions du centre du Maroc, ont été reçus au laboratoire de Pathologie Aviaire à l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, pour diagnostic. Ces lots ont fait l'objet de prélèvements systématiques en vue d'analyses virologique, bactériologique et histologique. Selon les données épidémiocliniques et lésionnelles, l'influenza aviaire H9N2 a été fortement suspectée.

1.2. Isolement viral

Cinq prélèvements positifs par RT-PCR en temps réel ont fait l'objet d'essais d'isolement viral sur des œufs EOPS de 9 jours d'incubation.

1.3. Amplification et séquençage du génome complet des virus marocains H9N2

L'extraction des ARNs viraux des échantillons étudiés a été réalisée à l'aide du kit QIAamp DNA minikit (Qiagen). L'amplification par RT-PCR a été réalisée dans un thermocycleur (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) en utilisant des amorces spécifiques décrites précédemment (18) pour chaque segment du virus. La RT-PCR est effectuée par le biais du protocole du kit Applied Biosystem, la réaction de la RT-PCR est réalisée selon la méthode décrite par EL Houadfi et al. 2016 (17). Les produits de PCR amplifiés sont purifiés avec le kit Nucleospin PCR (Macherey Nagel) selon les instructions du fabricant. Le séquençage par la méthode Sanger a été effectué sur tous les segments en utilisant les mêmes amorces que celles utilisées pour la RT-PCR. Le séquençage a été réalisé avec un séquenceur capillaire 3130XL Applied Biosystems au Plateau de Génomique GeT-Purpan, UDEAR UMR 5165 CNRS / UPS, CHU Purpan, Toulouse, France.

1.4. Analyse phylogénétique

Les séquences des huit segments des génomes complets de cinq isolats marocains H9N2 ont été assemblées manuellement à l'aide du logiciel BioEdit Version 5.0.9 (19). Cette analyse permet de matérialiser la comparaison des souches marocaines avec celles choisies dans la banque génomique sous forme d'un arbre dont la longueur des branches, séparant deux souches, est proportionnelle à leur différence génétique. L'arbre phylogénétique a été construit par la méthode du maximum de vraisemblance (maximum likelihood method) qui est la plus couramment utilisée en virologie en utilisant le logiciel Mega 6.06 (20).

2. RESULTATS

2.1. Données épidémiologiques, cliniques et lésionnelles

Les commémoratifs recueillis, révèlent une forte diminution de la prise alimentaire, des symptômes respiratoires sévères (éternuements, râles, dyspnée, halètement) et, en outre, tous les lots de poulets inclus présentaient une forte augmentation des taux de mortalité, variant de 2 à 10% par jour entre le 3^{ème} et 6^{ème} jour après l'apparition des signes cliniques. La majorité des cas avait un âge supérieur à 3 semaines, certains même étaient en phase de commercialisation. Tous les oiseaux avaient été vaccinés selon le programme habituel contre la maladie de Newcastle, la bronchite infectieuse et la maladie de Gumboro. Les autopsies effectuées sur ces cas ont révélé que toutes les carcasses étaient congestionnées, et

quelques cadavres présentaient des écoulements oculonasaux et des sinusites infraorbitaires ; les lésions dominantes étant représentées par des hémorragies trachéales, des dépôts de fibrines dans les bronches obstruant ainsi les voies respiratoires. Certains lots de poulets présentaient par ailleurs des pneumonies fibrineuses, des lésions d'aérosacculite et des congestions de la rate et du foie. Trois à 4 semaines plus tard, la maladie s'était propagée à d'autres régions avicoles du pays et aux élevages de poules pondeuses et de reproducteurs. Dans ces derniers types d'élevage, la mortalité est restée inférieure à celle observée chez le poulet de chair, les chutes de pontes atteignant cependant 80 % dans certains cas. Des observations similaires ont été signalées en Iran (4), par contre en Tunisie les pertes liées à H9N2 semblent beaucoup moins sévères que celles du Maroc.

Chez la dinde, les symptômes respiratoires ont été similaires à ceux observés chez le poulet de chair, mais les symptômes de sinusite pouvant prêter à confusion avec la mycoplasmoses ont été plus fréquemment notés. Le taux de mortalité était de l'ordre de 10% dans la plupart des cas.

2.2. Analyse phylogénétique

Les séquences nucléotidiques du génome complet de cinq isolats marocains A/chicken/Morocco/SF1/2016, A/chicken/Morocco/SF2/2016, A/chicken/Morocco/SF3/2016, A/chicken/Morocco/SF4/2016 et A/chicken/Morocco/SF5/201 ont été enregistrées dans la base de données «GenBank», sous les numéros d'accès suivants : LT598497, LT598498, LT598499, LT598500 et LT598501. L'analyse phylogénétique des séquences d'acides aminés codés par les gènes HA et NA des ces souches isolées au Maroc, a été effectuée. Les souches marocaines ont montré une grande homologie aux virus représentatifs du lignage G1. Une forte homologie entre 98% et 100% a été constatée entre les cinq virus marocains. Tous les gènes codant pour les différents segments PB1, PB2, PA, NP, M1, M2, NS1, NS2 et PB-F2 ont été classés sous la lignée G1, et présentent une forte homologie avec A/pheasant/United Arab Emirates/D1521/2011-like H9N2.

2.3. Caractérisation moléculaire

Les gènes d'Hémagglutinine (HA) et Neuraminidase (NA).

La glycoprotéine HA des isolats marocains possède, sur le site de clivage HA0, un motif RSSR*GLF, qui classe le virus marocain parmi les virus faiblement pathogènes. D'ailleurs tous les virus H9N2 sont considérés comme faiblement pathogènes. L'analyse révèle la présence de sept sites potentiels de glycosylation avec un site supplémentaire (résidu 82) par rapport aux virus H9N2 égyptiens récemment caractérisés (21) (Tableau 1).

Tous les virus marocains ont présenté des substitutions d'acides aminés dans les sites antigéniques responsables de liaisons aux récepteurs, qui leur confèrent l'attachement aux récepteurs humains (158 N, 183H, 226 L et 391 K(22, 21)).

Caractéristiques des gènes structuraux internes. Trois marqueurs d'adaptation des virus aux mammifères ont été identifiés sur la protéine PB2 : 318R, 590S and 661T (23). En outre, deux mutations liées à la virulence (147V, 504V) ont été constatées chez tous les isolats (Tableau 1).

Au niveau de la protéine PB1, un seul déterminant moléculaire de spécificité de l'hôte (13P) a été détecté, signifiant ainsi la possibilité de transmission du virus à partir des volailles aux humains (23).

Sur la protéine PA, trois mutations liées à la virulence des souches ont été observées (127V, 550L, 672L). Ce résultat corrobore les études publiées par d'autres auteurs (21). Les mutations 409N, 100I et 312R constatées chez les souches marocaines sont considérées comme une adaptation des virus influenza H9N2 d'origine aviaire après leur passage à l'espèce humaine (Shaw et al., 2002).

La substitution de l'acide aminé 372D au niveau de gène NP a été précédemment identifiée comme une importante mutation pour l'atteinte humaine (23).

Toutes les souches marocaines ont présenté au niveau de leur protéine M2, un résidu 10L qui est un marqueur de la lignée G1. En l'occurrence, une substitution de l'acide amine 31 (S31N) a été observée, ce qui suggère une forte résistance des souches marocaines à l'antiviral l'amantadine (7, 23).

Aucune délétion n'a été notée au niveau des isolats marocains dans la partie C-terminale de NS1 (80–84). En revanche, tous les isolats marocains possèdent les marqueurs de virulence 42S et 189D et le motif GSEV sur la protéine NS1 (tableau 1). La caractérisation moléculaire de la protéine NS2 a révélé la présence de deux mutations : 31 M et 56H qui sont deux déterminants de la virulence des virus d'influenza aviaire faiblement pathogènes.

DISCUSSION

Les données épidémiologiques montrent une très rapide propagation du VIA H9N2 à tous les types de production avicole dans toutes les régions du royaume, fort probablement par le biais des véhicules transportant les volailles vers les marchés de gros, en effet, la commercialisation du poulet vif représente plus de 80% du circuit de commercialisation de poulet de chair. En outre, les véhicules de livraison d'aliment ont probablement joué un rôle non négligeable dans la propagation virale. Ceci révèle que les mesures de biosécurité appliquées dans les élevages industriels avicoles ainsi que le mode de commercialisation sont défectueux et devraient être revus dans les plus brefs

délais, surtout que la situation épidémiologique de IA à l'échelle internationale est préoccupante et que le Maroc n'est pas à l'abri d'une introduction éventuelle d'un autre virus d'influenza aviaire hautement pathogène de type H7 et H5, qui risquerait d'avoir un impact de santé publique beaucoup plus grave. Même si le H9N2 est considéré comme un virus faiblement pathogène, dans les conditions du terrain où plusieurs facteurs concomitants sont présents, les pertes engendrées pourraient être considérables et que malgré la généralisation de la vaccination par l'utilisation des vaccins inactivés dans tous les types de production avicole, la maladie est devenue enzootique dans le pays. Les vaccins ont pu réduire relativement les pertes économiques mais pas la circulation virale. L'analyse moléculaire

du génome complet des virus H9N2 marocains isolés a montré qu'ils appartiennent à la lignée G1 et qu'ils présentent une très forte homologie avec les virus en circulation au Moyen-Orient. Plusieurs mutations signifiant la possibilité de transmission aux humains ont été détectées, par conséquent, une enquête sérologique sur le personnel des abattoirs et des fermes avicoles mérite d'être réalisée. Plusieurs études réalisées en Iran où le virus est enzootique ont révélé une séroprévalence élevée auprès du personnel des abattoirs et des élevages avicoles. Le virus H9N2 est considéré par l'OMS comme un virus pandémique et nécessite la mise en place des programmes de surveillance dans les pays infectés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Khan SU, Anderson BD, Heil GL, Liang S, Gray GC. J Infect Dis. 2015; 212 (4) : 562-9.
2. Chen BL, Zhang Z, Chen WB. Chinese Journal of Veterinary Medicine. 1994 ; 20 : 3-5
3. Dong-Hun L and Chang-Seon S. Clin Exp Vaccine Res. 2013 ; 2 (1) : 26 -33.
4. Nili H and Asasi K. Avian Dis. 2003 ; 47 : 828-31.
5. Naeem K, Ullah A, Manvell RJ, Alexander DJ. Vet Rec. 1999 ; 145 (19) : 560.
6. Perk S, Banet-Noach C, Shihmanter E, Pokamunski S, Pirak M, Lipkind M, et al. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2006 ; 29 (4) : 207-23.
7. Aamir UB, Wernery U, Ilyushina N, Webster RG.. Virology. 2007 ; 361 (1) : 45-55.
8. Body MH, Alrarawahi AH, Alhubsy SS, Saravanan N, Rajmony S, Mansoor MK. Avian Dis. 2015 ; 59 (2) : 329-34.
9. Monne I, Hussein HA, Fusaro A, Valastro V, Hamoud MM, Khalefa RA, Dardir SN, Radwan MI, Capua I, Cattoli G. Influenza Other Respiratory Viruses. 2013; 7 (3) : 240-3.
10. Kammon A, Heidari A, Dayhum A, Eldaghayes I, Sharif M, Monne I, et al. Avian Dis. 2015; 59 (3) : 422-30.
11. Seifi S, Asasi K, Mohammadi A. Iranian. J. Vet. Res. 2012 ; 13 (2) : 138-142.
12. Azizpour A, Goudarzi H, Charkhkar S, Momayez R, Hablolvarid MH. The Journal of Animal & Plant Sciences. 2014 ; 24 (6) : 1655-1662.
13. Iqbal M, Yaqub T, Mukhtar N, Shabbir MZ, McCauley JW. Vet Res. 2013 ; 44 : 100.
14. Zhang K, Zhang Z, Yu Z, Li L, Cheng K, Wang T, et al. Virus research. 2013 ; 175 : 52-57.
15. Phipps LP, Essen SC, Brown IH. Veterinary Microbiology. 2015; 178 : 144 -149.
16. Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, et al., Nature. 2013; 501: 551-555.
17. EL Houadfi M, Fellahi S, Nassik S, Guérin JL and Ducatez MF. Virology Journal. 2016; 13:140-147
18. Hoffmann E, Stech J, Gyan Y, Webster R.G. and Perez D.R. Arch Virol (2001) 146: 2275-2289
19. Hall TA. Nucleic Acids Symp. Ser. 1999; 95-98.
20. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. Mol Biol Evol. 2013; 30 : 2725-9.
21. Kandeil A, El-Shesheny R, Maatouq AM, Moatasim Y, Shehata MM, Bagato O, et al. Arch Virol. 2014; 159 : 2861-76.
22. Wanzeck K, Boyd KL, McCullers JA. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183:767-73.
23. Wernery U, Shanmuganatham KK, Krylov PS, Joseph S, Friedman K, Krauss S, Webster RG. Influenza Other Respiratory Viruses. 2013 ;7 : 1241-1245
24. Shaw M.W, Xu X, Li Y, Normand S, Ueki R.T, Kunimoto R.Y, Hall H, Klimov A, Cox N. j and Subbarao K, Virology . 2002 ; 303 : 1-8
25. Tombari W, Nsiri J, Larbi I, Guérin JL and Gram A. Virology Journal. 2011 ; 8 : 467

Tableau 1. Caractérisation de déterminants moléculaires de la virulence, de la spécificité de l'hôte et de la résistance à l'amantadine des isolats marocains H9N2

Protéines	Déterminants moléculaires de la virulence	Déterminants moléculaires de l'adaptation aux mammifères)	Déterminants moléculaires de la résistance à l'amantadine	Autres éléments
PB2	147V, 504V	318R, 590S, 661T		
PB1		13P		
PB1-F2	66N	82L		protéine tronquée de 52 aa
PA	127V, L550, 672L	I100, R312, 409N		
PA-X				Longueur de 252 acides aminés
HA*		158N, 183H, 226L, 391K		Site de clivage: RSSR*GLF Sites de glycosylation: 29NSTE, 82NPSC, 105NGTC, 141NVTY, 298 NSTM, 305NISK, 492NGTY
NP		372D		
NA			Non	
M1		15I		
M2		D16	31N (résistance à l'amantadine)	
NS1	42S, 189D			Absence de délétion 80-84 et motif GSEV PL
NS2	31M, 56H			

ETUDE CLINIQUE ET PATHOLOGIQUE COMPAREE DE CAS D'INFLUENZA AVIAIRE HAUTEMENT PATHOGENE H5 CHEZ LES GALLIFORMES ET PALMIPÈDES DANS LE SUD-OUEST DE LA FRANCE, 2015-2016

Marie-Noëlle LUCAS¹, Guillaume CROVILLE¹, Romain VOLMER¹, Angélique TEILLAUD¹, Mattias DELPONT¹, Léni CORRAND², Xavier BANSE², Laurent MICHEL³, François LANDAIS², Pierre-Olivier COSTEDOAT², Bruno NEVERS³, Alice MACHET³, Laurent DEFFREIX⁴, Maxence DELVERDIER¹ et Jean-Luc GUERIN¹

¹UNIVERSITE DE TOULOUSE, ENVT, INRA, 31076 Toulouse

²ABIOPOLE, 64410 Arzacq

³SANTE ANIMALE SUD OUEST, 31240 L'Union

⁴BIO'VET Santé Animale, 40330 Amou

jl.guerin@envt.fr

RÉSUMÉ

Dans le cadre de l'épisode majeur d'influenza aviaire hautement pathogène H5 initié en 2015 dans le Sud-Ouest de la France, 10 foyers déclarés (i.e. H5N1, H5N2 or H5N9) de Décembre 2015 à Février 2016 ont été inclus dans une étude pathologique : 4 lots de poulets labels, 3 lots de pintade, 2 lots de canards en gavage, 1 lot d'oies en élevage.

Pour chaque cas inclus, 5 sujets morbides étaient sélectionnés et autopsiés : un relevé des lésions a été effectué ainsi qu'un prélèvement systématique de tissus, en parallèle en formol tamponné à 10% et en fixateur d'acides nucléiques. Un immunomarquage a également été réalisé sur une sélection de coupes histologiques à l'aide d'un anticorps spécifique de la nucléoprotéine. Par ailleurs, pour une sélection de tissus, l'ARN a été extrait et soumis à une analyse RT-PCR quantitative en temps réel ciblant le gène M des virus influenza A.

Chez les *galliformes*, la mortalité quotidienne était faible à modérée, les lots ne présentant pas d'abattement significatif. Les lésions macroscopiques consistaient essentiellement en un œdème sous-cutané et pulmonaire aigu, ainsi qu'une splénomégalie modérée mais systématique. Les principales lésions microscopiques étaient une pneumonie interstitielle aiguë marquée et des lésions de vasculite. Ces lésions étaient plus sévères chez les pintades que chez les poulets. L'immunomarquage a confirmé un marquage intense des noyaux des leucocytes circulants et des cellules endothéliales.

Chez les *palmipèdes*, les signes cliniques étaient absents à l'exception d'un lot d'oies en élevage présentant des œdèmes très sévères. De même, le tableau lésionnel macroscopique était le plus souvent limité à une splénomégalie modérée. Les lésions microscopiques étaient également absentes à minimales.

L'analyse des charges virales tissulaires par RT-PCR quantitative a montré des charges virales significativement plus élevées chez les *galliformes* que chez les *palmipèdes*, quels que soient les tissus.

Cette analyse de cas spontanés d'IAHP H5 illustre les différences majeures observées entre les *galliformes* et les *palmipèdes* dans l'intensité de l'expression clinique et lésionnelle, dont les déterminants virologiques restent à préciser.

ABSTRACT

Clinical and pathological investigation of H5 highly pathogenic avian influenza in galliforms and waterfowl in south West France, 2015-2016

Ten field cases of H5 (i.e. H5N1, H5N2 or H5N9) Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) (i.e. 3 Guinea fowl flocks, 4 label chicken flocks, 2 mule ducks flocks and one geese flocks) were investigated during outbreaks in the south-west of France from November 2015 to January 2016, using histopathology, immunohistochemistry and molecular-based viral titration.

On each case, a complete clinical analysis was performed on farm. 5 dying birds were selected and necropsied. On each bird, gross lesions were recorded and tissues were sampled for histopathology, immunohistochemistry and viral load titration in tissues.

In gallinaceous species: the clinical picture was characterized by a mild to moderate increase in mortality, and almost no overall prostration of affected flocks. Cephalic subcutaneous edema, necrosis of comb or wattles, were observed in a small proportion of affected flocks. In waterfowl, clinical signs were mostly absent.

During necropsic examination, lesions of subcutaneous and pulmonary oedema with congestion, and splenomegaly, were inconsistently observed in chickens and Guinea poult. The main microscopic lesions consisted in systemic cutaneous and visceral tissue hyperaemia, marked acute interstitial pneumonia with capillary thrombosis and heterophilic leukostasis, mild lymphocytic portal hepatitis, and non-specific reactive splenitis. Lesions were more severe in Guinea fowl than in chickens.

In ducks and geese in contrast, gross and microscopic lesions were mild or absent, suggesting a completely distinct pathological picture. Tissular viral RNA loads were globally much higher in galliforms than in waterfowl.

This investigation of spontaneous IAHP cases suggests major differences in clinical and lesional patterns in chickens vs waterfowl, which virological drivers are still to be investigated.

INTRODUCTION

Les virus influenza de type A sont les agents des gripes humaine et animales. De nombreux sous-types sont définis par deux glycoprotéines de surface : chaque virus influenza est ainsi caractérisé par la combinaison d'une des 16 hémagglutinines (H) et une des 9 neuraminidases (N) (Rott, 1992). Les virus susceptibles d'être hautement pathogènes pour la volaille appartiennent tous aux sous-types H5 ou H7, d'où l'intérêt particulier porté à ces derniers. Le génome de ces virus est constitué de 8 brins d'ARN qui peuvent se réassortir, en cas de co-infections. Ces échanges de gènes sont sans doute à l'origine de l'émergence de virus « pandémiques », redoutés chez l'homme et d'une manière générale, expliquent en grande partie le potentiel évolutif de ces virus. Les virus influenza aviaires hautement pathogènes (VIAHP) présentent un tableau pathologique particulièrement sévère (Swayne et Halvorson, 2008). Dans ce contexte, l'émergence de virus hautement pathogènes (VIAHP) H5 en 2015 dans le Sud-Ouest de la France représente un épisode sanitaire d'une ampleur majeure, associé à des virus réassortants de sous-type H5N1, H5N2 et H5N9 (Briand et al, 2017). Une analyse clinique et pathologique comparée a été réalisée sur une sélection de 10 cas spontanés concernant des galliformes ou des palmipèdes. Ce travail s'est focalisé sur l'analyse des signes cliniques et du tableau pathologique, sans intégrer la composante épidémiologique.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Recrutement des cas et visites

Les lots inclus correspondaient à des foyers concernant des poulets labels (n=4), pintades (n=3), oies (n=1) ou canards mulards (n=2) ayant fait l'objet d'une suspicion clinique (galliformes et oies) ou analytique (canards) d'IAHP confirmée par le Laboratoire National de Référence pour l'influenza aviaire et la maladie de Newcastle (Ploufragan - Plouzané). Les virus ont été typés en tant que H5N1, H5N2 ou H5N9 : l'effet du type de neuraminidase n'a pas été pris en compte à ce stade de l'étude pathologique. L'intervention sur le site était réalisée après autorisation des services compétents, en relation avec le(la) vétérinaire sanitaire ayant réalisé la suspicion et dans le respect des procédures de biosécurité, notamment le port d'équipements de protection individuelle et la mise en œuvre de procédures renforcées de nettoyage-désinfection à la sortie du foyer.

1.2. Etude clinique et lésionnelle et prélèvements

En première intention, l'ensemble du lot visité faisait l'objet d'un examen clinique complet. Pour les poulets, pintades et oies, 5 sujets présentant des signes cliniques très sévères étaient sélectionnés. Pour les canards, les animaux étaient sélectionnés aléatoirement. Dans tous les cas, les oiseaux prélevés ont été sacrifiés en vue d'une autopsie systématique et de prélèvements de tissus : sur chaque oiseau, les tissus suivants étaient prélevés et fixés immédiatement en solution de formol 10% tamponné ou dans un microtube contenant du Trizol®, permettant de fixer les acides nucléiques tout en inactivant l'agent infectieux : cœur, foie, rein, rate, trachée, poumon, pancréas, proventricule, gésier, duodénum, jéjunum, iléon, caecum, colon, bourse de Fabricius, thymus, encéphale. Toutes ces opérations ont été réalisées sur le site, dans le respect des procédures de biosécurité prescrites sur les foyers IAHP.

1.3. Histopathologie et immunohistochimie

Pour l'analyse histologique, les prélèvements listés ci-dessus ont été fixés en formol tamponné à 10%, inclus en paraffine et soumis à une recoupe à 3µm. Après coloration à l'hémalum-éosine-safran, les lames étaient observées en microscopie optique.

Une sélection de lames a été soumise à une analyse par immunohistochimie, par marquage à l'aide d'un anticorps et révélation par immunoperoxydase, selon un protocole pratiqué en routine au Laboratoire d'histopathologie de l'ENVET (Corrand et al, 2012) : pré-incubation avec de la pronase 0,05%, incubation sur la nuit à 48°C avec l'anticorps primaire dirigé contre la nucléoprotéine des virus influenza A (anti-NP Argène 11-030, Biomérieux) dilué au 1/50^{ème}, rinçages et incubation avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase, puis application du chromogène, rinçages et lecture. Les lectures des lésions élémentaires et des immunomarquages ont été effectuées par 2 pathologistes vétérinaires diplômés du Collège Européen de Pathologie Vétérinaire (ECVP).

1.4. Extraction des acides nucléiques et RT-PCR quantitative en temps réel

L'extraction des ARN a été réalisée à partir d'une masse de 10 mg de tissus à l'aide d'un kit commercial (Total RNA isolation, NucleoSpin RNA II, Macherey-Nagel), les acides nucléiques ont été élués dans 50µL d'eau nanopure puis conservés à -80°C. Les réactions de RT-PCR temps réel ont été réalisées à l'aide d'amorces ciblant de gène M commun aux virus influenza A, selon un protocole de routine au laboratoire (Corrand et al, 2012). La charge virale

tissulaire a été ainsi exprimée en nombre de copies de gène M par mg de tissu.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Tableaux cliniques et lésions macroscopiques

Chez les galliformes, les oiseaux présentaient des signes cliniques très frustes, sans spécificité, de prostration agonique, avec une incidence faible à modérée : moins de 5% des sujets présentant des signes cliniques et moins de 1% de mortalité journalière au jour de la visite. Les lésions macroscopiques majeures et systématiquement observées (4/4 lots de poulets et 3/3 lots de pintade) étaient un œdème sous-cutané, notamment au niveau céphalique (Figure 1A), un œdème pulmonaire sévère associé à une congestion (Figure 1B), une splénomégalie quasiment systématique mais non spécifique (Figure 1C) et, sur quelques sujet d'un seul foyer, des hémorragies des glandes du proventricule (Figure 1D).

Chez les palmipèdes, les 2/2 lots inclus ne présentaient aucun signe clinique, ni augmentation de la mortalité, ni de lésion macroscopique d'intérêt diagnostique. Par contre, les 5 oies analysées présentaient des signes cliniques de prostration agonique et des lésions très sévères d'œdème sous-cutané et de splénomégalie.

2.2. Analyse des lésions microscopiques

Les principales lésions microscopiques étaient une pneumonie interstitielle aigue marquée, des lésions de vasculite, avec thrombi, leucostase hétérophilique, hyperhémie cutanée (Figure 2D) et viscérale ; œdème et infiltration pulmonaire (Figure 2A et 2B), une hépatite portale modérée et une splénite non spécifique. Ces lésions semblaient plus sévères chez les pintades que chez les poulets, sans que l'on puisse en tirer un enseignement de portée générale. L'immuno-marquage par IHC des tissus à l'aide d'un anticorps anti-influenza A a révélé un marquage nucléaire et cytoplasmique intense, essentiellement dans les cellules endothéliales et les leucocytes circulants et ce, dans tous les tissus examinés, y compris en l'absence de lésion microscopique, comme cela est illustré dans le colon (Figure 2C).

2.3. Analyse des charges virales tissulaires

Pour comparer les charges virales tissulaires chez le poulet et le canard, une étude *préliminaire* a été réalisée sur 2 lots de poulets et 2 lots de canards, tous infectés par un VIAHP de sous-type H5N9. La figure 3 montre que les charges virales (exprimées en copies-équivalent génome/mg de tissus) observées dans le poumon, la rate, le tube digestif et l'encéphale chez le poulet sont globalement de l'ordre de 10^4 à

10^8 copies/mg de tissu, soit des charges supérieures d'un facteur 10^2 à 10^4 à celles observées chez les canards. Cette observation confirme les faibles charges tissulaires, associées à des lésions microscopiques minimales à modérées, observées chez les palmipèdes infectés par les virus H5Nx ayant circulé en France en 2015-2016.

CONCLUSION

L'analyse pathologique comparée des cas spontanés d'IAHP confirme les différences majeures entre les tableaux observés chez le poulet et le canard : les épanchements sous-cutanés et pulmonaires dominent chez les galliformes. L'analyse des lésions microscopiques confirme l'extension et l'intensité des lésions vasculaires. Les marquages illustrent l'ampleur remarquable de la réplication virale, quel que soit le tissu prélevé.

Chez les galliformes, la sévérité du tableau pathologique et les niveaux de charges virales très élevés contraste avec la faible incidence relative des cas observés par comparaison avec la diffusion extrêmement forte dans les élevages de canards, ainsi que les niveaux de morbidité et mortalité très variables observés au sein d'un lot infecté (données non montrées).

Chez le canard mulard, à l'opposé, le tableau pathologique était, sauf exception, extrêmement fruste. Ces observations sont corroborées par les faibles charges virales détectées dans les tissus, aussi bien par immunomarquage que par les essais de PCR quantitative en temps réel dans les tissus.

L'émergence de VIAHP de sous-type H5N8 intervenu fin 2016 sur le territoire français suggère des différences drastiques du profil clinique et pathologique chez les palmipèdes : les signes cliniques à expression essentiellement nerveuse, associés à des charges virales extrêmement élevées sont caractéristiques de ce dernier sous-type.

Les déterminants du tropisme d'hôte et de la virulence de ces différents sous-types de VIAHP H5 seront des sujets d'étude particulièrement intéressants pour mieux comprendre les mécanismes d'adaptation de ces virus et ainsi, de mieux évaluer le risque d'évolution et d'émergence que représente la circulation des VIAHP ou de leurs précurseurs VIA faiblement pathogènes dans les élevages de palmipèdes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Briand FX. et al. Euro Surveill. 2017 Mar 2;22(9).
- Corrand L. et al. Avian Pathol. 2012 Dec;41(6):569-77.
- Rott, 1992. Vet. Microbiol. 33 : 303-310.

Swayne, D.E. et Halvorson, D.A. 2008. Influenza. In Y.M. Saif, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, & D.E. Swayne (Eds.). Diseases of

Poultry 12th edn (pp. 153-184). Ames: Blackwell Publishing.

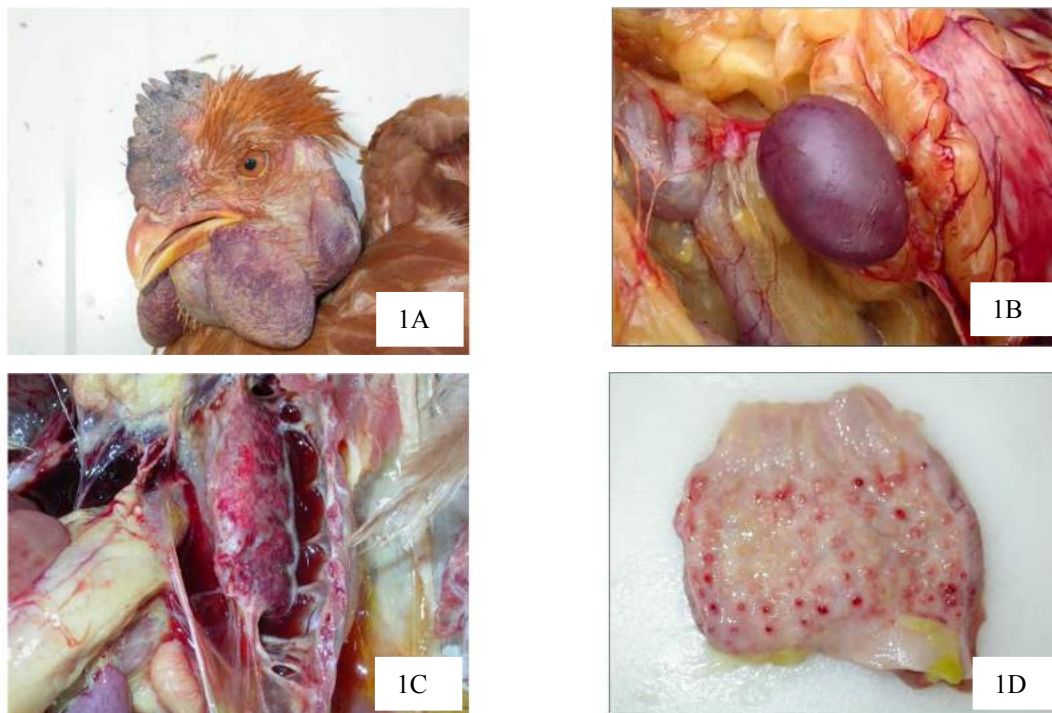


Figure 1 : Lésions macroscopiques majeures observées chez les galliformes infectés par les VIAHP H5Nx. (1A) lésions de nécrose et cyanose de la crête et des barbillons sur un coq ; (1B) Splénomégalie, systématique mais peu spécifique ; (1C) œdème et congestion pulmonaire très sévères ; (1D) nécrose hémorragique des glandes du proventricule.

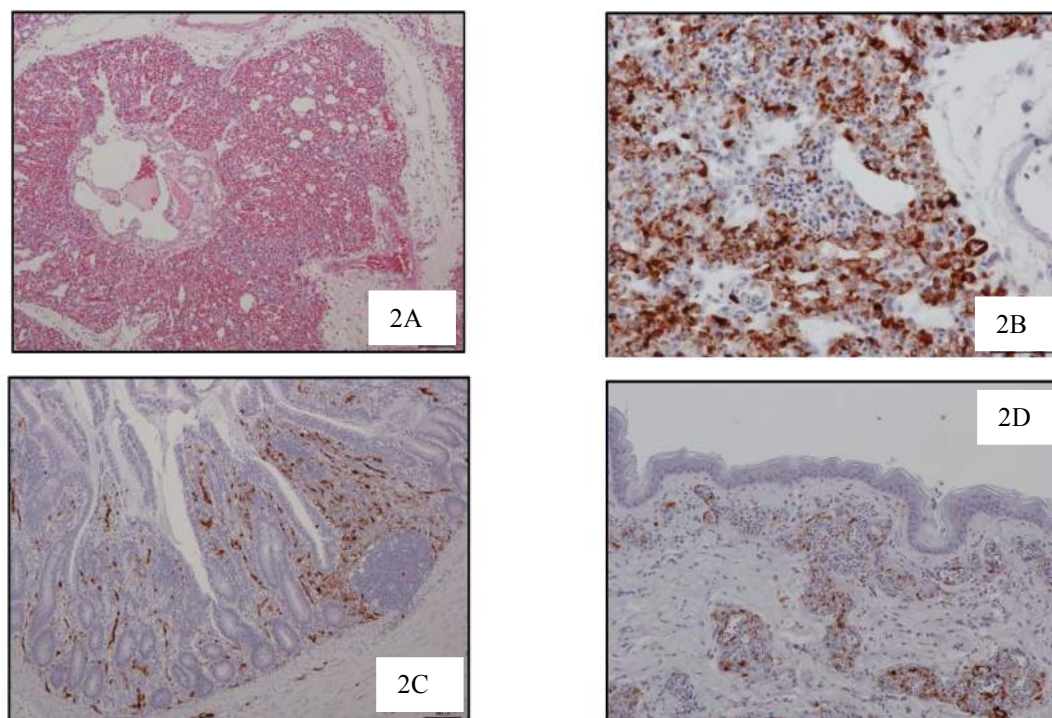


Figure 2 : Lésions microscopiques observées chez les poulets spontanément infectés : poumon (2A) : noter l'infiltration massive par des hétérophiles et des thrombocytes ; 2B : présence massive du virus (marron) dans le parenchyme pulmonaire ; 2C : le colon ne présente pas de lésion microscopique élémentaire mais on note cependant une intense répllication virale (antigènes viraux en marron) ; 2D : marquage viral des capillaires et de leucocytes dans la peau.

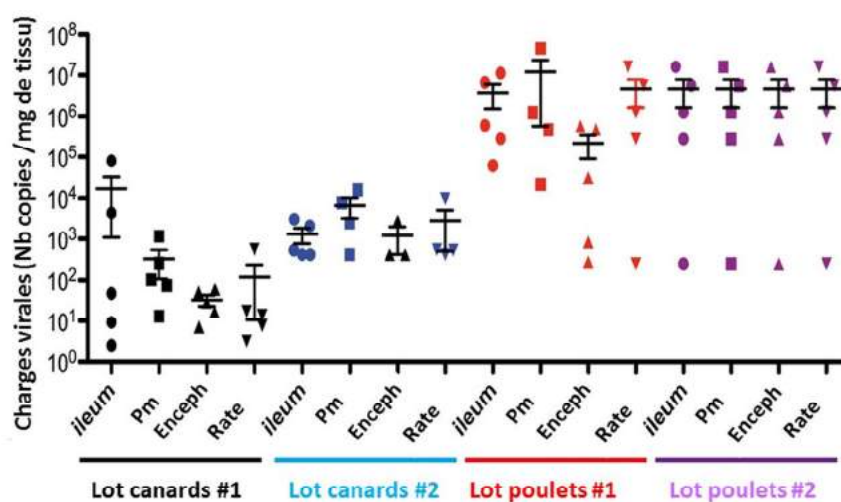


Figure 3 : charges virales (exprimées en équivalents copies génomes/mg de tissu) déterminées dans l'iléon, le poumon (Pm), l'encéphale (Enceph) et la rate de 2 lots de canards et 2 lots de poulets spontanément infectés par des VIAHP de sous-type H5N9. Pour chaque tissu et chacun des 5 sujets analysés, les charges individuelles sont exprimées, ainsi que la moyenne et l'écart à la moyenne.

GESTION DES LISIERS DE PALMIPÈDES CONTAMINÉS PAR LES VIRUS INFLUENZA AVIAIRES H5 HP : RECENSEMENT DES PRATIQUES ET ÉVALUATION EXPÉRIMENTALE DE LA SURVIE DU VIRUS

A. Schmitz¹, N. Rousset², S. Le Bouquin³, K. Ogor¹, M.-O. Le Bras¹, C. Martenot¹, M. Pertusa⁴, P. Daniel⁵, C. Guillou-Cloarec¹, A. Le Prioux¹, C. Allée¹, C. Guillemoto¹, E. Niqueux¹, F.-X. Briand¹, H. Morin⁶, A. Richard⁷ et N. Etterradossi¹

¹ANSES, Unité VIPAC – rue des Fusillés – 22440 PLOUFRAGAN,

²ITAVI- Antenne Ouest, 41 rue de Beaucemaine, 22440 PLOUFRAGAN

³ANSES, Unité EBEAC – BP 53 – 22440 PLOUFRAGAN

⁴ITAVI – antenne de Mont-de-Marsan – 55 av de Cronstadt – 40000 MONT DE MARSAN

⁵LPL 40 – 1 rue Marcel David – 40000 MONT DE MARSAN

⁶GRIMAUD FRÈRES SELECTION – La Corbière – 49450 ROUSSAY

⁷ITAVI – Direction, 7 rue Faubourg Poissonnière – 75009 PARIS

audrey.schmitz@anses.fr

RÉSUMÉ

L'Influenza Aviaire (IA) est une maladie à déclaration obligatoire affectant les oiseaux domestiques et sauvages. Au cours de l'hiver 2015-2016, un épisode d'IA hautement pathogène (HP) impliquant des virus de sous-types H5N1, H5N2 et H5N9 a sévi dans le Sud-Ouest de la France. La diversité des virus détectés suggère une large circulation de virus IA H5 au sein des productions de palmipèdes qui ont été particulièrement touchées. Dans un contexte de mise en place de mesures sanitaires et de biosécurité, la gestion des effluents (fumiers et lisiers) constitue un facteur important à prendre en compte.

L'étude présentée a visé à estimer la persistance d'un virus IA H5N9 HP dans les lisiers de canards reproducteurs et de canards gavés i) en conditions naturelles par le suivi d'élevages contaminés sur le terrain et ii) en conditions expérimentales au laboratoire. Aucun virus infectieux n'a été ré-isolé à partir des lisiers naturellement contaminés, et les résultats expérimentaux obtenus suggèrent une survie du virus H5N9 HP infectieux inférieure à 5 semaines dans deux lisiers de canards reproducteurs barbarie ou pékin. Des études complémentaires sont en cours pour compléter ces résultats en étudiant d'autres lisiers issus de chacune de ces productions.

En complément, un état des lieux des pratiques concernant la gestion du lisier en élevage de canard gras a été réalisé. Des investigations complémentaires conduites dans quelques foyers ont permis de préciser si des mesures spécifiques avaient été mises en œuvre.

ABSTRACT

Management of palmiped slurry contaminated with avian influenza viruses H5HP: survey of practices and experimental evaluation of virus survival

Avian influenza (AI) is an acute and notifiable disease of poultry and wild birds. During the 2015-2016 winter season, several cases of infection by highly pathogenic avian influenza viruses belonging to the H5N1, H5N2 and H5N9 subtypes were detected in South-Western France. The diversity of the detected viruses suggested their wide circulation among duck and geese farms that proved especially affected. In order to improve the sanitary and biosecurity status in the farms, it is important to take into account how (liquid and solid) manure will be disposed of. The present study was designed to evaluate the survival time of H5 highly pathogenic viruses in liquid manure from duck breeders and ducks raised for "foie-gras" production flocks. This was achieved i) by regularly sampling manure tanks in naturally contaminated farms, and ii) in laboratory settings by artificially contaminating some liquid manure samples with known amounts of a highly pathogenic H5N9 virus and following the evolution of virus infectivity during storage. No virus has been isolated from slurry naturally contaminated. The experimental results suggest a survival of the H5N9 HPAi virus shorter than 5 weeks in liquid manure from Muscovy or Pekin breeder ducks. These results are currently being confirmed on additional liquid manure sample.

In addition, an inventory of practices concerning slurry management in ducks raised for "foie-gras" was performed and was also an opportunity to list if specific measures had been implemented.

INTRODUCTION

L'Influenza Aviaire (IA) est une maladie à déclaration obligatoire (Anonymous, 2005 ; OIE, 2005) affectant les oiseaux domestiques et sauvages. De novembre 2015 à août 2016, un épisode d'IA hautement pathogène (HP) impliquant différents virus de sous-types H5 a été détecté dans le Sud-Ouest de la France (Briand et al., 2016). La diversité de ces virus suggère une large circulation de virus IA H5 au sein des productions de palmipèdes qui ont été particulièrement touchées. En plus des études épidémiologiques réalisées, des mesures sanitaires et de biosécurité couplées à une surveillance accrue des cheptels ont été mises en place pour stopper la circulation virale. Dans ce contexte, la gestion des effluents (fumiers et lisiers) constituait un facteur important à prendre en compte pour préciser les possibilités de dissémination de virus infectieux.

L'étude présentée vise à estimer la persistance sous forme infectieuse d'un virus IA H5 HP dans les lisiers de canards reproducteurs et de canards gavés i) en conditions naturelles par le suivi d'élevages contaminés sur le terrain et ii) en conditions expérimentales au laboratoire.

En complément, un état des lieux des pratiques concernant la gestion du lisier en élevage de canard gras a été réalisé. Des investigations complémentaires conduites dans quelques foyers ont permis de préciser si des mesures spécifiques avaient été mises en œuvre.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Lisiers naturellement contaminés

Six lisiers provenant d'élevages de canards reproducteurs pékin (n=2) ou de canards en gavage (n=4), dans lesquels un virus H5HP avait été préalablement détecté, ont été prélevés. Ces lisiers n'ont pas été traités en vue d'un assainissement avant leur échantillonnage/prélèvement.

Parmi ces six élevages, deux ont fait l'objet de prélèvements dans un court délai après la détection du virus dans l'élevage (< 10 jours), et quatre ont fait l'objet de prélèvements plus tardifs après la détection (jusqu'à 3 mois). Cependant, aucune donnée ne permet de déterminer le délai entre la date d'infection du troupeau et la date de détection du virus sur les animaux.

Deux litres de chaque lisier ont été prélevés (idéalement 1 litre en surface de la fosse et 1 litre en profondeur) avant d'être transmis au laboratoire de criblage (LPL 40) qui a homogénéisé les prélèvements et échantillonné 4 tubes de 10 ml. Pour chaque lisier, une recherche génomique du virus influenza a alors été réalisée par le laboratoire de criblage. En cas de résultat positif, les prélèvements étaient transférés après surgélation au Laboratoire National de Référence (LNR), qui mettait alors en œuvre une recherche de virus infectieux par ovoculture.

1.2. Lisiers expérimentalement contaminés

L'étude de vieillissement artificiel a été réalisée à partir de lisiers confirmés comme étant i) négatifs vis-à-vis de l'IA (absence de détection de génome IA) et ii) non toxiques pour l'œuf embryonné inoculé par voie intra-allantoïdienne (système de ré-isolément des virus influenza aviaires mis en œuvre).

Du fait des différents modes d'élevages pratiqués en France, l'étude a porté sur trois types d'élevages de canards : canards reproducteurs pékin, canards reproducteurs barbarie et canards en gavage.

Les lisiers ont été artificiellement contaminés avec le virus H5N9HP A/duck/France/150236b/2015, à une concentration finale de 10^5 à $10^{5,88}$ $\text{DIE}_{50}/\text{ml}$, selon le lot viral utilisé. Ce seuil de contamination a été retenu car il permettait d'obtenir des niveaux de contaminations (valeurs de Ct des lisiers contaminés) comparables avec ceux observés dans les élevages naturellement contaminés. Le lisier ainsi contaminé a ensuite été divisé en 3 parties : une partie du lisier a été conservée sans traitement, une 2ème et une 3ème partie ont été traitées par ajout de lait de chaux à 45 % massique jusqu'à l'obtention respectivement d'un pH 10 et d'un pH12. Le traitement au lait de chaux réalisé en laboratoire avait pour objectif de mimer celui effectué en élevage, lors du traitement d'assainissement des lisiers par chaulage.

Parallèlement, des témoins négatifs ont été préparés à partir de lisiers non infectés artificiellement, traités ou non traités au lait de chaux, afin de vérifier l'innocuité de la matrice sur les méthodes analytiques mises en œuvre. En outre, des contrôles en tampon phosphate (avec et sans virus) ont été réalisés pour suivre la survie du virus dans une matrice simple (tableau 1).

L'étude de vieillissement a été menée à +4°C; température positive la plus favorable à la survie du virus. Chaque semaine, un prélèvement de lisier pour chacune des conditions a été réalisé, afin de déterminer la présence ou non de virus infectieux (figure 1). Les prélèvements n'ont pas été soumis à une étape de neutralisation de pH avant analyse, car des essais préliminaires ont montré que ces pH élevés n'avaient aucune incidence sur la réalisation des analyses.

Le vieillissement des lisiers contaminés a été arrêté dès lors que l'absence de virus infectieux a pu être démontrée dans deux prélèvements hebdomadaires consécutifs.

1.3. Méthodes analytiques

- Analyses physico-chimiques :

Les caractéristiques et compositions des lisiers utilisés pour les tests de contamination expérimentale ont été évaluées par un laboratoire agréé utilisant les méthodes usuelles : pH, conductivité, densité, matière sèche, matière organique, carbone organique, azote total, nitrate, nitrite, calcium, potassium, sodium, phosphore et soufre.

- Isolement par ovoculture

Chaque prélèvement de lisier a fait l'objet d'une recherche de virus infectieux par ovoculture selon la

méthode officielle en vigueur (Afnor, 2016 ; Anonymous, 2006) ; cette recherche était immédiate après prélèvement concernant les lisiers expérimentalement contaminés et différée, après surgélation et transport, concernant les lisiers naturellement contaminés. Après centrifugation des prélèvements de lisier, les surnageants récoltés ont été préincubés avec un mélange d'antibiotiques puis ont été inoculés à des œufs embryonnés de 9 jours provenant de poules EOPS (Exemptes d'Organismes Pathogènes Spécifiés). Après 5 à 6 jours d'incubation ou lors de la mortalité des œufs, les liquides allantoïdiens ont été récoltés et leur activité hémagglutinante a été testée. Un second passage sur œufs a été réalisé en cas de résultats négatifs. Toutes les manipulations de virus vivants ont été réalisées dans un laboratoire de niveau BSL3.

- Recherche de génome IA par rRT PCR :

La recherche de génome IA a été réalisée sur les ARN extraits des prélèvements hebdomadaires de lisier ainsi que sur les liquides allantoïdiens récoltés à l'issue de l'ovoculture. Les ARN viraux ont été extraits selon le protocole décrit dans le kit RNEasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf Cedex, France), puis ont été testés en RT-PCR temps réel gène M-AIV selon la méthode officielle en vigueur (Spackman et al., 2002). La détection de génome viral par rRT PCR ne permet pas d'apporter d'information sur le caractère infectieux du virus détecté. Toutefois, cette analyse est complémentaire à l'ovoculture de fait de sa plus grande sensibilité de détection. En effet, la mise en évidence d'une augmentation des quantités de génome détectées entre le prélèvement initial de lisier et la récolte finale de liquide allantoïdien pourra indiquer une répllication virale et être corrélée aux résultats obtenus en ovoculture (mise en évidence d'une activité hémagglutinante). Dans le cas de résultats contradictoires entre le résultat de l'ovoculture et détection de génome viral par rRT PCR, des analyses complémentaires sont réalisées, tel qu'un essai supplémentaire d'isolement viral.

1.5. Etat des lieux des pratiques

Un questionnaire a été publié en juillet 2016. Une part a été diffusée sous format papier lors des formations biosécurité organisées par les chambres d'agriculture, à destination des producteurs en circuit court. Une autre part a été transmise en ligne via le logiciel LimeSurvey, diffusée par le Cifog, aux différentes organisations de producteurs de la zone Sud-Ouest. Certains foyers ont, quant à eux, été interrogés par téléphone. Le questionnaire était constitué de deux parties, l'une portant sur la description des pratiques habituelles de gestion du lisier et l'autre sur les mesures spécifiques mises en place suite à la déclaration d'un foyer.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Lisiers naturellement contaminés

Aucun virus influenza n'a été ré-isolé par la méthode d'ovoculture sur œufs embryonnés à partir des lisiers testés. Cependant, une interférence entre la conservation par surgélation à -65°C des matrices contaminées et les possibilités de ré-isolement viral est actuellement suspectée, sans que cette hypothèse soit pour le moment confirmée (mise en évidence de génome viral dans le prélèvement de lisier ; absence d'isolement de virus par ovoculture et absence de mise en évidence de génome viral sur liquide allantoïdien récolté à l'issue de l'ovoculture).

2.3. Lisier expérimentalement contaminé

Bien que les caractéristiques physico-chimiques des lisiers diffèrent selon le type d'élevage, l'espèce et la période de production, la composition des différents lisiers utilisés dans cette étude sont cohérentes avec celles décrites dans la littérature (Itavi, 2013 ; Pingel et al. 2012) (tableau 2).

A ce jour, deux vieillissements artificiels ont été réalisés, sur des lisiers provenant d'exploitations de canards reproducteurs barbarie et pékin, et un vieillissement sur un lisier provenant de canards en gavage est en cours. Les résultats des lisiers contaminés sont présentés dans le tableau 3. Les résultats obtenus pour les lisiers "contrôles" non contaminés, traités par chaulage ou non traité, ont tous été négatifs tout au long de l'étude et ne sont donc pas mentionnés dans le tableau 3. Les résultats obtenus par rRT-PCR gène M-AIV étant cohérents avec ceux obtenus par ovoculture, ceux-ci ne sont également pas présentés dans le tableau 2

- Lisier de canards reproducteurs barbarie :

- Les prélèvements effectués le jour du dopage permettent de ré-isoler le virus dans le lisier dopé non traité ainsi que dans le lisier traité à pH10. Le virus n'a pas été ré-isolé après traitement à pH12.

- Les prélèvements effectués après 1 semaine, ainsi qu'après 2 et 3 semaines de vieillissement (+4°C) permettent de ré-isoler le virus dans le lisier dopé non traité, contrairement aux lisiers dopés traités à pH10 et à pH12.

- Les prélèvements effectués à partir de 4 semaines de vieillissement (+4°C), soit 28 jours post-dopage, ne permettent pas de ré-isoler le virus dans le lisier dopé non traité.

- Lisier de canards reproducteurs pékin :

- Les prélèvements effectués le jour du dopage permettent de ré-isoler le virus dans le lisier dopé non traité ainsi que dans les lisiers traités à pH10 ou à pH12.

- Les prélèvements effectués après 1 semaine de vieillissement n'ont pas été analysés ; en effet, ces prélèvements ont été conservés par surgélation avant que ne soit suspectée une possible interférence entre la surgélation et la détection de virus par ovoculture.

- Les prélèvements effectués après 2 semaines, ainsi qu'après 3 et 4 semaines de vieillissement (+4°C) permettent de ré-isoler le virus dans le lisier

dopé non traité, alors que le virus n'a pas été ré-isolé dans le lisier dopé et traité à pH10 ou à pH12.

○ Les prélèvements effectués après 5 semaines de vieillissement (+4°C), soit 35 jours post-dopage, ne permettent pas de ré-isoler le virus dans le lisier dopé non traité.

2.4. Etat des lieux des pratiques

86 éleveurs ont répondu, parmi lesquels une majorité d'éleveurs gavageurs stricts (73%). Les deux tiers étaient situés dans les Landes. Parmi ces élevages, 16 d'entre eux étaient des anciens foyers identifiés au cours de l'épisode d'influenza aviaire de l'hiver 2015-2016.

Les fosses en béton constituent l'équipement majoritaire (65%) par rapport aux fosses géomembrane. Les fosses ne sont couvertes que dans 45% des élevages enquêtés. Dans 80% des élevages, un raclage en continu sous caillebotis est réalisé. Le lisier est principalement stocké sans traitement particulier à moins de 50 mètres des bâtiments d'élevage. Le recours à un traitement complémentaire est pratiqué par 18% des éleveurs, par méthanisation ou encore chaulage du lisier. La fosse est vidée une à deux fois par an (87% des élevages). La vidange de la fosse se limite dans la majorité des cas à la partie liquide, et dans un tiers des cas, les éleveurs pratiquent un nettoyage de ses abords par chaulage et/ou désinfection à l'aide d'un produit virucide. Quatre-vingt-quinze pour cent des éleveurs épandent eux même leur lisier. Dans la majorité des cas il est épandu sur des terres situées à plus de 500 mètres de l'élevage et enfoui directement à l'aide d'injecteurs à disque ou à dents.

La durée moyenne de stockage du lisier pour les élevages foyers a été de 128 jours pour les éleveurs qui n'ont pas traité leurs lisiers (13 éleveurs) et de 107 jours pour les 3 éleveurs ayant réalisé un chaulage (respectivement 40, 100 et 180 jours). Tous les foyers ont respecté la durée minimale d'assainissement de 60 jours à l'exception d'un éleveur qui a chaulé son lisier (40 jours de stockage). Seuls 3 éleveurs ont pratiqué le chaulage et 5 ont nettoyé et désinfecté les abords de leur fosse. Tous les éleveurs ayant été foyers ont enfoui leurs lisiers et ont nettoyé et désinfecté leur maté-

riel d'épandage. Parmi les changements de pratiques observés, 3 éleveurs ont couvert leur fosse, 2 ont chaulé leur lisier, 2 l'ont enfoui, 3 ont raclé les parois de leur fosse et nettoyé ses abords lors de sa vidange, alors qu'ils ne le faisaient pas auparavant. Les difficultés de mise en œuvre des opérations de décontamination des fosses, jugées parfois contraignantes et peu sécurisées, ont été évoquées par les éleveurs. Le recours à la chaux vive, souvent déconseillé pour les fosses géomembrane, a été limité.

CONCLUSION

La possible interférence entre la conservation par surgélation des matrices contaminées et les possibilités de ré-isollement viral doit être confirmée. Dans l'attente, toute analyse réalisée sur une matrice lisier est dorénavant traitée de manière immédiate, en limitant la seule conservation à +4°C sur une durée la plus courte possible.

Les analyses réalisées sur les échantillons ayant été surgelés, provenant d'élevages dans lesquels un virus H5HP avait été préalablement détecté, ne peuvent donc être considérées comme concluantes quant à la persistance du virus H5HP dans les lisiers.

Les résultats obtenus au cours de cette étude de vieillissement artificiel de lisier expérimentalement contaminé sont similaires pour les deux types de production canards reproducteurs barbarie et pékin, suggérant une durée de survie du virus infectieux inférieure à 5 semaines, en l'absence de tout traitement, cohérents avec la durée de stockage de 60 jours préconisée par la réglementation, en cas d'assainissement naturel. Toutefois, ces résultats sont en cours de confirmation, par la réalisation d'essais complémentaires sur des lisier de canards reproducteurs barbarie et pékin ainsi que deux essais sur des lisiers de canards en gavage.

L'enquête réalisée permet de confirmer le suivi des réglementations en termes de gestion et d'assainissement du lisier. Toutefois, la diversité de pratiques mise en évidence montre la nécessité d'élaboration de préconisations pratiques et claires, notamment en cas de foyer.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Afnor, 2016. In : NF U47-210 Méthodes d'analyse en santé animale - Isolement des myxovirus aviaires hémagglutinants par ovoculture et recherche de leur activité hémagglutinante
- Anonymous, 2005. In : Directive 2005/94/CE du Conseil du 20 décembre 2005 concernant des mesures communautaires de lutte contre l'influenza aviaire et abrogeant la directive 92/40/CEE.
- Anonymous, 2006. In : Décision de la Commission 2006/437/CE du 4 août 2006 portant approbation d'un manuel de diagnostic pour l'influenza aviaire conformément à la directive 2005/94/CR du Conseil. J. OFF. Union Eur. L237, 1-27
- Briand FX., Schmitz A., Ogor K., Le Prioux A., Guillou-Cloarec C., Guillemoto C., Allée C., Le Bras M.O., Hirchaud E., Touzain F., Quenault H., Huneau A., Lebouquin-Leneveu S., Cherbonnel-Pansart M., Lemaître E., Courtillon C., Gares H., Daniel P., Fediaevsky A., Blanchard Y., Etteradossi N., van der Werf S., Jestin V., Niqueux E., 2016. Euro surveill. (In press).
- Itavi, 2013. In : Mise à jour des références CORPEN-Volailles de 2006
- OIE, 2016. In : Code sanitaire pour les animaux terrestres, Chapitre 10.4. Influenza Aviaire.
- Pingel H., Guy G., Baéza E., 2012. In : Production de canards, pp121-122.
- Spackman E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., Perdue M.L., Lohman K., Daum L.T., Suarez D.L., 2002. J. Clin. Microbiol. (40), 3256-3260.

Tableau 1 : Différentes conditions de lisiers et tampons mis en place pour l'étude de vieillissement artificiel.

Matrice	Sans traitement	Traitement lait de chaux	
Lisier contaminé	Non traité	pH 10	pH 12
Lisier	Non traité	pH 10	pH 12
Tampon phosphate	Non traité	/	/
Tampon phosphate contaminé	Non traité	/	/

} Contrôles négatifs
Contrôle positif

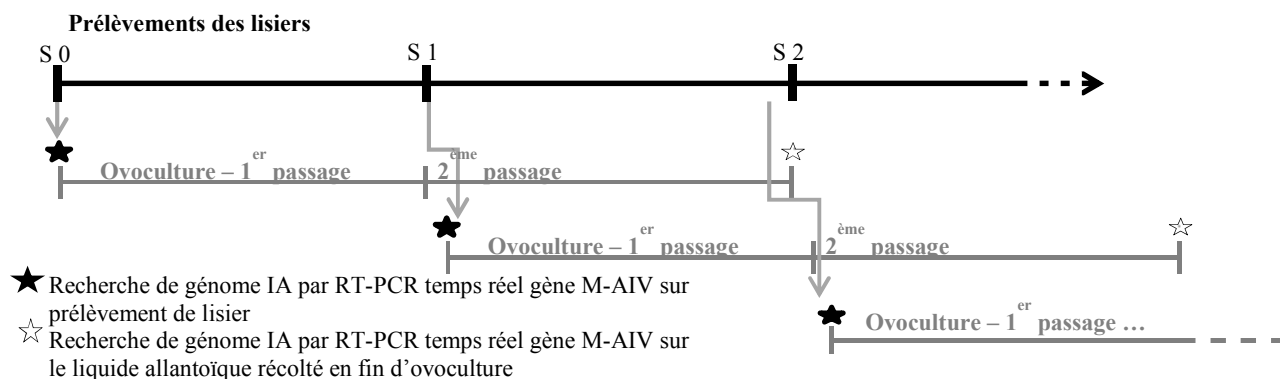
Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques des lisiers utilisés pour les études de vieillissement artificiel.

production	unité	canard	canard	canard gavage
		reproducteur	reproducteur	
pH	pH	7,28	6,97	5,57
Conductivité [20°C]	μS/cm	7 090	9 920	15 800
Conductivité [25°C]	μS/cm	7 790	10 900	17 800
Densité		/	0,994	1,049
Matière sèche (MS)	%	3,10	1,20	9,20
Matières organiques sur MS	%	56,70	58,40	81,40
Matière minérale sur MS	%	43,30	41,60	18,60
C org sur MS	%	38,90	32,90	43,40
Azote total Kjeldahl (NTK)	%N	0,18	0,20	0,49
Nitrate	%N/brut	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Nitrite	%N/brut	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Azote ammoniacal (NH ₄ -N)	%N/brut	0,10	0,16	0,26
Azote organique (calcul)	%N/brut	0,08	0,04	0,23
Calcium sur MS	% CaO	16,27	5,68	1,87
Potassium sur MS	% K ₂ O	3,13	13,58	1,83
Sodium sur MS	% Na ₂ O	0,78	4,04	0,75
Phosphore sur MS	% P ₂ O ₅	6,60	4,01	2,92
Soufre sur MS	% SO ₃	1,93	2,50	0,90

Tableau 3 : Résultats d'isolement viral obtenus lors du vieillissement artificiel de lisiers de canards reproducteurs pékin et barbarie, expérimentalement contaminés et traités ou non par chaulage. S : Semaine

		S0 Après 1H de contact	S1 Après 7 jours à +4°C	S2 Après 14 jours à +4°C	S3 Après 21 jours à +4°C	S4 Après 28 jours à +4°C	S5 Après 35 jours à +4°C	S6 Après 42 jours à +4°C	S7 Après 49 jours à +4°C
lisier canards reproducteurs barbarie	Non traité	Positif	Positif	Positif	Positif	Négatif	Négatif	/	/
	traitement pH 10	Positif	Négatif	Négatif	Négatif	/	/	/	/
	traitement pH 12	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	/	/	/	/
lisier canards reproducteurs pékin	Non traité	Positif	non effectué	Positif	Positif	Positif	Négatif	Négatif	Négatif
	traitement pH 10	Positif	non effectué	Négatif	Négatif	/	/	/	/
	traitement pH 12	Positif	non effectué	Négatif	Négatif	/	/	/	/

/ condition de lisier non conservé, son statut ayant été confirmé négatif lors de précédents prélèvements

**Figure 1** : Chronologie d'un vieillissement artificiel de lisier. (S : semaine)

ETUDE DESCRIPTIVE DES PRATIQUES DE BIOSECURITE DANS LES ELEVAGES DE PALMPIEDES A FOIE GRAS DANS LE SUD-UEST DE LA FRANCE

Delpont Mattias¹, Blondel Vincent¹, Robertet Luc¹, Duret Hugues¹, Vaillancourt Jean-Pierre², Guerin Jean-Luc¹, Paul Mathilde¹

¹ ENVT, UNIVERSITE DE TOULOUSE, INRA, UMR 1225- 23 Chemin des Capelles - 31076 TOULOUSE,

² FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE, UNIVERSITE DE MONTREAL – J2S 7C6, SAINT-HYACINTHE, QUEBEC, CANADA
m.delpont@envt.fr

RÉSUMÉ

L'émergence de virus Influenza Aviaire Hautement Pathogène (IAHP) de type H5 à partir de novembre 2015 dans le Sud-Ouest de la France questionne les pratiques de biosécurité, à savoir les aménagements et les pratiques permettant d'éviter l'introduction d'agents pathogènes dans une exploitation (biosécurité externe) et leur circulation (biosécurité interne). La filière des palmipèdes à foie gras a été particulièrement concernée du fait (i) de la réceptivité des palmipèdes au virus (rôle de réservoir des virus Influenza A), (ii) de l'accès aux parcours extérieurs, (iii) de la pratique de la bande-multiple et (iv) des flux importants entre élevages.

Cette enquête épidémiologique descriptive a visé à décrire les pratiques de biosécurité avant les changements mis en œuvre suite à l'arrêté du 8 février 2016 sur la biosécurité dans les exploitations avicoles. Un questionnaire de 80 questions a été renseigné au cours de visites dans 46 exploitations du Sud-Ouest représentatives de la diversité des territoires et des modes de productions de la filière (éleveur, gaveur, éleveur-gaveur en cycle ouvert ou fermé). Ces questionnaires portaient sur (i) la position et le fonctionnement de l'élevage, (ii) la gestion des flux internes mais aussi entrant et sortant de l'exploitation, ainsi que (iii) les pratiques de nettoyage et désinfection.

Les résultats de cette enquête permettent d'identifier les pratiques les plus fréquemment rencontrées sur le terrain et de pointer quelques comportements clés à améliorer.

ABSTRACT

A descriptive study of biosecurity practices in foie-gras duck farms in South West of France

Starting November 2016, Highly Pathogenic Avian Influenza was detected in the South West of France in poultry farms. This outbreak pointed out the need to focus on biosecurity practices. Biosecurity means to prevent the introduction of pathogenic agents a farm or their circulation and persistence. Regarding Avian Influenza, the French fatty-liver industry was considered at risk because of several of its features : (i) the ducks acting as a reservoir for Influenza A viruses, (ii) the free-range access, (iii) the presence of different ages on farm and (iv) the numerous movements between different farms.

This epidemiological study aims at describing biosecurity practices before the changes due to new biosecurity regulations. Visits including 80 (mostly closed) questions were conducted in 46 farms representing most parts of South West and the different farming systems (number or presence of starting, growing or force-feeding units). The questions refer to the position of the farm, its production characteristics, the movements in, out, or within the farm (feed, animals and their by-products, people, vehicles and tools) and the management of cleaning and disinfection procedures.

This study points out the most common practices. This is of major relevance for the follow-up of the dramatic changes due to new biosecurity regulations.

INTRODUCTION

Entre novembre 2015 et juin 2016, 77 foyers d'Influenza Aviaire Hautement Pathogène (IAHP) et 16 foyers d'Influenza Aviaire Faiblement Pathogène réglementés (IAFP) de type H5 ont été déclarés dans le Sud-Ouest de la France dans des élevages (et basses-cours) de volaille, en particulier de palmipèdes à foie-gras (plateforme ESA, point au 13/06/2016).

La diversité des virus IA et l'ampleur du nombre d'exploitations concernées a mis en évidence le besoin de maîtriser la biosécurité en élevage. En effet, le 8 février 2016 a vu la parution d'un arrêté (NOR: AGRG1603907A) encadrant les pratiques de biosécurité dans les élevages avicoles sur le territoire national.

La biosécurité se définit comme l'ensemble des mesures nécessaires pour protéger les élevages de l'introduction de nouveaux agents infectieux (biosécurité externe). En cas de contamination avérée, les mesures de biosécurité visent à réduire la propagation de ces agents à l'intérieur de l'élevage (biosécurité interne).

La filière des palmipèdes à foie-gras est particulièrement concernée par le risque de propagation de Virus Influenza Aviaire (VIA) de par (i) la réceptivité des canards vis-à-vis des VIA (Alexander et al, 1986), qui en fait un compartiment réservoir ; (ii) de l'accès systématique à des parcours extérieurs ; (iii) de la pratique très courante des bandes multiples sur un même site et (iv) des flux importants d'animaux entre sites d'élevage et de gavage spécialisés.

Cette enquête vise à décrire les pratiques de biosécurité dans les élevages de palmipèdes gras du Sud-Ouest de la France avant la mise en œuvre des changements importants consécutifs à cet épisode sanitaire.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Choix des exploitations

Un total de 46 exploitations associées à la production de palmipèdes à foie gras a été inclus dans cette étude.

Les représentants de l'interprofession, des groupements de production, des chambres d'agriculture et les vétérinaires nous ont permis de recruter les différentes exploitations pour cette enquête, avec pour objectif de constituer une liste d'éleveurs correspondant aux différentes typologies d'élevage.

Nous avons pu couvrir les départements du Sud-Ouest suivants : Aveyron (n = 2), Dordogne (n = 6), Gers (n

= 8), Landes (n = 22), Lot (n = 2) et Pyrénées-Atlantiques (n = 6).

Les exploitations visitées étaient des sites d'élevage de canards de J1 au stade prêt-à-gaver (E, n = 15), d'élevage de canards prêts-à-gaver à partir de canards démarrés (ED = 1), de gavage uniquement (G, n = 1), d'élevage et gavage en cycle ouvert (EGCO, n = 12) et d'élevage et gavage en cycle fermé (EGCF, n = 9).

Enfin, 15 éleveurs étaient indépendants contre 31 travaillant avec des groupements de production.

Les visites ont eu lieu entre février et juillet 2016.

1.2. Questionnaire

Les visites d'exploitation étaient accompagnées par un support de 80 questions, ouvertes ou à choix multiples. Lors de la discussion, les questions étaient autant que possible ouvertes pour éviter d'influencer les réponses. Un total de 4 enquêteurs a participé à ces visites avec des bilans réguliers et de nombreuses visites communes pour éviter les biais liés à l'opérateur.

Les questions abordaient les différents aspects de la biosécurité à savoir (i) la typologie de l'exploitation, (ii) sa localisation, (iii) la gestion des visiteurs, (iv) des animaux sauvages, (v) des véhicules et du matériel, (vi) des effluents, (vi) des animaux d'élevage, domestiques et nuisibles, (vii) du personnel, (viii) de l'équipement, du bâtiment et des parcours, et (ix) des cadavres.

Les données ont ensuite été transposées dans un tableur pour obtenir des variables continues (n=17), binaires (n=27), catégorisées par rapport au risque potentiel à la biosécurité (n = 22 avec une échelle en 3 points, n = 8 avec une échelle en 4 points et n = 1 avec une échelle en 5 points).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Pression environnementale

Sur le territoire du Sud-Ouest, la densité en exploitations de palmipèdes est très variable. Elle est très élevée dans certaines zones d'élevage avicole bien connues, comme la Haute-Chalosse (40). Dans notre étude, la plupart des exploitations (25/46) se situe dans un rayon de 500 à 1400 m d'une autre exploitation de palmipèdes, et 7/46 à une distance inférieure à 500m, ce qui souligne la forte proximité entre élevages. La littérature fait mention de nombreuses corrélations entre distance entre exploitations et risque de transmission d'agents pathogènes, notamment de VIA. En effet, dans une étude de Boender et al. (2007) aux Pays-Bas le risque pour un élevage de volaille d'être infecté dépendait directement de la distance avec les élevages voisins.

2.2. Véhicules

Au niveau du site de production, on remarque que dans un tiers des cas les animaux (sur parcours le plus souvent) sont au bord de la voie publique (moins de 15 m), ce qui augmente le risque de contamination par les véhicules passant à proximité. En revanche, dans un tiers des cas les animaux sont éloignés à plus de 70 m de la voie publique. En ce qui concerne les véhicules qui entrent sur l'exploitation dans seulement 10 cas sur 46 il existe un emplacement dédié à leur décontamination, ce qui signifie que les pratiques effectives de nettoyage de véhicules sont encore plus rares. Dans plus de la moitié des cas (25/46) il arrive que les camions de ramassage d'animaux (canards prêts à gaver ou gras) qui arrivent sur l'exploitation contiennent déjà des animaux issus d'une autre exploitation. Considérant le temps de stationnement, la fréquence très faible de nettoyage des véhicules arrivant sur l'exploitation et le fait que les cages soient ajourées, il est très envisageable que des plumes et/ou des fientes d'animaux d'un élevage A puissent contaminer l'élevage B dans le quel un enlèvement a lieu. En outre, la livraison des aliments a rarement lieu en un seul point du site d'élevage (seulement 19 fois sur 46), ce qui multiplie le temps de présence du camion de livraison sur le site et dans des lieux différents, donc son exposition à des germes du site, alors qu'il livrera d'autres exploitations par la suite. Enfin, l'équarrisseur est contraint à manœuvrer régulièrement (25/46) à l'intérieur du périmètre professionnel de l'exploitation alors qu'il représente un risque sanitaire évident.

Entre deux parcours ou bâtiment contenant des animaux de bandes différentes, les véhicules ne sont jamais nettoyés dans 22/36 cas et rarement dans 10/36 cas.

2.3. Facteur humain

L'enquête a mis en évidence une mauvaise protection physique des sites par rapport aux visiteurs. En effet, dans 19/46 cas on passe dans l'élevage pour accéder au domicile, plus une fois sur deux on ne retrouve aucun panneau d'interdiction d'entrer et dans à peine un cas sur cinq l'entrée au site d'exploitation est clôturée. En ce qui concerne les pratiques de visiteurs, dans seulement un tiers des cas les visiteurs utilisent des bottes propres à l'exploitation ou des surbottes, quel que soit leur temps de présence auprès des animaux. Les bottes des visiteurs sont un vecteur très important de diffusion d'agents pathogènes entre élevages, ou au sein d'un élevage. L'éleveur lui-même ne change jamais de bottes dans 34/46 cas ni de tenue dans 31/46 cas. Il a été montré au Danemark que dans les élevages de poulets de chair, le fait d'avoir une paire de bottes par bâtiment réduisait considérablement le risque de contamination par *Campylobacter* (Newell et Fearnley, 2003). En outre,

le recours à l'entraide, notamment par des personnes détenant des volailles (commerciales ou non) est très fréquent (22/46).

Plus d'un tiers des exploitations visitées (17/46) ne disposaient d'aucun sas sanitaire, et 12 disposaient d'un sas pour chaque atelier. Parmi tous les sas visités, 8/29 présentaient une délimitation physique nette entre les deux zones. Les sas ont une importance considérable car ils permettent un nettoyage efficace des mains et le changement de bottes.

2.4. Matériel

Si la moitié des élevages a recours au partage de matériel (souvent pour le transport d'animaux ou l'épandage de fumiers/lisiers), le risque de transmission d'agents pathogènes associé est très élevé car dans 9 cas sur 23 ce matériel n'est pas régulièrement décontaminé, alors qu'il est directement en contact avec des matières très riches en microorganismes.

2.5. Animaux

L'avifaune sauvage observée sur parcours est surtout représentée par des échassiers (hérons cendrés, hérons garde-boeufs) et dans une moindre mesure les sturnidés (étourneaux) et les colombiformes (pigeons, colombes, tourterelles). Bien qu'ils ne soient généralement pas considérés comme espèce réservoir, les étourneaux et les colombiformes peuvent parfois héberger des VIA en conditions expérimentales sur une très courte durée et sans mise en évidence de transmission du virus entre individus (Boon et al., 2007, Klopfleisch et al. 2006)). Lors de l'épizootie de 2015-16 en France, on n'a pas pu mettre en évidence de VIA chez les échassiers prélevés autour des foyers (ENVIT, ANSES).

La grande majorité des cas d'identification de VIA sur avifaune sauvage concerne les palmipèdes et autres oiseaux aquatiques.

Une autre source d'oiseaux pouvant jouer le rôle de réservoir est représentée par les animaux de basse-cour, qui sont parfois au cœur même des exploitations avicoles. Dans les deux tiers des exploitations, une basse-cour était présente et la moitié d'entre elles contenait des palmipèdes, dont on rappelle qu'ils peuvent être porteurs inapparents de Virus Influenza Aviaires Faiblement ou Hautement Pathogènes.

Les « infirmeries » constituent un environnement à risque pour la persistance de n'importe quel type d'agent pathogène en élevage, surtout si elle n'est pas vidée à la fin d'une bande (et décontaminée). On retrouve des infirmeries « à risque » car non vidées ou dans une structure au cœur de l'élevage dans 10/46 élevages.

Les animaux de compagnie ayant accès au parcours ou aux bâtiments (chien de travail) sont retrouvés dans 18/46 élevages. Ils ne sont pas interdits par la réglementation actuelle mais constituent un risque dans les exploitations car passent de la zone intérieure à la zone extérieure (et vice versa) sans décontamination préalable.

2.6. Effluents et cadavres

Après curage des bâtiments, le fumier est stocké à moins de 50 m des aires d'élevage dans 18/40 élevages et le lisier n'est pas couvert dans 17/33 élevages. Il est à noter qu'il n'est pas obligatoire de couvrir son lisier, mais il demeure dans ces cas-là accessible aux oiseaux sauvages, insectes et autres nuisibles.

La plupart des élevages visités étaient bien équipés d'un congélateur fonctionnel pour stocker les cadavres (43/46), il manquait parfois le couvercle des bacs d'équarrissage (6/46) mais dans 11 cas sur 37 le bac d'équarrissage n'était pas nettoyé régulièrement, ce qui peut poser des problèmes (surtout si le bac n'est pas couvert) de persistance sur le site d'agents pathogènes ayant justement provoqué la mort des animaux stockés. Dans plus de la moitié des cas (27/46) l'équarrisseur passe régulièrement sur l'exploitation (plus de dix fois par an) ce qui augmente considérablement le risque d'exposition et renvoie vers l'intérêt de bien maîtriser le flux du camion d'équarrissage sur le site.

2.7 . Nettoyage, désinfection et vide sanitaire

1/3 des exploitations visitées pratiquait un vide sanitaire complet de l'exploitation chaque année. A partir du 1^{er} Juillet 2016, ce vide annuel est obligatoire dans chaque unité de production. La durée du vide sanitaire permet de réduire la charge infectieuse en élevage. Par exemple, elle est significativement liée à la diminution de l'incidence de cellulite en poulet de chair (Elfadil et al., 1996).

Si la quasi-totalité des éleveurs (44/46) utilise un flux d'eau à haute-pression pour le nettoyage, il ne sont que 17/46 à utiliser un détergent. Dans la mesure où la gestion du microbisme de l'environnement passe par l'élimination de la matière organique car cette dernière inactive la plupart des désinfectants, il devient nécessaire de maîtriser au maximum les opérations de décapage. Même en l'absence visuelle apparente de matière organique, elle n'a pas nécessairement disparu. Il existe des tests permettant de contrôler l'efficacité du nettoyage comme l'utilisation d'un chiffon blanc à passer sur les surfaces ou des contrôles plus élaborés mettant en évidence le métabolisme des microorganismes présents dans la matière organique (ATPmétrie).

CONCLUSION

Cette étude descriptive a permis de mettre en évidence des modes de fonctionnement pouvant être considérés comme facteurs de risque vis-à-vis de l'introduction, de la diffusion et de la persistance d'agents pathogènes en élevage. Elle représente un état des lieux **avant** la crise sanitaire de l'hiver 2015-16 dans la zone de restriction (ZR), c'est à dire avant la mise en place des mesures de biosécurité et des formations des éleveurs à la biosécurité.

On soulignera surtout des marges de progrès importantes dans le poste des flux de personnes, qu'il s'agisse des personnels permanents de l'exploitation ou des visiteurs occasionnels. La mise en place de sas en nombre suffisant et bien équipés contribuera à maîtriser le rôle de vecteur des bottes, des vêtements et la propreté des mains. La gestion des animaux malades (« infirmeries ») et des animaux domestiques (chiens de travail) demande aussi de revoir la perception du risque par les éleveurs quant à la cohabitation d'espèces ou d'animaux de statut sanitaire différent dans un espace restreint.

Le renforcement de la biosécurité dans la filière des palmipèdes à foie gras permettra dans un premier temps de garantir un risque plus faible vis-à-vis des Virus Influenza Aviaires, mais aussi d'autres agents pathogènes, réglementés ou non, provoquant des effets cliniques importants. En outre, les infections subcliniques constituent aujourd'hui un manque à gagner important pour la filière et l'amélioration de la performance et de la rentabilité des exploitations passera en partie par la maîtrise de la biosécurité.

L'émergence du virus IAHP H5N8 depuis Décembre 2016 rappelle la vulnérabilité de cette filière à l'introduction et à la circulation de ces virus, alors que les mesures d'amélioration de la biosécurité des élevages et des transports d'animaux n'étaient pas encore pleinement déployées. Cette crise sanitaire, très différente de la précédente dans sa nature, appellera un renforcement et une adaptation du dispositif global de biosécurité et de surveillance.

A plus long terme, les changements importants de pratiques consécutifs à la crise sanitaire de 2015-16 devront être accompagnés de mesures de suivi pour permettre leur pérennisation. En effet, le respect des mesures de biosécurité mises en place (notion d'observance) a tendance à diminuer dans le temps (Racicot et al, 2012). Il sera pertinent dans un second temps d'étudier les causes d'une mauvaise observance et de proposer des moyens de l'améliorer.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANSES, Saisine n° 2016-SA-0059

Arrêté du 8 février 2016 relatif aux mesures de biosécurité applicables dans les exploitations de volailles et d'autres oiseaux captifs dans le cadre de la prévention contre l'influenza aviaire (modifié par l'arrêté du 15 juillet 2016).

<http://www.pplateforme-esa.fr/article/résultats-de-la-surveillance-de-l'influenza-aviaire-h5-hp-en-france-point-de-situation-12-au>

Alexander D.J. et al., 1986. Av.Path (15), 647-662

Boender G.J. et al, 2007. Plos Comput. Biol. 3 (4)

Boon et al., 2007, Emerg Infect Dis. 13(11), 720-1724

Elfaldil et al., 1996. Avian Dis 40(3). 699-706

Klopfleisch et al., 2006. Vet Pathol (43). 463–470

Newell et Fearnley, 2003. Appl. Environ. Microbiol, (69), 4343-4351

Racicot et al., 2012. Prev Vet Med (103), 208-218

Tableau 1. Classement des variables étudiées

Variables	Définition des scores	Résultats (répartition des élevages inclus)				
		0	1	2	3	total
BIOSECURITE EXTERNE : LOCALISATION						
Distance de l'exploitation de palmipèdes la plus proche	0 = inférieur à 500 m, 1 = entre 500 et 1400 m, 2 = supérieur à 1400 m	7	25	14		46
Distance entre voie publique et animaux	0 = inférieur à 15 m, 1 = entre 15 et 70 m, 2 = supérieur à 70 m	15	16	15		46
BIOSECURITE EXTERNE : VISITEURS						
Accès domicile = accès à élevage	0 = non, 1 = oui	27	19			46
Barrière physique (effective) à l'entrée du site	0 = non, 1 = oui	36	10			46
Chaussures des intervenants extérieurs en bâtiments/parcours	0 = chaussure ou bottes non changées, 1 = surbottes, bottes fournies par l'éleveur ou pas de recours à des aides extérieures	31	15			46
Panneau d'interdiction à l'entrée	0 = aucun, 1= bâtiment ou site, 2 = bâtiments et site	24	18	4		46
Entraide	0 = oui et contact avec volailles, 1 = oui , 2 = non	22	7	17		46
BIOSECURITE EXTERNE : ANIMAUX SAUVAGES						
Avifaune : visite d'échassiers	0 = jamais, 1 = très rare, 2 = occasionnel, 3 = souvent	15	6	8	8	37
Avifaune : visite de palmipèdes	0 = jamais, 1 = très rare, 2 = occasionnel, 3 = souvent	33	4	0	0	37
Avifaune : visite de laridés	0 = jamais, 1 = très rare, 2 = occasionnel, 3 = souvent	34	3	0	0	37
Avifaune : visite de sturnidés	0 = jamais, 1 = très rare, 2 = occasionnel, 3 = souvent	23	4	7	3	37
Avifaune : visite de colombiformes	0 = jamais, 1 = très rare, 2 = occasionnel, 3 = souvent	21	9	6	1	37
BIOSECURITE EXTERNE : CAMION ET MATERIEL						
Aire de lavage bétonnée pour véhicules	0 = non, 1 = oui	36	10			46
Circuit du camion d'équarrissage séparé des autres	0 = non, 1 = oui	25	11			36
Aliment livré à un endroit unique	0 = non, 1 = oui	27	19			46
Occurrence de "arrivée d'un camion de ramassage non vide"	0 = régulièrement, 1 = parfois, 2 = jamais ou pas concerné	11	14	21		46
Partage d'équipement	0 = oui mais pas nettoyage régulier, 1 = oui et nettoyage régulier , 2 = non	9	14	23		46
BIOSECURITE EXTERNE : EFFLUENTS						
Lisier	0 = fosse ouverte, 1 = fosse couverte, 2 = pas de lisier	17	16	13		46

Fumier	0 = stockage à moins de 50 m , 1 = stockage à plus de 50 m, 2 = stockage hors du site d'élevage, , 3 = pas de fumier	18	13	9	6	46
BIOSECURITE INTERNE : ANIMAUX						
Infirmierie (absence)	0 = dans une structure séparée, 1 = dans un coin du bâtiment, 2 = absence	10	17	19		46
Animaux de compagnie	0 = non, 1 = pas d'accès au bâtiment ou parcours, 2 = ayant accès aux bâtiments ou parcours	15	13	18		46
Basse-cour	0 = contient palmipèdes, 1 = galliformes uniquement, 2 = absence	10	20	16		46
BIOSECURITE INTERNE : PERSONNEL						
Zonage du sas	0 = pas de marche en avant ou de limite fixée, 1 = limite virtuelle ou tracée au sol, 2 = limite nette	14	7	8		29
Tenue	0 = la même partout pour plusieurs âges, 1 = une par âge, 2 = une par bâtiment ou parcours	34	7	5		46
Bottes	0 = les mêmes pour plusieurs âges, 1 = une par âge, 2 = une par bâtiment ou parcours	31	6	9		46
Nombre de sas	0 = aucun sas utilisé, 1 = sas central si plus d'un bâtiment, 2 = plusieurs sas mais pas partout, 3 = un sas par bâtiment	17	4	13	12	46
BIOSECURITE INTERNE : EQUIPEMENT, BATIMENTS, PARCOURS						
Vide sanitaire annuel complet de palmipèdes	0 = non, 1 = oui	31	15			46
Nettoyage : pression	0 = basse pression, 1 = haute pression	2	44			46
Nettoyage : détergence	0 = non, 1 = oui	29	17			46
Nettoyage des véhicules ayant accès aux aires d'élevage	0 = jamais, 1 = oui parfois, 2 = oui systématiquement, 3 = pas de véhicule ou pas de parcours	22	10	4	10	46
BIOSECURITE INTERNE : GESTION DES CADAVRES						
Bac d'équarrissage couvert	0 = non, 1 = oui	6	40			46
Présence d'un congélateur	0 = non, 1 = oui	3	43			46
Lavage du bac d'équarrissage	0 = jamais ou très rarement, 1 = régulièrement	11	26			37
Fréquence passage équarrisseur	0 = inférieur à 3 fois par an, 1 = entre 3 et 10 fois par an, 3 = supérieur à 10 fois par an	27	14	5		46

Les scores sont échelonnés de 0 à 1 (variable binaire), 2 ou 3. Les scores les plus faibles sont considérés comme insatisfaisants vis-à-vis de la biosécurité. Les résultats sont exprimés sous forme de nombre d'élevages par valeur de score. Certains items n'ont pas pu être renseignés, d'où un total différent de 46 (visite d'avifaune sauvage sur parcours pour un élevage en claustration, zonage du sas lorsqu'il est absent).

CARACTERISATION DES ASSEMBLAGES D'ACARIENS PREDATEURS PRESENTS NATURELLEMENT EN ELEVAGES DE PONDEUSES ET POTENTIEL POUR LE CONTROLE BIOLOGIQUE (PROJET BIOPTIPOU)

**El Adouzi Marine¹, Chiron Geoffrey², Le Peutrec Guénolé¹, Gambin Tristan¹,
Villeuneuve de Janti Etienne¹, Olivier Bonato³, Roy Lise¹**

¹ UMR 5175 CEFÉ, CNRS, Université de Montpellier, Université Paul-Valéry Montpellier3, EPHE, Montpellier Cedex 5, France

² ITAVI LYON - 23 rue Jean Baldassini - 69364 Lyon Cedex 07

³ IRD IPME - 911 Avenue Agropolis - 34394 Montpellier

marine.eladouzi@gmail.com

RÉSUMÉ

CONTEXTE : Le pou rouge des poules, *Dermanyssus gallinae*, est responsable de dégâts importants en poules. Il passe l'essentiel de sa vie dans l'environnement, à distance de l'hôte, ne montant sur la poule que le temps de repas rares et fugaces. Cela rend son contrôle délicat. Un potentiel supprimeur est susceptible d'être associé à des assemblages d'ennemis naturels présents dans certains élevages. Identifier des assemblages d'acariens prédateurs naturellement présents dans certains bâtiments d'élevage et en promouvoir l'activité pourrait permettre un contrôle biologique efficace. **OBJECTIFS :** Une étude a été initiée en vue d'établir quels assemblages particuliers d'arthropodes sont présents dans les élevages où le pou est présent sans proliférer et s'ils sont absents ou incomplets dans ceux où il prolifère régulièrement. Les premiers résultats sont présentés ici. **METHODE :** Les communautés d'arthropodes de 20 bâtiments à historiques d'infestation variés ont été caractérisées par des inventaires réalisés à partir de prélèvements standards de fumier, collectés en Mars et en Juin. Des indices de diversité ont été calculés (richesse, Shannon, équitabilité de Pielou) et des tests statistiques ont permis d'évaluer l'effet de la période, de l'âge de la bande, du type de conduite (tests de Kruskal-Wallis, de Wilcoxon, corrélation de Spearman). **RESULTATS :** Le type de conduite ainsi que l'âge de la bande apparaissent comme facteurs importants de structuration des communautés. Les relations avec l'infestation par le pou rouge seront testées ultérieurement.

ABSTRACT

Characterization of predatory mites' assemblages in laying hen farms and potential for biological control

BACKGROUND: The Poultry Red Mite (PRM), *Dermanyssus gallinae*, is of economic importance as a worldwide pest in the poultry industry. PRM spends most of its life in the environment, off host, climbing on it only for rare and quick mealtimes. This is one of the reasons why conventional control is not very efficient. Some suppressive potential could be associated with assemblage of natural enemies. Identifying predatory mites assemblages naturally occurring in farm buildings homing PRM without outbreak event and promoting their activity might allow an efficient biological control. **OBJECTIVES:** The study is aimed at establishing which particular assemblages of arthropods are present in layer farms where PRM is present but never outbreaking and missing or incomplete in layer farms where PRM regularly pullulates. Here we present the first results. **METHOD:** The arthropod community of twenty layer buildings with various infestation histories were characterized by identifying and counting arthropods from standard manure samples. Diversity indices (richness, Shannon, Pielou evenness) were calculated and statistical analysis allowed assessment of the effect of season, flock age and farm practice (Kruskal-Wallis and Wilcoxon tests, Spearman correlation). **RESULTS:** Type of farm practices and flock age appeared to be major factors of community structuration. The relationships between the communities and red mite infestation will be tested later.

INTRODUCTION

Le pou rouge des poules, *Dermanyssus gallinae*, est un acarien hématophage associé aux oiseaux et problématique en poules. La prévalence de cet acarien est élevée dans les élevages de poules (56-90 % dans les élevages français, Sparagano et al., 2009, OSE, comm. pers.). D'importance économique, il cause des dégâts directs (augmentation du stress chez les poules, anémie, hausse de la mortalité...) et indirects (déclassement des œufs, effet réservoir pour les salmonelles ...).

Communément considéré comme un parasite, il s'agit plus précisément d'un microprédateur (sensu Lafferty et Kuris, 2002) : au même titre que le moustique ou la punaise de lit, il ne recherche son hôte que pour de rapides repas, ponctuels, effectués sur différents individus hôtes et réalise toutes les étapes de son développement dans l'environnement, à distance de l'hôte. Ainsi, à un instant t, la très large majorité des populations demeure agrégée dans les interstices que fournit la structure d'élevage et demeure préservée des pulvérisations d'acaricide. Parmi les méthodes de lutte alternatives, l'inoculation d'une ou deux espèces exogènes d'acariens prédateurs du pou contribue à réguler ses populations. Dans tout écosystème, le potentiel régulateur des ennemis naturels est inscrit dans le réseau des interactions en présence et est donc susceptible d'être plutôt associé à des assemblages d'espèces qu'à l'action d'une ou deux espèces individuelles. Différentes espèces d'acariens et d'insectes prédateurs d'autres invertébrés se développent dans les substrats d'élevage (fumier, litière). Par conséquent, une solution particulièrement prometteuse pourrait être de promouvoir des processus écologiques naturellement en œuvre dans les bâtiments d'élevage (contrôle biologique par conservation).

Si un certain nombre d'études ont permis d'avancer dans la connaissance des communautés d'arthropodes et notamment d'acariens se développant dans les substrats d'élevages de ruminants, très peu d'études ont porté sur la mésofaune des bâtiments de volaille : principalement une étude approfondie au Royaume-Uni (Brady, 1970a, b) dédiée à l'évaluation du rôle de réservoir de pathogènes potentiellement joué par les communautés d'acarien du fumier et quelques études sommaires (ex. Lesna et al. 2009), visant le développement de la lutte biologique par inoculation.

La présente étude, menée dans le cadre du projet Bioptipou (financement PEI), est dédiée à terme à développer des pratiques de lutte biologique par conservation. Parmi les bâtiments où le pou rouge est présent, certains – les plus fréquents – connaissent régulièrement des épisodes de pullulation du pou rouge qui résultent en des

dommages notoires, alors que d'autres ne semblent pas rencontrer de problème particulier. Notre hypothèse est la suivante : dans le second cas, les populations de pou sont régulées par des interactions entre arthropodes naturellement en œuvre dans le bâtiment, dont les assemblages seraient absents ou incomplets dans les bâtiments à problème. En vue à plus long terme de mettre à profit les arthropodes en présence, nous avons pour objectif d'établir si de tels assemblages existent, avec un focus sur les acariens Mésostigmates. Pour ce faire, la première étape consiste à caractériser simplement les communautés naturellement présentes dans des bâtiments soumis à des modes de gestion différents. La présente étude fait état des premiers résultats ainsi obtenus.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Plan d'échantillonnage

L'aire d'échantillonnage du projet se situe dans la région Auvergne-Rhône-Alpes. Vingt bâtiments de poules au sol (16 exploitations différentes) hébergeant tous le pou rouge ont été recrutés de manière à couvrir les différents types alternatifs de production d'œuf de consommation (au sol, plein air, biologique et label rouge). Afin de caractériser la structure des communautés communément rencontrées en poules et d'estimer les variations spatio-temporelles de leur dynamique, un inventaire des arthropodes du fumier est réalisé cinq fois par bâtiment, à intervalle de trois mois. Au moment de la rédaction, les données d'inventaire de deux campagnes (mars et juin 2016) ont été analysées.

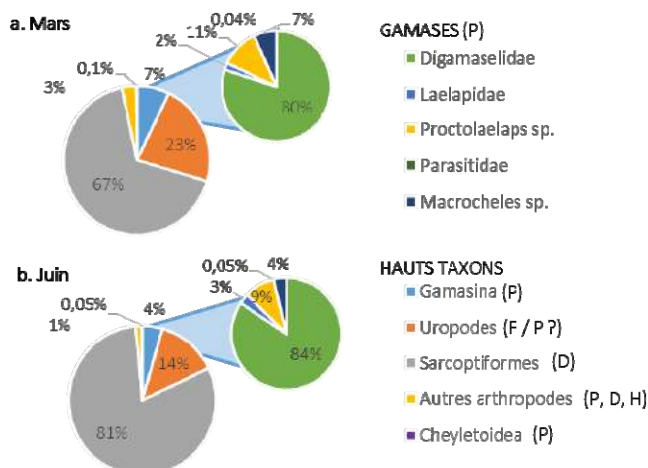
1.2. Caractérisation des communautés

Le fumier a été choisi comme substrat à analyser à partir de travaux préliminaires d'évaluation grossière de la diversité dans différents microhabitats à proximité des zones de repos des poules. Les communautés d'arthropodes du fumier ont été caractérisées à des niveaux supraspécifiques (morphoespèces) afin d'en établir la structure et d'évaluer le potentiel d'interaction avec le microprédateur (prédation). Deux niveaux taxinomiques sont retenus pour les analyses : hauts niveaux taxinomiques (ordre ou sous-ordre selon le groupe) sur l'ensemble des arthropodes, genre ou famille au sein des acariens Mésostigmates (Gamasina et Uropodina). Ces derniers font l'objet d'un focus car ils sont composés d'espèces majoritairement prédatrices d'autres arthropodes.

1.2.1. Protocole de prélèvement standard

Des prélèvements standards de fumier ont été collectés en cinq points sélectionnés au hasard sous les caillebotis de chaque bâtiment au cours de chaque campagne. Afin d'être à même de comparer quantitativement les résultats d'inventaire par prélèvement, un volume fixe de fumier est prélevé grâce à des carottiers-mesures adaptés à des flacons

Figure 1 Abondances relatives des principales morphoespèces d'arthropodes recensées dans le fumier aux hauts niveaux taxinomique (sous-ordres) et au niveau genre/famille chez les acariens Mésostigmates Gamases (poux rouges exclus) pour la campagne de a. Mars et b. Juin. P = Prédateurs, F= Fongivores, D = Détritviores, H = Habitudes diverses.



de verre de 250 ml. L'intégrité des communautés prélevées est assurée par le blocage du développement des populations d'arthropodes au moment du prélèvement (en produisant une vapeur saturante d'acétate d'éthyle dans le flacon).

1.2.2. Protocole d'isolement et d'identification des arthropodes

Les arthropodes sont extraits du fumier par filtration et incorporation du filtrat à de l'huile de paraffine, de l'eau et de l'éthanol. Après centrifugation du mélange, les arthropodes sont récupérés dans la phase huileuse, rincés au cyclohexane et fixés à l'acide lactique sur une membrane de nylon. L'examen de celle-ci pour l'identification et le dénombrement des arthropodes est réalisé à la loupe binoculaire.

En amont des campagnes de prélèvement, des morphoespèces ont été définies et décrites sur la base d'un premier screening de fumier. L'objet des morphoespèces ainsi définies est de permettre un inventaire exhaustif à la loupe binoculaire, sur des échantillons contenant des milliers d'individus qu'il n'est pas possible de préparer tous pour l'observation microscopique (nécessaire à une identification fine). De manière à connaître les différentes espèces effectivement regroupées dans les morphoespèces, un sous échantillon d'env. 300 acariens mésostigmates isolés à partir d'1/4 des prélèvements des campagnes de mars et de juin tirés au hasard a été éclairci par digestion par la protéinase K, monté en lame et lamelle dans du milieu de Hoyer, puis identifiés au microscope. Le produit de digestion a fait l'objet en parallèle d'analyses moléculaires (ADN, non

présentées ici) qui ont permis de vérifier la cohérence des identifications.

1.3. Analyses statistiques

Les données ont été analysées sous R (R Development Core Team, 2008), soit directement (abondance / occurrence des différents taxons), soit à partir d'indices de diversité calculés par prélèvement (richesse, indice de Shannon, équitabilité de Pielou) avec le package ade4. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour évaluer l'effet « bâtiment » et pour estimer l'effet du type de conduite, le test de Wilcoxon sur données appariées par bâtiment (moyenne des 5 prélèvements par bâtiment et par campagne) pour évaluer l'effet saison, le test de corrélation de rang de Spearman pour mesurer la corrélation entre l'âge de la bande et les variables de diversité.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Composition des communautés rencontrées

Taxinomie. Les acariens dominent largement en nombre les autres taxons dans les communautés caractérisées (cf. Figure 1). Des Insectes Coléoptères comme *Alphitobius diaperinus* (petit ténébrion) et des Histeridae (escarbots), ainsi que des Diptères Brachycères (mouches), connus pour être abondants en élevages de volaille, ont en effet été fréquemment recensés. Les morphoespèces d'acariens mésostigmates (Tableau 1) permettent pour la plupart de distinguer des genres ou des familles, niveau de résolution généralement atteint suivant cette approche (Gulvik et al. 2007). Quatre familles de Gamases (Digamasellidae, Laelapidae, Ascidae et Macrochelidae) et deux morphoespèces de Mésostigmates uropodes sont rencontrées de manière récurrente, avec des abondances très contrastées.

Tableau 1. Liste des espèces identifiées au microscope au sein des morphoespèces d'acariens Mésostigmates Gamases et Uropodes.

Morphoespèce	Famille	Espèce
Type	Digamasellidae	<i>Cornodendrolaelaps longiusculus</i>
Digamasellidae	Digamasellidae	<i>C. reticulosus</i>
	Digamasellidae	<i>Cornodendrolaelaps sp.</i>
	Phytoseiidae	<i>Amblyseius sp.</i>
Type Laelapidae	Laelapidae	<i>Androlaelaps casalis</i>
	Laelapidae	<i>Hololaelaps leptoscutatus</i>
Type <i>Macrocheles</i>	Macrochelidae	<i>Macrocheles muscaedomesticae</i>
	Macrochelidae	<i>M. merdarius</i>
Type	Ascidae	<i>Proctolaelaps scolyti</i>
<i>Proctolaelaps</i>		
Type Uropodoidea	Nenteriididae	<i>Nenteria tipo floralis</i>
	Urodinychidae	<i>Uroobovella marginata</i>
Type <i>U. fimicola</i>	Urodinychidae	<i>Uroobovella fimicola</i>

Guildes écologiques. Les microhabitats présents dans la zone hors sol des poulaillers d'élevage, où les poules séjournent pour l'alimentation, la ponte et le repos, offrent par nature des conditions en partie comparables aux nids d'oiseaux (oiseaux présent souvent, longtemps immobile). Le développement d'assemblages d'arthropodes appartenant à trois guildes principales (une gilde est un groupement de taxons qui exploitent une même catégorie de ressources) est donc attendu : i. une gilde d'arthropodes détritivores/microbivores se nourrissant sur les déchets engendrés par les oiseaux ou sur les champignons qui s'y développent, ii. une gilde d'arthropodes parasites et/ou microprédateurs d'oiseaux (ici une seule espèce : le pou rouge), iii. une gilde de prédateurs se nourrissant sur les deux précédentes guildes (Lesna et al., 2009). Conformément à ces attendues, les communautés de nos échantillons regroupent, outre les poux rouges, des espèces détritivores/microbivores et des espèces prédatrices d'autres invertébrés (voir Tableau 2).

De manière logique, la gilde des prédateurs présente des effectifs relatifs nettement inférieurs à celui des détritivores et des poux rouges, qui constituent au moins en partie sa ressource (les proies sont toujours plus nombreuses que leurs prédateurs ; voir Figure 1). Cette gilde s'est révélée relativement diversifiée, incluant trois familles d'acariens Mésostigmates Gamasina (Digamasellidae, Laelapidae, Ascidae, Macrochelidae), des pseudoscorpions et deux familles d'insectes (Staphylinidae, Histeridae) rencontrés de manière récurrente. Il est intéressant de noter qu'*Androlaelaps casalis* (Laelapidae), principal agent de lutte biologique actuellement utilisé en élevage de poule, a été rencontré plusieurs fois dans des élevages qui n'ont jamais fait l'objet d'inoculation au moyen de populations commercialisées.

Les Mésostigmates Uropodes ont été recensés fréquemment, avec des abondances parfois très élevées. Or les habitudes alimentaires de la plupart de ces espèces sont très mal connues. Certaines au moins sont capables de prédation sur d'autres petits invertébrés. *Urobovella marginata*, espèce récurrente dans notre étude, a fait l'objet d'essais en lutte biologique avec un succès mitigé (Gerson et al. 2003). Ces espèces sont aussi capables de se nourrir de matières en décomposition et/ou de champignons. Par conséquent, il est difficile de les assigner à l'une des deux guildes aujourd'hui. Enfin, l'espèce *A. diaperinus* (petit ténébrion), très fréquente et assez abondante, est une espèce polyphage qui a été montrée capable de se nourrir de *D. gallinae*.

2.2. Facteurs de structuration des communautés

Variation intra-bâtiment et effet du bâtiment. Malgré une forte hétérogénéité dans la composition en

morphoespèces et leur abondance entre prélèvements d'un même bâtiment, le bâtiment semble bien constituer une unité (effet bâtiment sur abondances et sur indices de diversité : Kruskal-Wallis, $p < 0,045$).

Phorésie et effet de l'âge de la bande. La presque totalité des espèces de Mésostigmates (aussi bien Gamases qu'Uropodes) rencontrées sont connues pour leurs habitudes phorétiques : elles ont coutume d'utiliser des insectes volants (mouches, coléoptères) comme des « taxis » pour se déplacer. Cela suggère un rôle important des mouches et coléoptères naturellement très abondants (voir plus haut) et, éventuellement un rôle majeur des entités paysagères : les sources d'acariens prédateurs, dépendant probablement de microhabitats spécifiques, pourraient varier fortement selon la composition du paysage environnant et les patrons de circulation des « taxis » potentiels. Pourtant, au cours de la bande, la structure globale reste assez stable avec la présence récurrente de certaines morphoespèces dès le premier trimestre de la bande (Tableau 2). Une corrélation positive significative est notée entre l'âge de la bande et la richesse en taxons de haut niveau ($S = 641355,6$; $\rho = 0,46$; $p < 0,001$). Mais elle s'explique par l'arrivée de taxons rares et peu abondants (insectes particulièrement), résultant en une complexification dans la composition des communautés sans modification fondamentale de leur structure. Fait intéressant, la plupart des acariens prédateurs du groupe des Mésostigmates Gamases, sont présents dans les prélèvements dès le premier semestre de la bande.

Effet de la saison et du type de conduite. Le test de Wilcoxon sur données appariées par bâtiment entre mars et juin ne met pas en évidence d'effet saison marqué. Des changements plus importants pourront apparaître avec les campagnes ultérieures. Le test de Kruskal-Wallis appliqué aux abondances des différentes morphoespèces de Mésostigmates Gamases suggère un effet significatif du type de production (Figure 2). Cela conforte la pertinence de notre objectif d'intensification des processus écologiques en place : une fois identifiés les assemblages au potentiel suppresseur sur le pou rouge, l'identification plus précise des facteurs favorables à ceux-ci devrait permettre à terme de proposer des préconisations de gestion des bâtiments appropriées.

CONCLUSION

Les présents résultats fournissent des éléments de connaissance nouveaux sur des communautés d'acariens potentiellement intéressantes pour la lutte biologique par conservation. La relative diversité et la récurrence de certains taxons et en particulier d'espèces d'acariens Mésostigmates Gamases connues pour leurs habitudes prédatrices représentent des signaux encourageants. Un groupe énigmatique s'est avéré potentiellement intéressant : les Mesostigmates Uropodes aux habitudes mal connues se trouvent présents de manière récurrente, parfois en abondance. Clarifier les interactions éventuelles de ce groupe avec le pou rouge est une perspective importante. Plus généralement, dans le cadre du projet, nous évaluerons prochainement la relation entre infestation par le pou rouge et les communautés d'arthropodes décrites ici. Il sera intéressant à plus long terme d'affiner la compréhension du rôle que pourraient jouer le paysage, outre les pratiques dans le bâtiment, sur la structuration de ces communautés.

Figure 2. Abondance des Mésostigmates Gamases suivant le type de production. BIO = Biologique (N=60), LR = Label Rouge (N=30), PA = Plein Air (N=40), SOL = sol (N=70). Test de Kruskal-Wallis, post-hoc de Tuckey (lettres au-dessus des boîtes).

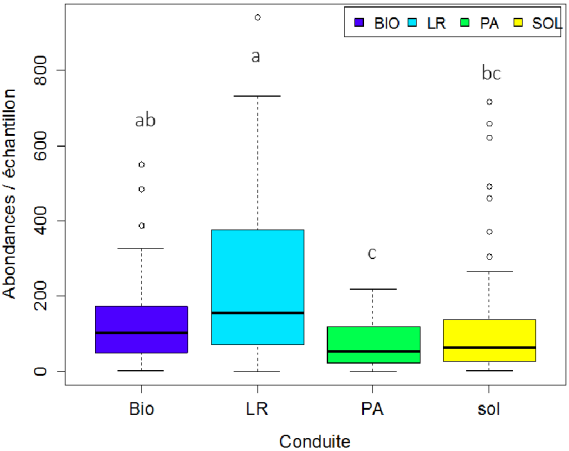


Tableau 2. Morphoespèces rencontrées dans le fumier et guildes associées. Les chiffres indiqués en rosé correspondent au pourcentage d'occurrence des morphoespèces dans les bâtiments et sont indiqués en fonction des âges de bande (regroupés par trimestre). T1 = 1^{er} trimestre (N=9), T2 = 2^d semestre (N=14), T3 = 3^{eme} trimestre (N= 11), T4 = 4eme trimestre (N=5).

		Morphoespèces de Gamasina :	Guildes	Age de la bande			
				T1	T2	T3	T4
Acarie Mesostigmatid	Gamasina	Digamasellidae Proctolaelaps sp. Laelapidae Macrocheles sp. Parasitidae	Habitudes prédatrices connues pour la plupart des espèces	100	93	100	100
	Uropodina		Habitudes mal connues : fongivores et/ou prédateurs	89	93	82	60
Acarie Acari-formes	Sarcoptiformes (Astigmata, Oribatida)		Détritivores	67	71	82	60
	Cheyletoidea		Prédateurs	67	93	91	60
Autres arachnides	Pseudoscorpionida		Prédateurs		14	45	20
Myriapodes	Myriapoda		Prédateurs ou herbivores	100	100	100	100
Insectes	Coleoptera (Staphylinidae, Tenebrionidae, Histeridae, Cucujidea)		Prédateurs ou généralistes	44	43	64	100
	Diptera (Brachycera, Nematocera)		Détritivores et autres	11	14	45	80
	Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Thysanoptera,		Habitudes très diverses		7	64	60
						9	

REMERCIEMENTS

Nous remercions pour leur soutien financier la Région Auvergne-Rhône-Alpes (grâce au PEP avicole), l'Europe (grâce au FEADER) ainsi que le CNPO. Nous remercions vivement Maria Lourdes Moraza (Universidad de Navarra, Pamplona, Espagne) pour les confirmations et identifications spécifiques de Mésostigmates.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Brady J., 1970. J. Appl. Ecol., (7), 331.
2. Gerson U., Smiley RL, Ochoa R., 2003. In : Mites (Acari) for Pest Control. Wiley-Blackwell, ISBN: 978-0-632-05658-3
3. Gulvik, M., 2007. Polish J. of Ecol., 55(3), 415.
4. Lafferty K.D., Kuris A.M., 2002. Trends Ecol. Evol, 17 (11), 507-513.
5. Lesna I., Wolfs P., Faraji F., Roy L., Komdeur J., Sabelis M.W., 2009. Exp. Appl. Acarol. (48), 63–80.
6. R Development Core Team, 2008. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL : <http://www.R-project.org>.
7. Sparagano O., Pavličević A., Murano T., Camarda A., Sahibi H., Kilpinen O., Mul M., van Emous R., le Bouquin S., Hoel K., Cafiero M., 2009. Exp. Appl. Acarol. (48), 3–10.

APERÇU DE LA PRESENCE DE VARIANTS DU VIRUS DE LA BRONCHITE INFECTIEUSE EN PRODUCTIONS AVICOLES EN FRANCE EN 2016, ET DONNEES DE PROTECTION VACCINALE

Blond Françoise¹, Boelm Gert-Jan², Gaillard Nathalie³, Vancraeynest Dieter⁴, Ledoux Anne-Laure³, Geerligs Harm⁴

¹ Zoetis ZA Le Haut Montigné, Torcé, 35370, France

² GD Animal Health, Arnsbergstraat 7, 7400 AA Deventer, Pays-Bas

³ Zoetis, Bâtiment VIVA, 10, Rue Raymond David, 92240 - Malakoff, France

⁴ Zoetis, Mercuriusstraat 20, B-1930 Zaventem, Belgique

Auteur de correspondance : francoise.blond@zoetis.com

RÉSUMÉ

La bronchite infectieuse (BI), maladie virale contagieuse des volailles de genre *Gallus*, est causée par un virus à ARN de la famille des Coronaviridés. La plasticité de son génome permet l'émergence régulière de variants du virus (IBV), pouvant alors échapper à la protection vaccinale des volailles.

Depuis 2002, Zoetis met un service de diagnostic moléculaire (RT-PCR qualitative) de la BI à disposition des prescripteurs d'Europe et du Moyen-Orient. Depuis 2014, ce service basé en France (35), recherche les variants pertinents de l'IBV, y compris les plus récents. Il a permis de réaliser près de 2 500 analyses en 2015. Sur le premier semestre de 2016, en France, près des trois quarts (73 %) des échantillons soumis provenaient de poulets de chair, un cinquième (19 %) de pondeuses, puis des poulets de chair label (3 %), et poulets de chair certifiés, reproducteurs chair ou ponte et pondeuses bio (1 % chacun). Le variant QX a été identifié dans 5,7 % des prélèvements (en production chair comme ponte), et peut être incriminé dans 4,1 % des cas (Ct précoce et/ou signes cliniques). Le variant 2 (IS/1494) n'a pas été mis en évidence. Le variant Q1, inclus plus récemment dans cette batterie des tests, n'a pas été identifié.

Pour évaluer le niveau de protection vaccinale offert par l'utilisation des vaccins vivants atténués Poulvac® IB H120 et Poulvac® IB QX à un jour d'âge, une épreuve virulente sur oiseaux EOPS a été réalisée avec ces variants, à trois semaines d'âge. Les taux de protection observés (tests de ciliostase réalisés 5 jours post-inoculation) étaient de 100%, 95 %, 80 % et 50 % vis-à-vis de la souche 793B et des variants QX, Q1 et 2, respectivement. Le niveau de protection obtenu pour d'autres associations de valences de vaccins du commerce sera discuté.

ABSTRACT

Overview of the presence of infectious bronchitis virus variant strains in the French poultry industry in 2016, and vaccine protection data

Infectious bronchitis (IB), a contagious viral disease of poultry of the *Gallus* species, is caused by an RNA virus, belonging to the *Coronaviridae* family. Its genome plasticity allows the regular emergence of variant viruses (IBV), which might evade vaccine protection.

Since 2002, Zoetis has been offering a molecular diagnostic service (qualitative RT-PCR) for IBV to poultry practitioners in Europe and the Middle-East. Since 2014, this service performed in France (35) routinely screens for the relevant IBV variants, including the most recent ones. In 2015, nearly 2,500 analysis were performed. Over the first semester of 2016, in France, nearly three quarters (73%) of the submitted samples were from broilers, one fifth (19%) from laying hens, 3% from free-range and certified broilers, while 1% were from broiler breeders, 1 % from laying breeders and 1 % from organic laying hens. The QX variant was identified in 5.7% of the samples (in broilers as well as in laying hens), and could be associated to 4.1% of the cases (early Ct and/or clinical signs). Variant 2 (IS/1494) was not found. The Q1 variant, more recently added to this assay, was not identified either.

In order to evaluate the level of vaccine protection achieved by the attenuated live vaccines Poulvac® IB H120 and Poulvac® IB QX delivered by eye-drop at day old, a challenge was performed on 3-week-old SPF chickens with these variants. The observed protection rates (ciliostasis tests performed 5 days post-inoculation) were 100%, 95%, 80% and 50% towards strain 793B and variants QX, Q1 and 2, respectively. The protection level achieved by another association of vaccines is discussed.

INTRODUCTION

Le virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) est l'un des virus respiratoires les plus prévalents dans les productions avicoles actuelles. Différents sérotypes sont décrits dans le monde, et le niveau de protection croisée produit par les vaccins du commerce vis-à-vis des différents sérotypes de l'IBV est fortement variable. En outre, la plasticité de son génome (ARN), alliée à ce degré variable de protection croisée expliquent pour partie l'émergence répétée de variants viraux, échappant au spectre de protection des vaccins disponibles. C'est dans une perspective de surveillance qu'un service de diagnostic centralisé a été mis en place pour l'Europe et le Moyen-Orient par Zoetis. En parallèle, des expérimentations explorent l'efficacité des vaccins existants sur des variants présents et/ou émergents en associant des vaccins vivants contre l'IBV dans un même protocole vaccinal. L'arrivée sur le marché de vaccins contre le variant QX, largement présent en Europe, permet aussi d'évaluer des protocoles associant un tel vaccin avec un autre plus classique (contre les souches de type Massachussetts) dans la protection contre de nouveaux variants, déjà détectés dans certains pays européens, et de permettre aux prescripteurs d'anticiper l'impact de tels variants s'ils devenaient présents dans la filière de leur pays.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Service diagnostic

Un service centralisé de diagnostic moléculaire de l'infection par le virus IBV a été mis en place par Zoetis à partir de 2002 auprès des prescripteurs en aviculture, pour l'Europe, le Proche- et le Moyen-Orient. Initialement dédié à la détection des génotypes dominants, ce service a progressivement été enrichi par la détection des variants majeurs du virus IBV ayant été décrits (par exemple apparition du variant QX-like en Europe dès 2004). La technique de RT-PCR qualitative en temps réel, avec des amorces sélectionnées sur une région du gène S1 de ce Coronavirus permet d'identifier les génotypes pertinents (OIE, 2012). La technique utilise des kits commerciaux et est appliquée aux écouvillons oropharyngés ou cloacaux. Parmi les génomes de variants récemment ajoutés à la batterie de tests RT-PCR réalisés de manière systématique sur les prélèvements reçus figurent :

- Le variant QX (Worthington, 2008)
- le variant 2 (ou Israël 2 – Susan, 2010),
- le variant Q1 (Toffan, 2001).

L'interprétation des résultats de RT-PCR se fait en confrontant les commémoratifs transmis par le prescripteur (en particulier sur le schéma vaccinal des oiseaux du lot et présence ou non de signes cliniques) aux résultats de PCR (valeur de Ct : précoce, moyen ou tardif). Un Ct précoce pour une souche vis-à-vis de laquelle il n'y a pas de valence vaccinale utilisée dans l'élevage, associé avec des signes cliniques évocateurs de bronchite infectieuse est compatible avec la circulation d'une souche de terrain. À l'inverse, un Ct tardif vis-à-vis d'une souche 793B dans un élevage où cette valence vaccinale a été utilisée est plus probablement indicateur de la détection de la souche vaccinale, et ce, en particulier, en l'absence de signes cliniques.

1.2. Essais de protection vaccinale

L'efficacité attendue de différentes associations de vaccins actuellement commercialisés vis-à-vis de variants QX, Q1 et variant 2, ainsi que de la souche 793B a été évaluée dans une série de quatre essais conduits en station expérimentale (GD, Deventer, Pays-Bas). Ces quatre essais ont été conduits en

conformité avec la monographie 0442 (section 2-4-3-1) de la Pharmacopée européenne et selon les conditions standards du site de recherche évitant toute contamination.

Dans chaque essai, 72 poussins d'un jour, de statut EOPS ont été tirés au sort pour inclusion dans l'un des 3 groupes expérimentaux (24 poussins par groupe), qui ont reçu une vaccination par goutte oculaire (0,05 ml) au jour de l'inclusion (J0), avec :

- le vaccin Poulvac® IB H120 et le vaccin Poulvac® IB QX (groupe P) ;
- les vaccins vivants d'une autre gamme reposant sur la souche Massachussetts (Ma5) et 4/91 (groupe N) ;
- aucun vaccin (groupe T).

Les oiseaux faisaient l'objet d'un examen clinique individuel au moins une fois par jour. Les anomalies cliniques (retard de croissance cloaque sale, écoulement oculonasal, dyspnée, toux et plumes ébouriffées) étaient notées individuellement et ont fait l'objet d'une compilation sur la période J0-J25.

Tous les opérateurs étant intervenus par la suite ont effectué les manipulations en aveugle vis-à-vis de la nature des vaccins utilisés pour chaque groupe.

Vingt jours plus tard (J20), ces groupes ont fait l'objet d'une épreuve virulente avec : soit le variant QX (10^4 log EID₅₀, voie oculaire 0,05 ml par oiseau), soit le variant Q1 10^5 EID₅₀ voie oculaire, 0,05 ml par oiseau soit le variant 2 10^5 EID₅₀ voie oculaire, 0,05 ml par oiseau soit la souche 793B (10^5 EID₅₀, voie oculaire, 0,1 ml par oiseau). Chaque oiseau a fait l'objet d'une notation individuelle pour les signes cliniques respiratoires, de 0 à 3 :

0 – Pas de respiration anormale

1 – Légers/rare râles trachéaux, entendus après avoir provoqué le déplacement du poulet

2 – Râles trachéaux modérés/fréquents, mais pas continus, entendus après avoir provoqué le déplacement du poulet

3 – Râles trachéaux marqués et continus

Les notes cliniques ont été additionnées pour chaque groupe dans chaque essai, et ont été analysées par le test non paramétrique de Kurskal-Wallis.

Cinq jours plus tard (J25), les oiseaux ont été sacrifiés (injection IV de pentobarbital sodique) et leur trachée a été prélevée. Le test de ciliostase, a été réalisé, en conformité avec la Pharmacopée Européenne, sur 20 sujets tirés au sort dans chaque groupe comprenant 24 animaux.

Brièvement, pour chaque trachée, 10 sections transversales (0,5 à 2 mm de large) ont été placées dans un milieu approprié, à 37° C puis ont été examinées en microscopie optique (40-100x). L'activité ciliaire a été notée pour trois sections de chaque partie (supérieure, moyenne et inférieure) de la trachée, pour chaque oiseau. Cette observation était réalisée dans les 2 h suivant le prélèvement ; la notation était de 0 si plus de 50 % d'une section présentait des mouvements ciliaires et de 1 si moins de 50 % en présentait. Un oiseau était considéré comme non affecté (protégé) si au moins 9 des 10 sections présentaient une activité ciliaire normale. Pour chaque oiseau, son statut (protégé ou non) a été déterminé, et pour chaque groupe, la note totale d'activité ciliaire (somme des notes individuelles) et le taux de protection (nombre de sujets protégés sur nombre de sujets inoculés) ont été calculés. Les différences de proportions d'oiseaux protégés entre les groupes (comparaisons par paires ont été réalisées entre les groupes vaccinés et non-vaccinés) ont été évaluées avec le test exact de Fischer.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Service diagnostic

Le service diagnostic a permis de réaliser près de 2 500 analyses en 2015, et à l'automne 2016, il était estimé que l'année porterait sur 2 000 échantillons analysés, venus d'Europe, et du Proche-orient.

Sur le premier semestre de 2016, en France, 130 échantillons ont été soumis par les prescripteurs et analysés. Moins d'un dixième (8/130) ont été trouvés négatifs pour le génome de l'IBV.

Près des trois quarts (73 %) de ces échantillons provenaient de poulets de chair, un cinquième (19 %) de poules, puis des poulets de chair label (3 %), et poulets de chair certifiés, reproducteurs chair ou ponte et poules bio (1 % chacun).

La souche 793B a été identifiée dans 77,1 % des prélèvements (94/122) ; dans un tiers de ces cas (33/94), sa présence était compatible avec la détection d'un virus vaccinal. Dans près de la moitié des cas (45/94), la confrontation des niveaux de Ct et des signes cliniques indiquait une présence compatible avec la circulation d'une souche du terrain.

Le variant QX a été identifié dans 5,7 % des prélèvements (7/122) en productions chair comme ponte, et peut être incriminé (Ct précoce et signes cliniques ou Ct précoce et contamination vaccinale non possible) dans 5 de ces cas 4,1 % des cas confirmant la présence de ce variant en France.

À l'automne 2016, le variant 2 n'avait pas été mis en évidence en France, ni dans la majorité des Etats membres de l'U.E.

Le variant Q1, inclus dans cette batterie de tests à l'été 2016, n'avait pas été identifié dans les prélèvements reçus.

À titre de comparaison, en Pologne et sur la même période, le variant QX a été détecté dans 39,3 % des prélèvements (valence absente des programmes vaccinaux) et le variant 2 dans 36,7 % d'entre eux, avec 12,0 % des prélèvements positifs pour les génomes des deux variants. Ces dernières données reposent sur l'analyse d'environ 50 échantillons mensuels, de bonne qualité (nombre négligeable d'échantillons inexploitable).

2.2. Essais de protection vaccinale

Sur les anomalies cliniques relevées sur la période J0-J25, il n'a pas été observé de différence d'occurrence entre les groupes vaccinés, qui ont tous deux présenté un nombre d'anomalies cliniques proche au sein d'un essai (voir le tableau 1). Toutefois, la compilation du nombre d'anomalies cliniques relevées dans les quatre études fait apparaître une moindre occurrence dans les groupes P. Bien que non traitées statistiquement, ces données suggèrent que la tolérance des vaccins vivants utilisés dans le groupe P est au moins aussi bonne que celle des vaccins utilisés dans le groupe N.

Sur la protection croisée vis-à-vis des quatre souches d'épreuve, les données d'activité ciliaire font clairement apparaître qu'il n'y a pas de différence de protection évaluée par le taux de

protection ou par la note totale d'activité ciliaire entre les groupes P et N (voir le tableau 2). Ces essais confirment que les deux associations vaccinales testées ont une efficacité préventive significative vis-à-vis des variants QX, Q1, variant 2 et de la souche 793B, et que cette efficacité n'est pas significativement différente dans les groupes P et N. Enfin, vis-à-vis du variant 2, les niveaux de protection obtenus, bien que significativement supérieurs à celui du lot non vacciné, ne sont pas satisfaisants.

Sur les notes cliniques relevées après l'épreuve virulente, il n'y avait pas de différence entre les groupes vaccinés et le groupe témoin négatif pour les épreuves virulentes avec les variants QX et variant 2, ni avec la souche 793B (voir le tableau 3), même si la note clinique totale est systématiquement plus élevée dans le groupe témoin négatif par rapport aux groupes vaccinés. Dans l'essai avec l'épreuve virulente à variant Q1, les deux groupes vaccinés présentent une note clinique totale significativement plus faible que le groupe témoin négatif. Il n'y a pas de différence pour la note clinique totale entre ces deux groupes P et N : les associations vaccinales testées ont une efficacité préventive comparable.

Vis-à-vis de la souche 793B et du variant 2, ces résultats sont en cohérence avec les niveaux de protection obtenus pour les mêmes associations de vaccins vivants et publiés fin 2016 (Bru, 2016).

CONCLUSION

L'activité diagnostique développée par Zoetis sur les virus de la bronchite infectieuse permet de disposer d'une indication de la présence et de la prévalence des variants de ce virus dans les pays concernés. Elle confirme la présence du variant QX et l'absence des variants Q1 et 2 en France.

Les essais de protection vaccinale montrent qu'en association deux vaccins vivants (l'un contre le variant QX et l'autre une souche Massachusetts-like) d'un même fabricant dans un programme vaccinal, il est possible d'obtenir un taux de protection élevé vis-à-vis des variants QX, Q1 et 793B, mais que le taux de protection vis-à-vis du variant 2 n'est satisfaisant pour aucune des deux associations vaccinales testées. Il n'y a pas de différence au regard des résultats de test de ciliostase ni du score clinique après épreuve virulente sur les oiseaux vaccinés par les deux protocoles testés, pour aucun des virus utilisés. Les deux associations vaccinales ont des performances comparables en termes de protection contre les souches actuellement présentes en France. En revanche, les signes cliniques relevés post-vaccination dans cet essai (analyse statistique non réalisée) semblent plus limités avec les vaccins de la gamme Poulvac®.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bru T., 2016. Av. Pathol., (published ahead of print) 7 p.
 OIE, 2012. In : Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres de l'OIE, 7^e éd., chapitre 2.3.2 (version de 2013)-
http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.03.02_AIB.pdf
 Pharmacopée européenne, 2005. Monographie n° 0442.
[http://library.njucm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/09_monographs_on_vaccines_for_veterinary_use/Avian%20infectious%20bronchitis%20vaccine%20\(live\).pdf](http://library.njucm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/09_monographs_on_vaccines_for_veterinary_use/Avian%20infectious%20bronchitis%20vaccine%20(live).pdf)
 Susan S., 2010. J. Am. Sci. (6), 669-675
 Toffan A., 2011. Vet. Rec. (169) 212-213. -
http://veterinaryrecord.bmj.com/content/169/8/212.2.full?ijkey=377ec91f04e6cf8da2327efb0523f67520e0a681&keytype2=tf_ipsecsha
 Wang Y. D., 1998. Chin. J. Anim. Quarant., (15), 1-3.
 Worthington K. J., 2008. Av. Pathol. (37) 247-257.

Tableau 1. Nombre d'anomalies cliniques observées entre la vaccination (J0) et l'épreuve virulente (J21) dans chacun des quatre essais.

Traitement	Retard de croissance	Cloaque sale	Écoulement oculonasal	Dyspnée	Toux	Plumes ébouriffées
Epreuve virulente à IB QX						
Groupe P	2	13	12	14	6	7
Groupe N	2	5	29	22	27	13
Témoin négatif	2		1			
Epreuve virulente à IB Q1						
Groupe P		23	39	29	49	3
Groupe N	8	14	41	25	55	9
Témoin négatif						2
Epreuve virulente à IB 793B						
Groupe P		11	21	6	61	13
Groupe N		70	14	11	54	11
Témoin négatif		18				
Epreuve virulente à variant 2						
Groupe P	8	2	12	1	12	3
Groupe N	9	61	17	18	67	7
Témoin négatif	9	9		2	5	4
Total quatre essais						
Groupe P	10	49	84	50	128	26
Groupe N	19	150	101	76	203	40
Témoin négatif	11	27	1	2	5	6

Tableau 2. Résumé des résultats de protection croisée des quatre essais, chez les poulets vaccinés avec les associations vaccinales (groupes P et N) à J0 et éprouvés à J21, par rapport au groupe témoin négatif (non vacciné).

Traitement	Taux de protection [¥]	Note de ciliostase totale
Epreuve à IB QX		
Groupe P	95% (19/20) ^B	10
Groupe N	90% (18/20) ^B	6
Témoin négatif	0% (0/20) ^A	200
Epreuve virulente à IB Q1		
Groupe P	80% (16/20) ^B	24
Groupe N	90% (18/20) ^B	21
Témoin négatif	5% (1/20) ^A	172
Epreuve virulente à IB 793B		
Groupe P	100% ^A	0
Groupe N	100% ^A	0
Témoin négatif	5% ^B	190
Epreuve virulente à IB variant 2		
Groupe P	50% ^A	80
Groupe N	50% ^A	76
Témoin négatif	0% ^B	199

¥ : Des lettres différentes en exposant dans une même colonne indiquent une différence statistiquement significative (P<0,05)

Tableau 3. Résumé des notes cliniques des quatre essais, chez les poulets vaccinés avec les associations vaccinales (groupes P et N) à J0 et éprouvés à J21, par rapport au groupe témoin négatif (non vacciné), sur les 5 jours suivant l'épreuve virulente.

Traitement	Note clinique				Total [¥]
	0	1	2	3	
Essai avec l'épreuve virulente à IB QX					
Groupe P	18	2	0	0	2 ^A
Groupe N	19	1	0	0	1 ^A
Témoin négatif	12	6	2	0	8 ^A
Essai avec l'épreuve virulente à IB Q1					
Groupe P	17	2	1	0	4 ^B
Groupe N	18	2	0	0	2 ^B
Témoin négatif	8	3	6	3	24 ^A
Essai avec l'épreuve virulente à IB 793B					
Groupe P	18	2	0	0	2 ^A
Groupe N	17	3	0	0	3 ^A
Témoin négatif	15	4	1	0	6 ^A
Essai avec l'épreuve virulente à IB variant 2					
Groupe P	16	3	0	1	6 ^A
Groupe N	13	7	0	0	7 ^A
Témoin négatif	11	5	4	0	13 ^A

¥ Des lettres différentes en exposant dans une même colonne indiquent une différence statistiquement significative (P<0,05)

REDUIRE L'USAGE DES ANTIBIOTIQUES DANS LA FILIERE PALMIPEDES GRAS : QUELS USAGES ET QUELS FACTEURS DE RISQUE ?

**Litt Joanna¹, Bonnaud Virginie¹, Le Bouquin Sophie², Souillard Rozenn², Paul Mathilde⁴,
Rousset Nathalie¹**

¹ITAVI, 7 rue du Faubourg Poissonnière, 75009 Paris, ²ANSES, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, UEBEAC, BP53, 22440 Ploufragan, ⁴INRA/ENVT, 23, Chemin des Capelles, 31076 Toulouse cedex

litt@itavi.asso.fr

RESUME

L'antibiorésistance est un problème de santé publique qui nécessite un usage raisonné des antibiotiques. Ceci implique de connaître les usages, de suivre leur évolution et d'identifier les facteurs de risque et leviers. Dans ce contexte, une enquête a été réalisée dans la filière palmipèdes à foie gras par l'ITAVI, l'ANSES et l'ENVT, dans le cadre d'un projet, financé *via* le plan Ecoantibio 2017, visant à prévenir et réduire l'utilisation des antibiotiques dans le jeune âge en élevage avicole. Celle-ci visait à 1. Réaliser un état des lieux des pratiques et caractéristiques des élevages 2. Acquérir des données complémentaires sur l'utilisation des traitements antibiotiques, ou non et 3. D'identifier les facteurs associés aux traitements pour proposer des leviers d'action et/ou moyens de prévention. 70 élevages en filière longue, tirés au sort, ont ainsi été enquêtés dans les principaux bassins de production d'avril à juin 2015. Cette étude a permis de mettre en évidence un certain nombre de pratiques à risque (proximité d'autre(s) élevage(s) avicole, multi-âges sur un même site, multi-espèces, faible utilisation des sas sanitaires, ...). Avec une part de 31 % des lots recevant au moins un traitement en élevage et des Index de Fréquence des Traitements Antibiotiques globalement inférieurs à 0,3 (0-21 jours et 0-12 semaines), les usages d'antibiotiques restent toutefois assez faibles dans la filière. Aucun antibiotique critique n'a par ailleurs été utilisé pour traiter les bandes considérées. Les facteurs associés aux traitements antibiotiques portent essentiellement sur les mesures d'hygiène et de biosécurité, la vaccination et la qualité de l'eau. Ces résultats restent à compléter mais ils ouvrent déjà des pistes importantes à intégrer dans la stratégie à mettre en œuvre afin de réduire l'usage des antibiotiques. La biosécurité étant au cœur de l'actualité dans la filière, l'évolution à venir des systèmes de production dans ce domaine devrait logiquement avoir un effet de diminution de l'utilisation d'antibiotiques.

ABSTRACT:

Reduction of antibiotics use in foie gras production : Actual uses and risks factors associated

Antimicrobial resistance is a health problem that requires careful use of antibiotics. This involves knowing the uses, monitoring their evolution and identifying the risk factors and levers. In this context, a survey, aiming to reduce antibiotics use in poultry farming especially during start-up and financed by the Ecoantibio 2017 plan, was carried out by ITAVI, ANSES and ENVT for foie gras production. The aim was to: 1. Conduct an inventory of breeding practices and intrinsic characteristics of breeding workshop 2. Acquire data on the use of antibiotic and non-antibiotic treatments, 3. Identify factors associated with treatments in order to propose actions and / or prevention means to reduce antibiotics use. 70 long track breeding lots were surveyed in the main foie gras production areas from April to June 2015. This study revealed a lot of risky practices (other(s) poultry farm(s) in the vicinity, multi-ages on the same site, multi-species, low use of sanitary huts, ...). With a share of 31% of the batches receiving at least one treatment and Antibiotic Treatment Frequency Indexes globally lower than 0.3 (0-21 days and 0-12 weeks), antibiotics uses appears quiet low for this production. No critical antibiotics have been used to treat the animals followed during the study. Factors associated with antibiotic treatments focus on hygiene and biosafety precautions, vaccination and water quality. These results remain to be complemented, but they already open improvement tracks which can be integrated into the strategy implemented to reduce antibiotics use. Since biosafety is at the heart of current developments for this production, the future evolution of breeding systems should logically have an effect of decreasing the use of antibiotics.

INTRODUCTION

L'antibiorésistance est un problème de santé publique qui concerne la médecine humaine et vétérinaire. Elle conduit ainsi chez l'Homme à des échecs thérapeutiques qui engendreraient tous les ans plus d'1,5G€ de dépenses supplémentaires de santé (Centre d'analyse stratégique, 2012) et près de 25 000 décès en Europe (ECDC, EMEA, 2009). La menace est donc réelle, d'où une volonté de mieux raisonner l'usage des antibiotiques. La préservation de la santé humaine et la protection des écosystèmes constituent en outre des objectifs de durabilité importants assignés aux ateliers d'élevage (Forthun-Lamothe *et al.*, 2011a). Dans ce contexte, le Ministère de l'Agriculture a élaboré un plan prévoyant l'usage raisonné des antibiotiques. Celui-ci fixe des objectifs quantitatifs (-25% des usages vétérinaires en 5 ans), et qualitatifs (moindre recours aux antibiotiques critiques). Ceci implique de connaître les usages, de suivre leur évolution et d'identifier les facteurs de risque et leviers.

La filière palmipède dispose de peu d'informations relatives à ses usages d'antibiotiques. Les données issues du projet CASDAR Cunipalm (2010-2013), indiquent, pour les 147 fermes suivies en 2010, une part de lots traités de 16% en élevage et 1% en gavage, et des IFTA (Index de Fréquence des Traitements Antibiotiques) de 0,11 et de 0,04 (0,22 et 0,54 pour les seuls lots traités). L'IFTA, qui reflète l'intensité d'utilisation des antibiotiques, correspond au nombre de molécules à dose homologuée reçues par animal et par jour durant une période de référence (Lamothe *et al.*, 2011b). Si les deux phases n'ont pas du tout la même durée (80-100 vs. 10-12 jours), l'écart observé s'explique surtout par les temps d'attente à respecter et le déclassement des lots traités. Les animaux sont aussi plus âgés.

Afin de disposer de données sur les niveaux d'utilisation d'antibiotiques, les périodes critiques et les motifs de traitements en aviculture, un observatoire a été mis en place en 2014 (RefA²vi). Les pratiques à risque et les leviers d'action permettant de réduire leur usage restent toutefois à investiguer. A cette fin, une enquête a été réalisée dans la filière palmipède en 2015. Celle-ci visait à 1. Réaliser un état des lieux des pratiques et caractéristiques des élevages pouvant constituer des facteurs de risque, en particulier dans le jeune âge 2. Acquérir des données complémentaires sur l'utilisation des traitements et 3. D'identifier les facteurs associés aux traitements pour proposer des leviers d'action et/ou moyens de prévention.

1. MATERIEL ET METHODE

1.1 Questionnaire d'enquête

L'enquête a porté sur un échantillon d'élevages représentatifs de la filière, en ciblant la phase de démarrage et le transfert des animaux. Un questionnaire large et précis a été soumis à chaque éleveur (emploi de Sphinx Plus²), accompagné d'un relevé des traitements réalisés et de leurs modalités. Les questions fermées ont été privilégiées, celles à choix multiples minimisées, de même que les questions subjectives. Les réponses pouvaient être quantitatives ou qualitatives. Ont été abordés les champs suivants : 1. Description de l'exploitation : productions alentours et sur site, accès... 2. Informations sur l'atelier : parc bâtiment, productivité... 3. Biosécurité : utilisation d'un sas, lutte contre les nuisibles, organisation du site... 4. Gestion des intrants et sortants : fumier, eau... 5. Conduite du démarrage et transfert : structure des bâtiments, densité... 6. Traitements réalisés : âge, symptômes, molécules utilisées... Les parties 1 à 3 étaient génériques à l'élevage alors que les parties 4 à 6 se référaient à la bande en cours lors de la visite.

L'enquête a été réalisée d'avril à juin 2015 en 2 étapes : une visite de l'élevage (2h) après transfert des animaux (5 à 7 semaines d'âge), pour collecter les données de cette période, et un bilan téléphonique avec l'éleveur en fin de lot, pour compiler les données liées aux traitements administrés post-visite. De fait, seuls des éleveurs assurant toutes les étapes d'élevage (démarrage, croissance, finition), majoritaires dans la filière, ont été suivis.

1.2. Echantillonnage

Les élevages ont été choisis de façon aléatoire, indépendamment de leur utilisation d'antibiotiques. 70 élevages en filière longue ont ainsi été tirés au sort à l'aide d'une procédure aléatoire parmi une liste de 579 élevages, respectant les critères d'inclusion et mettant en place des lots durant la période d'enquête (semaines 9 à 18), constituée à partir des données transmises par 12 organisations de production. Les principaux bassins de production (Ouest, Sud-ouest) ont été considérés, nous garantissant une bonne représentativité de l'étude à l'échelle nationale. Une vérification a été effectuée *a posteriori* afin de valider la cohérence entre la part d'élevages tirés au sort par département et organisation, comparée à leur représentation dans la liste globale.

1.3. Traitement des données

1.3.1. Variables explicatives

Les données saisies ont fait l'objet d'une vérification attentive et d'un prétraitement afin de regrouper certaines variables. Cette étape achevée, une analyse descriptive des résultats a été réalisée

pour caractériser la population enquêtée. L'enquête épidémiologique visant à identifier les facteurs associés aux traitements, certaines variables ont été supprimées : celles non discriminantes (même réponse pour la quasi-totalité des éleveurs), celles jugées peu fiables (subjectives, imprécises ou mal comprises) et celles avec plus de 20% de données manquantes (conditionnelles ou mal renseignées). Un dernier tri a enfin été réalisé par l'étude des liens entre variables (tests du Chi² pour les variables qualitatives et corrélations (Spearman) pour les variables quantitatives non liées aux traitements). Certaines variables ont ainsi été supprimées.

1.3.2. Variables à expliquer

Plusieurs variables caractérisent l'utilisation d'antibiotiques mais toutes ne sont pas pertinentes à conserver comme variables à expliquer. C'est le cas des variables qualitatives ou conditionnelles. Ont ainsi été conservés pour la suite de l'analyse :

- Le nombre de traitements et de principes actifs
- La durée moyenne de traitement en jours
- L'IFTA
- La mortalité 0-15 jours qui traduit une fragilité des animaux et/ou des problèmes précoces.

Ces variables, sauf la dernière, sont déclinables sur la période 0-21 jours ou 0-12 semaines.

1.3.3. Facteurs associés aux traitements

Afin d'identifier les facteurs associés aux usages d'antibiotiques, nous avons effectué des tests d'association et des analyses multidimensionnelles (Analyse en Composantes Principales (ACP) et Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)) avec le logiciel R. Les tests d'associations (Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis) ont été réalisés en croisant les variables explicatives avec la variable IFTA 0-12 semaines, cette variable étant :

- quantitative, continue et synthétique ;
- parlante et facile à calculer ;
- la plus discriminante entre les élevages.

Seules les variables présentant une probabilité inférieure à 0,30 ont été conservées. A partir du nouveau fichier de données (23 variables quantitatives ; 51 qualitatives), nous avons réalisé une ACP avec pour données contributives les données liées à l'utilisation d'antibiotiques. Celle-ci a été suivie d'une CAH puis d'une caractérisation des classes (test des proportions), en utilisant les packages Factominer et Factoshiny. Les autres variables quantitatives ont été paramétrées en variables supplémentaires non contributives. Les écarts de niveau d'utilisation d'antibiotiques selon les clusters formés ont été vérifiés (test de Kruskal-Wallis et comparaison 2 à 2 *via* la fonction Kruskalmc du package Pgrmess).

2. RESULTATS

2.1. Informations générales sur les élevages

Les mises en place se sont étalées de février à mai 2015, avec un pic en mars-avril (89% des bandes), soit une période pluvieuse plutôt critique d'un point de vue sanitaire. Les visites ont logiquement eu lieu 5 à 7 semaines plus tard, soit d'avril à juin.

La majorité des élevages enquêtés produisent sous signe officiel de qualité (Indication Géographique Protégée (IGP) 80% ; Label Rouge 4%). Les ateliers enquêtés sont plutôt récents (40% ont moins de 10 ans, 31 % moins de 20 ans). 60% des élevages présentent d'autres productions avicoles dans leur voisinage (canards 54%, poulets/dindes ou cailles 30%, pintades 6%), 29% réalisent aussi le gavage de tout ou partie de leurs canards et 10% produisent de façon conjointe du Gallus (chair 8,6% ; ponte 1,4%). Ces élevages sont aussi très différents en termes de taille et d'organisation. La production moyenne annuelle est ainsi de 36 600 PAG par an ($\pm 19\,700$) conduits en 8,1 bandes ($\pm 3,5$). 80% des élevages sont organisés avec l'ensemble des bâtiments sur un seul site mais seuls 16% d'entre eux ont une conduite en bande unique. Une majorité d'élevages (74%) conduisent ainsi plus d'un lot par site, généralement 2 ou 3 en simultané (âges différents). En termes de main d'œuvre, 59% des exploitations sont organisées avec du personnel dédié à l'atelier palmipèdes. 26% des éleveurs réalisent de l'entraide régulièrement, la plupart en élevage avicole (16/18).

2.2. Biosécurité : des manquements mis en avant

L'enquête a mis en avant certaines pratiques susceptibles d'avoir des conséquences sanitaires importantes. Ainsi, si une majorité d'élevage (65/70) possède un, voire 2 sas (sas poussinière + sas central), il existe une grande disparité d'équipements et d'utilisation (Figure 1). Le changement de bottes ou l'utilisation systématique d'un pédiluve avant entrée en poussinière concerne 44% des éleveurs. Les changements systématiques de tenues concernent 10% d'entre eux.

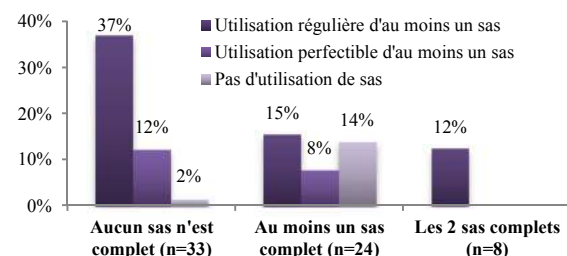


Figure 1 : Nombre de sas et utilisation réelle dans les élevages (n=65)

Le recours au personnel extérieur concerne 66% des éleveurs. 54% font appel à des équipes lors du démarrage (vaccination), malgré des incertitudes

sur la propreté de leur tenue, voire l'absence de changement de tenue à l'arrivée (près de 40% des cas). Une plus faible part a recours à de la famille et/ou amis (16%), qui ne se changent pas pour 2/3 d'entre eux, voire de l'entraide (6%). Les visiteurs s'équipent (chaussures et/ou de tenues) dans 60% des cas à leur arrivée dans l'élevage mais souvent sur leur propre initiative, la plupart des élevages ne disposant pas des équipements nécessaires sur place. En termes d'intrants et sortants, si l'abreuvement en démarrage est assuré *via* l'eau du réseau dans plus de 2/3 des cas, l'eau de forage reste utilisée malgré bien souvent de mauvais résultats d'analyses bactériologiques. Quelques sites ne ramassent et/ou ne stockent pas correctement les cadavres. Le camion d'équarrissage entre dans près d'1/3 des élevages, et peu d'entre eux prennent soin de désinfecter correctement le bac d'équarrissage. Le stockage du fumier s'effectue dans 18% des cas à moins de 50m de la poussinière et 19% épandent à moins de 500m de ce même bâtiment. Une part d'éleveurs réalise enfin une procédure de nettoyage désinfection incomplète (absence d'au moins une des 2 étapes). Le prêt de matériel concerne 3 élevages.

2.3. Traitements réalisés

31% des bandes suivies (22/70) ont eu recours aux antibiotiques en élevage (0-12 semaines). Ces chiffres sont cohérents avec ceux collectés *via* le projet RefA²vi en 2014 qui fait état de 32 % de lots déclarant au moins un traitement en élevage de palmipèdes (échantillon de 30 lots). Parmi celles-ci, 50 % des lots ont été traités durant la période de démarrage (avant 3 semaines), 50% au moment du transfert (avant 6 semaines) et 36% entre 6 et 9 semaines. Ces usages sont liés à des symptômes non spécifiques (54% des cas), la mortalité (18%), et les troubles respiratoires, locomoteurs ou rénaux intervenants chacun respectivement dans 9% des cas. L'utilisation d'antibiotiques est souvent combinée à d'autres traitements (huiles essentielles, vitamines, ...). 68% des éleveurs ayant eu recours aux antibiotiques ont ainsi utilisé un autre traitement, contre 35% des éleveurs n'y ayant pas eu recours (χ^2 significatif). L'étude révèle par ailleurs un nombre moyen de traitements par lot de $0,62 \pm 1,07$, avec un maximum de 4 traitements (1 lot). Aucun antibiotique critique n'a été utilisé sur les lots suivis dans l'enquête. Ont ainsi principalement été utilisés (en % de citation, pour les 22 lots traités) : des Bêta-lactamines (64%), des Diaminopyrimidines (50%) et des Sulfamides (41%). Le recours aux Tétracyclines et Polypeptides apparaît plus rare (respectivement 23% et 9%).

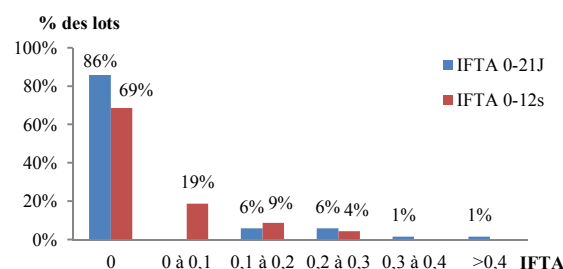


Figure 2 : Répartition des IFTA obtenus pour les différentes périodes (0-21 jours/0-12 semaines)

Pour les lots traités, l'âge moyen au 1^{er} traitement est de 24,0 jours ($\pm 15,7$) et l'âge moyen des traitements du lot de 27,3 jours ($\pm 15,8$), traduisant un usage précoce mais plutôt post-démarrage (après transfert). La durée moyenne de traitement est de 4,3 jours ($\pm 1,3$). Les IFTA 0-21 jours et 0-12 semaines restent faibles (Figure 2) et inférieurs à 0,3 sauf pour 2 éleveurs (0,38 et 1,00 sur la période 0-21 jours).

2.4. Facteurs associés aux traitements

Les probabilités des tests d'association réalisés entre chaque variable qualitative et la variable «IFTA 0-12 semaines» sont présentées en Figure 3. L'ACP réalisée à partir des données quantitatives liées à l'utilisation d'antibiotiques (non présentée) met en évidence 2 groupes de variables formant un angle de près de 90° et donc peu liées : l'un lié à une utilisation précoce d'antibiotiques (0-21 jours) ; l'autre lié à une utilisation plus tardive (0-12 semaines), notamment autour du transfert. Une CAH a ainsi été réalisée à partir des coordonnées des élevages dans l'ACP précédente, afin d'approfondir l'analyse. Les classes formées discriminent ainsi les élevages selon leur utilisation d'antibiotiques, ce que l'on peut vérifier d'un point de vue statistique (Tableau 1). Trois classes distinctes ont été formées à partir de la méthode de Ward (évaluation des distances entre groupes).

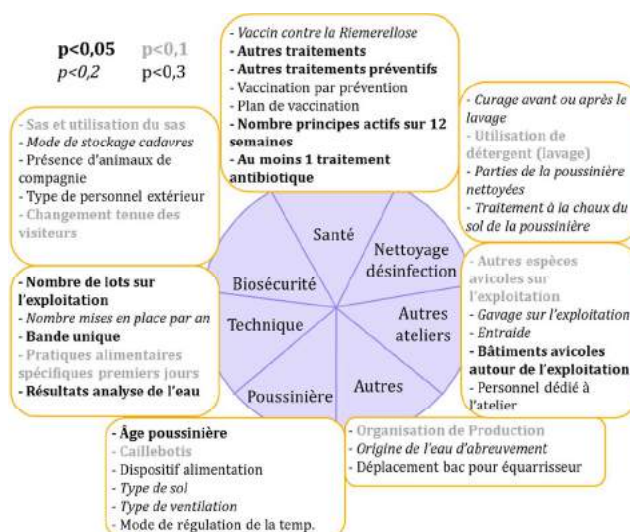


Figure 3 : Variables qualitatives conservées dans l'analyse multidimensionnelle et p associée

Le cluster 1 correspond ainsi aux élevages n'ayant pas eu recours aux antibiotiques, le cluster 2 à ceux ayant traité autour de la période de transfert et le cluster 3 à ceux ayant traité en démarrage. La caractérisation des classes formées nous donne des informations quant aux typologies d'élevage sous-jacentes. Le cluster 1 se compose ainsi davantage d'élevage multi-espèces, rigoureux en terme de biosécurité (tenue visiteurs, lavage poussinière, sas). Ces élevages tendent également plutôt à avoir de bons résultats d'analyse d'eau. Le cluster 2 tend à être composé d'élevage avec des bandes plus grandes que la moyenne, entourés d'autres élevages mais ne respectant pas tous les principes de biosécurité (sas, tenue des visiteurs), et présentant davantage de mauvais résultats d'analyses d'eau. Ces éleveurs traitent, en combinant antibiotiques et autres traitements. La région Midi-Pyrénées apparaît sur représentée dans ce groupe qui rassemble aussi les éleveurs ne vaccinant pas contre la Riemerellose. Le cluster 3 réunit des éleveurs desserrant tard et démarrant dans de petits bâtiments, sans sas. Ce groupe tend à moins vacciner et à utiliser rarement des détergents. L'entraide y est aussi surreprésentée.

Tableau 1 : Niveau d'utilisation d'antibiotiques selon les clusters formés (Kruskal-Wallis)

Facteur testé	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	p
Nombre PA 0-21 jours	0,00a	0,08a	1,44b	***
IFTA 0-21J	0,00a	0,02a	0,32b	***
Nombre TA 0-12 semaines	0,00a	1,46b	1,22b	***
Nombre PA 0-12 semaines	0,00a	2,15b	1,78b	***
Durée moyenne de traitement (en J) 0-12 semaines	0,00a	4,51b	4,00b	***
IFTA 0-12 semaines	0,00a	0,12b	0,09b	***

PA : principes actifs, TA : traitements antibiotiques par classe ;
***p < 0,001, ab : les moyennes affectées de lettres différentes diffèrent significativement

3. DISCUSSION

Cette enquête, bien que portant sur un échantillon restreint et sur une seule saison, a permis d'acquérir des données relatives à l'utilisation d'antibiotiques dans la filière et aux pratiques pouvant constituer des facteurs de risque. Avec des valeurs moyennes d'IFTA de l'ordre de 0,03 à 0,04, la filière a assez peu recours aux antibiotiques. Ces faibles index pourraient s'expliquer par une bonne robustesse des animaux, voire une certaine résistance aux maladies, la sortie des animaux sur parcours où les densités restent faibles induisant moins de pression sanitaire qu'en bâtiment fermé, ou encore une durée d'élevage longue permettant l'acquisition d'une

bonne immunité. L'enquête a pourtant montré le cumul d'un certain nombre de pratiques à risque impactant l'utilisation d'antibiotiques (proximité d'autre(s) élevage(s) avicole(s) dans 60% des cas, multi-âges sur un même site dans ¾ des cas, élevage multi-espèces dans 10% des cas, faible utilisation et mauvaise utilisation des sas...). Les résultats vont dans le même sens que ceux obtenus dans la filière cunicole. Chauvin *et al.* (2011) ont en effet montré une grande variabilité des usages et identifié des facteurs associés : l'encadrement technique et les mesures d'hygiène et de biosécurité apparaissent comme des leviers d'action primordiaux. Ils n'expliqueraient toutefois que 50% de la variabilité observée, soulignant l'importance du facteur humain (d'où le besoin de bien communiquer auprès des éleveurs). L'utilisation d'antibiotiques dans les élevages cunicoles est ainsi notamment influencée par des déterminants contextuels (niveau de revenus, activité(s) de l'exploitation) et transactionnels (stress perçu et contrôle perçu ; Le Bouquin *et al.*, 2013).

CONCLUSION

Les résultats présentés ici, bien qu'à compléter, permettent de faire un premier état des lieux à t0 des pratiques pouvant influencer l'usage d'antibiotiques durant la phase d'élevage des palmipèdes à foie gras. Ils permettent aussi de compléter les données issues du projet RefA²vi. Si les usages restent assez faibles dans la filière, avec aucun antibiotique critique utilisé par notre échantillon d'éleveur sur les lots suivis, cette étude a permis de mettre en évidence certaines pratiques à risque et de souligner l'importance du respect des mesures d'hygiène et de biosécurité, mais aussi de la vaccination et de la qualité de l'eau lors du démarrage et du transfert. Ils ouvrent ainsi des pistes importantes à intégrer dans la stratégie de démedicalisation à mettre en œuvre. La biosécurité étant au cœur de l'actualité dans la filière, l'évolution des systèmes de production dans ce domaine devrait logiquement avoir un effet de diminution de l'utilisation d'antibiotiques. La gestion de l'ambiance en canetonnière apparaît comme un autre point important à investiguer, la profession faisant état de troubles respiratoires précoces pouvant conduire à l'utilisation d'antibiotiques, en lien avec des difficultés de gestion de l'ambiance.

Remerciements : Les auteurs remercient les organisations et producteurs ayant participé à l'étude. Celle-ci a été réalisée dans le cadre de l'UMT Sanivol et financée par la DGAL.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Centre d'analyse stratégique, 2012. Note d'analyse n°299, novembre 2012.
- Chauvin C., Croisier A., Tazani F., Balaine L., Eono F., Huneau-Salaun A., Le Bouquin S. 2011, 14èmes JRC.
- Forthun-Lamothe L., Coutelet G., Litt J., Dejean S., Gurlain S., Chabbert E., Gidenne T., Combes T., 2011. 14èmes JRC, 139-142.
- Forthun-Lamothe L., Courtadon H., Croisier A., Gidenne T., Combes S., Le Bouquin S., Chauvin S., 2011. 14èmes JRC, 135-138.
- Le Bouquin S., Rouxel G., Mihoc E. , Chauveau V., Terrade F., Chauvin C., 2013, 15èmes JRC, 115-120.

FACTEURS INFLUENCANT L'UTILISATION D'ANTIMICROBIENS EN AVICULTURE : UNE ENQUETE CAS-TEMOIN EN FILIERE POULETS DE CHAIR LABEL ROUGE.

Adam Cécile^{1,2,3}, Fortané Nicolas¹, Coviglio Alexandra², Delesalle Léa², Ducrot
Christian³, Paul Mathilde²

¹INRA, UR1323 RiTME, 65 boulevard de Brandebourg, 94025 Ivry Sur Seine Cedex, France

²ENVT, INRA, UMR 1225 IHAP, ENVT, 23 chemin des Capelles, 31076 Toulouse, France

³INRA, UR346 Epidémiologie Animale, Theix, 63122 Saint Genès Champanelle

cecile.adam@inra.fr

RESUME

Une enquête cas-témoin a été menée en 2016 pour déterminer les facteurs liés à l'usage d'antimicrobiens en période de démarrage en claustration dans la filière poulets de chair Label Rouge en France. Cette filière est déjà engagée dans une démarche volontariste de réduction des antimicrobiens. Au total, 52 lots « cas » traités avec des antimicrobiens entre 0 et 42 jours et 208 lots témoins, non traités, ont été tirés au sort en appariant sur l'organisation de production et la date de mise en place. Les questionnaires ont été administrés en élevage.

Une analyse par régression logistique a permis de mettre en évidence les variables significatives ($p < 0,05$). Pendant les 10 premiers jours, la perception d'une mortalité significative par l'éleveur est associée à une augmentation du risque de traiter (OR= 10,55; IC95%= [1,63;68,28]), tout comme les appels téléphoniques entre éleveur et technicien entre 11 et 42 jours (OR= 6,25; IC95%= [2,21;17,66]). L'utilisation de papier démarrage (OR= 0,21; IC95%= [0,06;0,71]) et de produits phytothérapeutiques en prévention (OR= 0,09; IC95%= [0,01;0,58]) est associée à une diminution du risque.

A côté de facteurs techniques sur lesquels agir pour améliorer la santé des poulets, la perception de l'importance du taux de mortalité par l'éleveur apparaît être un facteur déterminant de l'usage d'antimicrobiens.

ABSTRACT

A case-control study of the risk factors for the use of antimicrobials in traditional free-range broiler breeding

In order to determine the risk factors for the use of antimicrobials in traditional free-range broiler breeding a case-control study was carried out in 2016. This production has been engaged in a voluntary process of reducing the use of antimicrobials. 52 cases – flocks having received at least one antimicrobial treatment between day 1 and 42 - and 208 controls – untreated flocks – were randomly selected and matched on farmer organization and chick placement date. All the data were collected thanks to on-farm questionnaires.

Analysis was conducted by multivariable logistic regression. During the first 10 days period, the farmer perception that the mortality rate in the flock is not low was associated with an increase in the risk of treatment (OR= 10.55; IC95%= [1.63; 68.28]). During the 11-42 days period, phone calls between the farmer and his technician (OR= 6.25; IC95%= [2.21; 17.66]) was a risk factor. Using chicken paper topped with starter feed (OR= 0.21; IC95%= [0.06; 0.71]) and herbal drugs as a prophylaxis (OR= 0.09; IC95%= [0.01; 0.58]) were associated with a decreased risk of antimicrobial treatment.

Understanding the use of antimicrobials needs to consider technical factors, but also the way the farmer perceive mortality rate in his flock.

1. INTRODUCTION

La lutte contre l'antibiorésistance, à présent reconnue comme un problème public mondial majeur, passe par l'utilisation raisonnée des antimicrobiens. Diminuer leur utilisation est ainsi un défi pour l'agriculture, en particulier pour les productions animales hors sol, dont les espèces figuraient en 2013 en France parmi les plus exposées aux antimicrobiens (Chevance & Moulin 2014). L'identification d'éventuels leviers d'action est un préalable à la modification des pratiques en antibiothérapie. Des études épidémiologiques menées en élevages de porcs ont ainsi permis de mettre en évidence l'importance de facteurs techniques (van Rennings et al. 2015), (Arnold et al. 2016) (Hybschmann et al. 2011), mais également la nécessité de prendre en compte des facteurs socio-économiques (van der Fels-Klerx et al. 2011), (Casal et al. 2007). Une étude menée au Royaume Uni en élevage de poulets standard a souligné l'importance des politiques menées par les organisations de production en matière de prophylaxie et de la gestion de l'élevage (Hughes et al. 2008). En France, Chauvin et al. (2005) ont montré que le respect de règles de biosécurité comme le changement de chaussures et de tenue était associé à une utilisation plus faible d'antibiotiques en élevage de dindes. Cet article décrit une étude cas-témoin menée en France en 2016 en élevage de poulets de chair Label Rouge, visant à identifier les facteurs associés à l'utilisation d'antimicrobiens. Cette filière, déjà engagée dans une démarche d'utilisation raisonnée des antimicrobiens, a été peu étudiée jusque-là.

2. MATERIEL ET METHODE

2.1 Définition de l'échantillon

Neuf organisations de production (OP) basées dans le Grand Ouest, le Sud-Ouest et le Centre de la France ont été sollicitées pour participer à l'enquête. Les poulets de chair Label Rouge, élevés pendant une durée minimale de 81 jours, passent leurs 42 premiers jours en claustration, avant d'avoir accès à un parcours extérieur. Dès leur sortie, les conditions d'élevage sont modifiées, tout comme les facteurs de risque des traitements antimicrobiens. Par ailleurs, la majorité des traitements antimicrobiens sont faits avant 42 jours en élevage de poulets Label. L'étude a donc été menée sur la période d'élevage en claustration entre

0 et 42 jours. Les lots tirés au sort ont été mis en place entre décembre 2015 et avril 2016. Un cas a été défini comme un lot ayant reçu au moins un traitement antimicrobien entre 0 et 42 jours, et un témoin comme un lot n'ayant reçu aucun traitement antimicrobien sur la même période. Au vu du faible nombre de traitements administrés dans la filière, le ratio témoins/cas a été porté à 4:1. Cette taille d'échantillon permet de mettre en évidence un OR de 2,5 dans un échantillon où 20 % des témoins sont exposés, avec une puissance de 80% et un taux d'erreur de 5%. Les cas ont été sélectionnés de manière exhaustive parmi les lots traités identifiés dans les logiciels clients des vétérinaires traitants, ou rapportés par les OP directement. Les témoins ont été tirés au sort dans les plannings de mise en place, et appariés aux cas sur l'OP et la date de mise en place.

Un tract présentant l'étude a été mis à disposition des OP et de leurs techniciens afin de leur servir de support de communication auprès de leurs adhérents. Les questionnaires ont été administrés en exploitation entre février et juin 2016, par un des trois enquêteurs formés pour l'enquête. Les visites se faisaient avant le départ du lot enquêté pour l'abattoir afin de limiter les biais de mémoire des enquêtés. Le questionnaire, testé au préalable, comportait 11 rubriques, dont les deux premières permettaient de décrire le profil de l'enquêté ainsi que son exploitation. La suite du questionnaire s'intéressait au lot enquêté et à sa gestion : la biosécurité, les bâtiments, l'hygiène, le déroulement des visites aux animaux, la perception par l'éleveur de la santé du lot, les problèmes de santé, les traitements et la prophylaxie.

2.2 Analyse statistique

Les questionnaires ont été entrés dans une base de données Access, puis analysés avec le logiciel R. Une analyse univariée par régression logistique a été menée – la variable à expliquer étant l'occurrence ou non d'un traitement antimicrobien – et les variables explicatives dont la valeur de p était inférieure à 0,25 ont été retenues. Un test du chi-deux a permis d'identifier les variables corrélées, et dans ce cas n'ont été conservées que les variables les plus significatives et/ou biologiquement pertinentes pour la régression multiple. Un modèle multiple a été construit, puis une sélection par le critère d'Akaike a permis d'aboutir au modèle final. L'appariement sur l'OP a été pris en compte en forçant cette variable sous la forme d'un effet fixe dans le modèle final (Dohoo et al. 2009).

3. RESULTATS

3.1 Description de l'échantillon

Sur les 8 OP ayant accepté de participer, 7 ont signalé des traitements antimicrobiens, permettant d'obtenir un échantillon de 52 cas et 208 témoins. Sur les 325 éleveurs contactés, 19 (5,8%) ont refusé de participer et 18 (5,5%) n'ont pas été joignables. Les refus ont été motivés en grande partie par un manque de temps et ont concerné en majorité des lots témoins.

58% des éleveurs avaient entre 40 et 55 ans, 72% d'entre eux étaient des hommes, et les éleveurs avaient entre 1 et 4 bâtiments. 90% des lots enquêtés ont été élevés dans des bâtiments de 400 m², et 10 % dans des cabanes mobiles. Pour la moitié des élevages enquêtés, l'atelier poulet Label représentait moins de la moitié du revenu total de l'exploitation. Ainsi, 90% des exploitations avaient également des cultures, et 50% un autre atelier d'élevage. Concernant l'atelier avicole, la moitié des éleveurs avaient exclusivement du poulet Label Rouge, 9% d'entre eux élevaient également du poulet standard et 12% avaient un atelier palmipède en 2015. L'atelier Label représentait plus de 75% du revenu total de l'exploitation pour 25% de l'échantillon.

3.2 Modèle de régression logistique

Sur la centaine de variables explicatives testées en régression logistique univariée, 48 avaient une p-value inférieure à 0,25. Après retrait des variables trop corrélées entre elles, 26 variables explicatives ont été insérées dans le modèle multiple. Quatre variables se sont avérées significativement associées à la probabilité de traitement dans le modèle final. Deux variables sont associées à une réduction du risque de traiter : l'utilisation de produits phytothérapeutiques en préventif (Odds-ratio (OR)= 0,09; IC95%= [0,01;0,58]) et l'utilisation de papier démarrage (OR= 0,21; IC95%= [0,06;0,71]). Deux variables sont associées à une augmentation du risque de traiter : la perception de la mortalité cumulée à 10 jours comme « normale » (OR= 10,55; IC95%= [1,63;68,28]) ou « élevée » (OR=8,48, IC95= [0,95; 75,48]) par rapport à « faible » et un appel téléphonique entre l'éleveur et le technicien entre 11 et 42 jours (OR= 6,25; IC95%= [2,21;17,66]) tant pour une visite de routine que dans le cadre d'un problème en élevage.

4. DISCUSSION

4.1 Matériel et méthode

Le bon taux de participation est à relier à un fort investissement des OP dans l'étude, ainsi qu'à l'intérêt des professionnels pour le sujet.

Concernant le recrutement des cas, en dépit d'un protocole de recensement des traitements adapté à chaque OP, il a été d'une efficacité très hétérogène selon les OP. La vérification systématique sur l'exploitation des informations concernant le lot a permis de détecter quelques « faux témoins » et de rares « faux cas ». En effet des reliquats de traitements pouvaient avoir été utilisés sans ordonnance et des traitements prescrits pouvaient ne pas avoir été administrés. Cette phase de vérification était parfois compliquée car les éleveurs n'identifient pas toujours la classe thérapeutique des produits administrés, oublient parfois avoir administré le produit, notamment lorsque plusieurs personnes s'occupent du lot. Toutefois ce biais lié à l'échantillonnage n'a pas eu de conséquence sur la validité de l'enquête, grâce à l'appariement des cas et témoins sur l'OP.

4.2 Facteurs influençant la probabilité de traitement antimicrobien

Les résultats de cette étude montrent que l'utilisation de papier démarrage à l'arrivée des poussins protège du risque de traiter aux antimicrobiens. L'importance du démarrage des poussins est unanimement reconnue comme un facteur important de bonne réussite du lot : performance technique du lot, mortalité, etc. (Yassin et al. 2009), (Heier et al. 2002), (Panda et al. 2015). Parmi les pratiques qui permettent de réussir le démarrage figure le papier démarrage, utilisé pour attirer les poussins à un endroit du bâtiment où sont regroupés tous les éléments indispensables à leur survie (chauffage, aliment, eau). La satisfaction de leurs besoins physiologiques les rend plus résistants aux maladies en général, diminuant ainsi le risque de développer des troubles pouvant conduire à un traitement antimicrobien. Nos résultats divergent de ceux de Heier, Høgåsen et al. (2002), pour qui l'utilisation de papier démarrage en production poulet standard était associée à une mortalité plus importante, l'expliquant par le mélange de fientes et d'aliment. Les densités moindres en élevage Label et l'utilisation de souches différentes de poulets permettent vraisemblablement d'expliquer la différence de résultats.

Les plans de prophylaxie incluent des vaccins, des produits issus de la chimiothérapie moderne ou encore des produits de type alternatifs à la chimiothérapie. Parmi cette dernière catégorie, les

probiotiques ont été rapportés comme pouvant diminuer l'utilisation d'antimicrobiens en aviculture (Chauvin, Bouvarel et al. 2005) (Hughes, Hermans et al. 2008), et les produits homéopathiques ont été associés chez le porc à une augmentation du risque de traiter avec des antimicrobiens lorsqu'ils ne sont pas utilisés (Arnold, Schüpbach-Regula et al. 2016). Pour leur part les produits phytothérapeutiques – à base d'huiles essentielles – ressortent ici significatifs, et leur utilisation en prévention est associée à une diminution du risque de traiter aux antimicrobiens. L'analyse descriptive de la sous-population d'éleveurs utilisant les produits phytothérapeutiques en prophylaxie indique qu'ils ont aussi en moyenne une meilleure application des bonnes pratiques de gestion d'élevage (nombre de visites par jour, bande unique, changement de chaussures avant d'entrer dans le bâtiment) et de prévention (acidification de l'eau, utilisation de vaccins anticoccidien et Gumboro) que chez la sous-population n'en utilisant pas. Toutefois, un effet de confusion lié aux bonnes pratiques d'élevage semble peu probable bien qu'on ne puisse catégoriquement l'exclure. En effet, de nombreuses variables décrivant finement les pratiques élevages ont été prises en compte dans l'analyse. Le résultat de cette étude est donc en faveur d'un effet protecteur des produits phytothérapeutiques utilisés en prévention, mais demande à être mieux étudié, notamment par des approches expérimentales. Nos résultats montrent, en poulet Label, que les traitements sont motivés avant tout par l'occurrence d'un problème sanitaire. Plus de 90% des antimicrobiens ont ainsi été administrés dans le cadre d'un problème de santé identifié par l'éleveur. Par ailleurs, la perception de la mortalité à 10 jours s'avère être corrélée avec le taux de

mortalité à 10 jours. Ces deux éléments indiquent donc que les éleveurs ont un bon niveau d'expertise de leur élevage et réservent les antimicrobiens à un usage thérapeutique. Mais le taux objectif de mortalité à 10 jours n'explique pas entièrement l'utilisation d'antimicrobiens, la perception que l'éleveur a de son élevage et de sa situation sanitaire intervient également. En effet dans notre enquête, c'est lui qui signalait s'il y avait eu selon lui un problème ou non. De même certains éleveurs ont jugé comme étant « élevée » une mortalité pourtant faible (inférieure à 1%). On peut émettre l'hypothèse que la perception que les éleveurs ont de la situation sanitaire de leur lot, et plus généralement de leur élevage, est en partie liée à l'historique récent. Plus d'études doivent être menées pour tester cette hypothèse.

5. CONCLUSION

Cette étude cas-témoin menée en élevage de poulets de chair Label Rouge a permis de mettre en évidence l'importance des facteurs de type psychosociaux dans l'utilisation d'antimicrobiens. Ainsi la prise en compte de la perception que les éleveurs ont de la mortalité est indispensable pour réduire l'utilisation des antimicrobiens en élevage. L'introduction dans les plans de prophylaxie de produits alternatifs à l'utilisation des antimicrobiens comme les produits phytothérapeutiques, s'ils étaient autorisés, associée à une culture de bonnes pratiques (prévention, suivi rapproché des animaux), pourrait constituer un levier d'action pour réduire l'utilisation des antimicrobiens en élevage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arnold, C., Schüpbach-Regula, G., Hirsiger, P., Malik, J., Scheer, P., Sidler, X., Spring, P., Peter-Egli, J. and Harisberger, M. (2016). Risk factors for oral antimicrobial consumption in Swiss fattening pig farms – a case-control study. *Porcine Health Management* 2, 1-9
- Casal, J., Mateu, E., Mejía, W. and Martín, M. (2007). Factors associated with routine mass antimicrobial usage in fattening pig units in a high pig-density area. *Vet. Res.* 38, 481-492
- Chauvin, C., Bouvarel, I., Beloeil, P.A., Orand, J.P., Guillemot, D. and Sanders, P. (2005). A pharmaco-epidemiological analysis of factors associated with antimicrobial consumption level in turkey broiler flocks. *Vet Res* 36, 199-211
- Chevance, A. and Moulin, G. (2014). Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2013, ANSES-ANMV

Dohoo, I.R., Martin, W. and Stryhn, H. (2009). Veterinary epidemiologic research. 2nd edition, Atlantic Veterinary College Inc., University of Prince Edward Island

Heier, B.T., Høgåsen, H.R. and Jarp, J. (2002). Factors associated with mortality in Norwegian broiler flocks. Preventive Veterinary Medicine 53, 147-158

Hughes, L., Hermans, P. and Morgan, K. (2008). Risk factors for the use of prescription antibiotics on UK broiler farms. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61, 947-952

Hybschmann, G.K., Ersboll, A.K., Vigre, H., Baadsgaard, N.P. and Houe, H. (2011). Herd-level risk factors for antimicrobial demanding gastrointestinal diseases in Danish herds with finisher pigs: a register-based study. Prev Vet Med 98

Panda, A.K., Bhanja, S.K. and Shyam Sunder, G. (2015). Early post hatch nutrition on immune system development and function in broiler chickens. World's Poultry Science Journal 71, 285-296

van der Fels-Klerx, H.J., Puister-Jansen, L.F., van Asselt, E.D. and Burgers, S.L.G.E. (2011). Farm factors associated with the use of antibiotics in pig production. Journal of Animal Science 89, 1922-1929

van Rennings, L., von Münchhausen, C., Otilie, H., Hartmann, M., Merle, R., Honscha, W., Käsbohrer, A. and Kreienbrock, L. (2015). Cross-Sectional Study on Antibiotic Usage in Pigs in Germany. PLoS ONE 10, e0119114

Yassin, H., Velthuis, A.G.J., Boerjan, M. and van Riel, J. (2009). Field study on broilers' first-week mortality. Poultry Science 88, 798-804

APPROCHE SYSTEMIQUE DE LA SANTE : ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DANS LES ELEVAGES DE POULETS BIOLOGIQUES

**Souillard Rozenn¹, Répérant Jean Michel¹, Experton Catherine², Huneau-Salaun
Adeline¹, Coton Jenna¹, Balaine Loïc¹, Thomas Rodolphe¹, Filliat Christine³, Puterflam
Julie⁴ et Le Bouquin Sophie¹**

¹ANSES, BP 53, 22440 Ploufragan

²ITAB, 149, rue de Bercy, 75595 Paris

³Cabinet vétérinaire Vétropole 26, 320, rue du Plateau d'Ambel, 26300 Chateauneuf sur Isère

⁴ITAVI, 41, rue de Beaucemaine, 22440 Ploufragan

rozenn.souillard@anses.fr

RÉSUMÉ

L'élevage biologique se caractérise par une approche globale de la santé face à des affections multifactorielles et à des possibilités réduites de traitements conventionnels. C'est pour identifier les moyens de maîtrise de la santé dans ces élevages que l'Institut Technique de l'Agriculture Biologique a coordonné un projet multifilières « Synergie pour la santé des élevages biologiques » dont les objectifs pour les volailles sont de décrire l'état de santé et de bien-être des poulets et d'identifier les conditions d'élevage influençant cet état de santé. Une étude a été menée par l'Anses dans 85 lots de poulets biologiques (2 visites à 3 et 11 semaines d'âge). Pour chaque visite, un questionnaire a été renseigné, une notation d'indicateurs de bien-être de 30 poulets et des examens parasitaires de 5 poulets ont été réalisés. Des problèmes sanitaires, le plus souvent digestifs, ont été signalés par les éleveurs dans 37,6% des lots. Des helminthes ont été identifiés dans 59% des lots sans lien significatif avec les lots atteints de problèmes digestifs et il n'a pas été observé de lésions coccidiennes majeures. Pour l'ensemble des élevages suivis, des pododermatites ont été observées en fin de lot pour 44,1% des poulets, dont 21,5% avec des lésions minimales. Cette étude a révélé un bon état de santé et de bien-être des poulets biologiques. Elle a cependant permis de mettre en évidence des conditions d'élevage influençant l'état de santé, et de proposer des mesures préventives : le renforcement de l'hygiène avec la désinfection des bâtiments et de la biosécurité avec un changement de chaussures, une meilleure gestion de la qualité de l'eau de boisson, l'aménagement de la zone de sortie sur parcours, la préconisation d'un vide sanitaire périodique complet sur l'élevage et le développement de l'accès au conseil technique pour les éleveurs indépendants. Cette étude a permis d'apporter des moyens d'action pour améliorer la gestion sanitaire des élevages de poulets biologiques.

ABSTRACT

Systemic approach of health: epidemiological study in organic broilers flocks

Organic farm is characterized by a global health approach with multifactorial diseases and limited use of conventional treatments. To identify the means of health control in these farms, ITAB coordinated a multi production project "Synergie for health in organic farms", and the objectives for poultry were to describe health and welfare states of organic broilers and to identify rearing conditions influencing poultry health. A study was carried out by Anses in 85 organic broiler flocks (2 visits: 3 and 11 weeks of age). For each visit, a questionnaire was filled, a notation of welfare indicators of 30 broilers and parasitic examinations of 5 broilers were carried out. Health disorders, mainly digestive, were reported by farmers in 37.6% of the flocks. Helminths were observed in 59% of the flocks without significant link with flocks with digestive problems and no severe coccidia lesions were observed. For all the followed flocks, footpad dermatitis lesions were observed at the end of the rearing period in 44.1% of the chickens, with minimal lesions in 21.5%. This study revealed good health and welfare in organic broilers flocks. However, the results highlighted that rearing conditions influence health and preventive measures were suggested: improvement of hygiene with disinfection of the poultry houses and biosecurity with change of the shoes, a better management of the drinking water quality, arrangement of the range area in front of the poultry house, a periodic sanitary break on the farm, and the development of access to technical advice for independent farmers. This study provided measures to improve the health management in the organic chicken farms.

INTRODUCTION

L'élevage biologique se caractérise par une approche globale de la santé face à des affections multifactorielles et à des possibilités réduites de traitements conventionnels. Le cahier des charges des élevages biologiques autorise en effet « en dehors des vaccinations et des traitements antiparasitaires, un seul traitement à base de médicaments vétérinaires allopathiques chimiques de synthèse ou d'antibiotiques pour des animaux de moins d'un an » (Règlement n°889/2008). C'est pour comprendre ces spécificités et identifier les éléments visant à maîtriser la santé dans ces élevages que l'ITAB a conduit le projet multifilières « Synergie pour la santé des élevages biologiques », en collaboration avec l'Anses, l'INRA, des chambres d'agriculture, des associations et groupements professionnels et des établissements d'enseignement agricoles. La production de poulets de chair biologiques connaît un essor rapide en France avec 744 exploitations en 2014, soit une augmentation de 8% sur un an (Agence Bio, 2016). Il existe peu de données sur la gestion de la santé et du bien-être dans les élevages de poulets biologiques. Les problèmes sanitaires des volailles biologiques semblent proches de ceux des autres productions avicoles sur parcours (Berg, 2001), avec notamment des troubles digestifs et parasitaires (Guéméné *et al*, 2009). Les objectifs du projet mené dans 85 élevages de poulets biologiques en France sont (1) de décrire l'état de santé et de bien-être des poulets et (2) d'identifier les conditions d'élevage influençant l'état de santé afin de proposer des mesures préventives.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Recrutement des élevages

L'échantillon des 85 élevages a été stratifié sur le mode de commercialisation long ou court et sur la répartition des élevages en France. Etant donnée l'absence de listing national permettant de réaliser un tirage au sort, le recrutement s'est basé sur le volontariat des éleveurs contactés via les 7 organisations de production participantes, et pour les éleveurs indépendants via les chambres d'agriculture (Bretagne, Pays de la Loire, Sarthe et Drôme) et des associations de producteurs biologiques (Agrobio 35, Agrobio Périgord, CAB Pays de Loire).

1.2. Données collectées et examens parasitaires

Les visites des élevages se sont réparties de janvier 2014 à avril 2015. Un lot de poulets a été enquêté par élevage et constitue l'unité épidémiologique. Deux visites ont été réalisées à 3 semaines (avant la sortie sur parcours) et à 11 semaines d'âge. Un questionnaire a été rempli avec l'éleveur permettant de décrire les exploitations, les pratiques d'élevage et les données sanitaires.

Lors de chaque visite, une notation de 30 poulets a permis d'évaluer des indicateurs du bien-être (Welfare

Quality, 2009) : propreté du plumage (score 0: plumage propre, score 1 : dégradation minime, score 2 et 3 : plumage sale et très sale), lésions des tarses et pododermatites (score 0 : absence de lésion, score 1 : lésion minime et scores 2 à 4 : lésions avérées selon leur importance). Dans chaque quart du bâtiment et dans 3 zones (couchage, alimentation et abreuvement), l'état de la litière a également été noté selon 4 scores (1. sec et non croûté, 2. sec et croûté à plus de 25%, 3. humide et non croûté, 4. humide et croûté à plus de 25%) et la température a été relevée aux mêmes endroits. Enfin, une analyse d'eau en bout de ligne a été réalisée (analyses bactériologiques et chimiques). Lors de chaque visite, un examen parasitaire a également été réalisé sur 5 poulets afin de rechercher la présence de coccidies (*E. acervulina*, *E. maxima* et *E. tenella*) avec d'éventuelles lésions associées et la présence d'helminthes.

1.3. Traitement statistique des données

Les données ont été analysées avec le logiciel R de traitement des données et d'analyse statistique. Les variables décrivant l'état de santé et de bien-être des lots de poulets ont été croisées pour déterminer leurs liens entre elles au seuil de significativité $p=0,10$. Les variables d'élevage explicatives associées aux variables sanitaires et de bien-être ont été mises en évidence au moyen de tests non paramétriques (tests du χ^2 , de Wilcoxon et de corrélation sur les rangs de Spearman, ($p=0,10$)). Enfin, une analyse descriptive multidimensionnelle a été réalisée avec une Analyse Factorielle des Correspondances Multiples (AFCM) suivie d'une Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) permettant de constituer des classes d'élevages similaires quant à leurs caractéristiques structurelles et de conduite d'élevage.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Typologie des 85 exploitations

Parmi les 85 élevages, 40 sont localisés dans le Nord-Ouest de la France, 31 dans le Centre et Sud-Est et 14 dans le Sud-Ouest. La répartition suit la production nationale des poulets biologiques en France, avec les Pays de la Loire comme première région de production (Agence bio, 2015). Soixante-dix éleveurs font partie d'une organisation de production et 15 éleveurs sont indépendants (Tableau 1). Les éleveurs indépendants élèvent des bandes de faibles effectifs, en moyenne 518 poulets avec plus de 10 bandes par an, le plus souvent en bande multiple. Les éleveurs en organisation réalisent en moyenne 3,7 bandes par an de 6317 poulets. Parmi les 85 lots suivis, 28 ont été élevés dans des bâtiments mobiles et 57 dans des bâtiments fixes. 74 lots ont été vaccinés contre les coccidiose au couvoir. Les poulets sont sortis sur les parcours en moyenne à 42 jours (de 25 à 53 jours).

2.2. Etat de santé et de bien-être des poulets

2.2.1 Les problèmes sanitaires et la mortalité

Des problèmes sanitaires ont été signalés par les éleveurs dans 32 lots/85 avec essentiellement des problèmes digestifs : 18 entérites non précisées, 4 entérites nécrotiques et 2 coccidioses. Il a également été observé des problèmes locomoteurs dans 3 lots, dont 2 arthrites à *Staphylococcus aureus*, des problèmes du démarrage dans 3 lots et des problèmes respiratoires dans 2 lots. Les signalements dépendent de l'appréciation des éleveurs et en l'absence d'autopsie systématique, une sous-estimation des diagnostics n'est pas à exclure. La majorité des lots était vaccinée contre la coccidiose, ce qui peut expliquer la faible prévalence de la maladie. Il existe peu de données sur les problèmes sanitaires des volailles biologiques. Les affections les plus fréquemment observées en Europe du Nord sont le picage, la coccidiose, les helminthoses (Thamsborg *et al.* 2004) et les problèmes digestifs (Bestman & Maurer, 2006).

Concernant l'état de la litière, c'est dans la zone d'abreuvement qu'une évolution a été observée : 12 élevages en visite 1 avaient au moins un score humide et 28 élevages en visite 2. Pour l'analyse d'eau, une absence de contamination bactérienne (coliformes, *E. coli*, anaérobies sulfito-réducteurs et entérocoques) a été observée dans seulement 15 élevages, alors que l'absence de contamination est préconisée pour l'eau d'abreuvement des volailles (CRAPL *et al.*, 2007).

Parmi les 32 éleveurs confrontés à un problème sanitaire, 20 ont administré uniquement des produits alternatifs essentiellement à base de plantes et 6 éleveurs ont administré un traitement conventionnel : 5 éleveurs ont eu recours à un antibiotique et 1 éleveur à un anticoccidien, selon le cahier des charges des élevages biologiques. Un descriptif des produits utilisés en curatif et préventif dans les 85 lots a été réalisé dans le cadre de l'étude Trait'Bio (Le Bouquin *et al.*, 2017).

La mortalité moyenne des lots à 77 jours d'âge a été de 2,8% (0,2% à 14,8% avec médiane=2%). Ce taux de mortalité est associé aux problèmes sanitaires signalés par les éleveurs ($p < 0,01$). Selon les données 2015 de l'enquête des chambres d'agriculture du Grand Ouest, la perte dans les élevages de poulets biologiques s'élève à 4,93% (chambre agriculture du Grand Ouest, 2016). Il s'agit du taux de perte totale jusqu'à l'abattage, ce qui peut expliquer le taux de mortalité plus faible de notre étude (2,8%) calculé à 77 jours d'âge en moyenne et ne prenant pas en compte les pertes par prédation.

2.2.2. Les indicateurs de bien-être

Une dégradation minimale du plumage a été observée pour 2% des poulets lors de la visite 1 (dans 9 lots) et pour 6% en visite 2 (dans 23 lots). Pour les tarses, 0,1% des poulets présentaient des lésions minimales en visite 1 (dans 3 lots) et 0,5% lors de la visite 2 (dans 5 lots). Concernant les pododermatites, lors de la visite 1, des lésions ont été observées pour 14,5% des poulets, dont 9,4% avec des lésions minimales et 5,1% avec des lésions avérées (dans 24 lots). Lors de la

visite 2, des pododermatites ont été observées sur 44,1% des poulets, dont 21,5% avec des lésions minimales et 22,6% avec des lésions avérées (dans 53 lots). Dans une étude réalisée en France sur 55 lots de poulets standards (200 à 400 poulets par lot), 91,1% des poulets présentaient des lésions de pododermatites à l'abattoir (Allain *et al.*, 2009).

2.2.3. Les examens parasitaires

Pour la visite 1, la majorité des lots étant vaccinée contre les coccidioses, les coccidies retrouvées dans la plupart des lots (76 lots) pourraient être d'origine vaccinale, et les faibles lésions observées pour un tiers d'entre eux pourraient être également dues au recyclage de ces coccidies vaccinales (Tableau 2). La vaccination contre les coccidioses est en effet basée sur une administration de coccidies qui se multiplient au niveau intestinal afin d'immuniser les volailles. Pour la visite 2, la présence de coccidies dans 62 lots peut s'expliquer soit par un recyclage des coccidies vaccinales ou une circulation de coccidies sauvages. Très peu de lésions coccidiennes ont été observées. Les coccidies peuvent être présentes dans l'intestin sans signe clinique. Il n'a en effet pas été mis en évidence de lien statistique entre problème digestif signalé par les éleveurs et la présence de coccidies.

Des helminthes (*Heterakis* et/ou *Ascaridia*) ont été observés dans les tubes digestifs de poulets provenant de 50 élevages lors de la visite 2. Des larves ont aussi été identifiées en visite 1 pour 2 élevages, avant sortie sur parcours : il s'agirait d'une introduction à partir de l'extérieur ou d'une persistance des parasites dans le bâtiment. Les vers peuvent aussi être présents dans l'intestin des volailles sans signe clinique associé et il n'a pas été mis en évidence de lien entre les lots avec problèmes digestifs et les lots pour lesquels un portage d'helminthes a été détecté. Il existe peu de données sur le parasitisme des poulets biologiques. Pour les poulets labels, il a été montré que les parasites les plus fréquemment retrouvés sur parcours étaient les coccidies, puis les *Capillaria* et *Ascaridia* (Franck *et al.*, 1999).

2.3. Conditions d'élevage influençant l'état de santé et de bien-être des poulets

L'analyse des liens entre les variables au seuil $p=0,10$ a permis de retenir 3 variables caractérisant l'état de santé et de bien-être des poulets : la présence de pododermatites en visite 2, la présence d'helminthes en visite 2 et le taux de mortalité en visite 2 à 77 jours d'âge. Sur 140 variables explicatives, 12 variables ont été retenues pour l'AFCM. La CAH a ensuite permis d'obtenir 2 classes d'élevages avec les modalités les caractérisant par ordre de significativité de leur contribution à la constitution des classes (Figure 1). La classe 1 regroupe uniquement des élevages en organisation de production avec plutôt des bâtiments fixes, disposant le plus souvent d'un sol bétonné au niveau de la zone de sortie sur parcours. La litière est plutôt sèche et les éleveurs n'ont le plus

souvent pas rapporté de litière. Ces éleveurs changent plutôt de chaussures avant d'entrer dans le bâtiment. Ils réalisent le plus souvent un traitement de l'eau de boisson en cours d'élevage, au moins une analyse d'eau par an et une désinfection de leur bâtiment au vide sanitaire. Ces élevages présentent moins de pododermatites, moins d'helminthes et ont un taux de mortalité moyen de 2,2%. La classe 2 regroupe les 15 élevages indépendants et 25 élevages en organisation de production. Les conditions d'élevage les caractérisant sont les modalités inverses de la classe 1 et ces élevages présentent plus de pododermatites, plus d'helminthes et un taux de mortalité moyen de 3,5%.

Cette partition met ainsi en évidence l'influence de certaines conditions d'élevage sur une dégradation de l'état de santé et de bien-être des poulets biologiques. Notamment, l'influence du type d'exploitation indépendante pourrait s'expliquer par le lien avec la pratique de la bande multiple ($p < 0.01$), ce qui rend plus difficile l'assainissement du site d'élevage vis-à-vis des pathogènes et des parasites et également par un manque de conseils techniques pour les éleveurs indépendants, puisque 44% d'entre eux disent ne pas en disposer suffisamment (ITAB, 2015). Par ailleurs, l'influence du type de bâtiment mobile pourrait s'expliquer par le lien avec une densité des volailles plus élevée ($p < 0,01$). Il a été montré que la densité pouvait être un facteur prédisposant de l'entérite nécrotique (Tsiouris *et al.*, 2015), de la mortalité (Hall, 2001) et pouvait être associée aux pododermatites (Buijs *et al.*, 2009). De plus, la zone frontale du bâtiment est le plus souvent surexploitée par les volailles (Guéméné *et al.*, 2009), avec plus de parasites et de coliformes (Franck *et al.*, 1999). Un aménagement de cette zone (trottoirs, caillebotis, zone bétonnée) limiterait la pression sanitaire (Lubac *et al.*, 2006). Par ailleurs, une litière plus humide serait également associée à une dégradation de l'état de santé et de bien-être des volailles. Une étude réalisée

en France sur 55 lots de poulets standards a en effet montré un lien entre les pododermatites et une litière dégradée (Allain *et al.*, 2009). Pour la qualité de l'eau de boisson, une étude conduite en France dans 50 lots de poulets (Puterflam *et al.*, 2007) a montré que la qualité de l'eau de boisson (teneur en streptocoque fécaux) était associée aux problèmes digestifs, d'où l'importance de sa gestion et de son contrôle. Enfin, l'hygiène avec une absence de désinfection du bâtiment et la biosécurité avec une absence de changement de chaussures sont également associés à une dégradation de l'état de santé des poulets. Une enquête menée en Angleterre auprès de 857 exploitations a montré que l'entérite nécrotique était associée à la coccidiose, à la présence de matériaux poreux rendant difficile les opérations de nettoyage et aux mesures de biosécurité (Herman *et al.*, 2007).

CONCLUSION

Cette étude révèle un bon état de santé et de bien-être des poulets biologiques, et un faible recours aux traitements antibiotiques. Elle a permis d'identifier des marges de progrès et de proposer des mesures préventives pour améliorer la gestion sanitaire des élevages, avec notamment un renforcement des mesures d'hygiène, de biosécurité et de la qualité de l'eau de boisson, un aménagement de la zone de sortie sur parcours, la préconisation d'un vide sanitaire complet sur le site et le développement de l'accès au conseil technique pour les éleveurs indépendants.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les éleveurs et les organisations de production pour leur participation à l'étude. Ce projet a été financé par le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (CASDAR Synergies pour la santé des élevages biologiques - AAP 2012 n° 1201) et a été mené dans le cadre de l'UMT Sanivol.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agence bio 2015 et 2016. Les filières avicoles biologiques. Site internet agence bio.
- Allain V., Mirabito L., Arnould C., Colas M., Le Bouquin S., Lupo C., Michel V. 2009. Br Poult Sci, 50(4), 407-417.
- Berg C. 2001. Acta Vet Scand Suppl, 95, 37-45.
- Bestman M., Maurer V. 2006. Paper presented at the Joint Organic Congress, Odense, Denmark, May 30-31, 2006.
- Buijs S., Keeling L., Rettenbacher S., Van Poucke E., Tuytens F. A. 2009. Poult Sci, 88(8), 1536-1543.
- CRAPL, ITAVI, GDS Bretagne, GDS Mayenne, Groupe Chêne Vert, 2007. Plaquette 12 pages.
- Enquête Chambres d'Agriculture du Grand-Ouest - Juin 2016. Résultats technico-économiques.
- Franck Y., Chauve C., Maes D., Baroux D., Andral B. 1999. Journées de la Recherche Avicole, St-Malo, 335-338.
- Guéméné D., Germain K., Aubert C., Bouvarel I., Cabaret J., Chapuis H., Corson M., Jondreville C., Juin H., Lessire M., Lubac S., Magdelaine P., Leroyer J. 2009. INRA Productions Animales, 22(3), 161-178.
- Hall A. L. 2001. Animal Welfare, 10(1), 23-40.
- Hermans P. G., Morgan, K. L. 2007. Avian Pathol, 36(1), 43-51.
- ITAB 2015. Plaquette « Assurer la bonne santé des volailles de chair en élevages biologiques : astuces, conseils et expériences d'éleveurs ».
- Le Bouquin S., Guegou V., Experton C., Coton J., Roinsard A., Boudergue C., Filliat C., Souillard R. 2017. Journées de la Recherche Avicole, Tours.
- Lubac S. 2006. Sciences et Techniques Avicoles, 54, 14-23.
- Puterflam J., Grontec E., Derel R., Pinsard J.-L., Martin D., Léorat, J. 2007. Journées Recherche Avicole, Tours, 304-308.
- Règlement CE n°889/2008 de la commission Européenne du 5 septembre 2008.
- Thamsborg S. M., Roderick S., Sundrum A. 2004. In Animal health and diseases in organic farming. pp. 227-252.
- Tsiouris V., Georgopoulou I., Batzios C., Pappaioannou N., Ducatelle R., Fortomaris P. 2015. Avian Pathol, 44(2), 59-66.
- Welfare Quality consortium. 2009. Assessment protocol for poultry. Welfare Quality® The Netherlands.

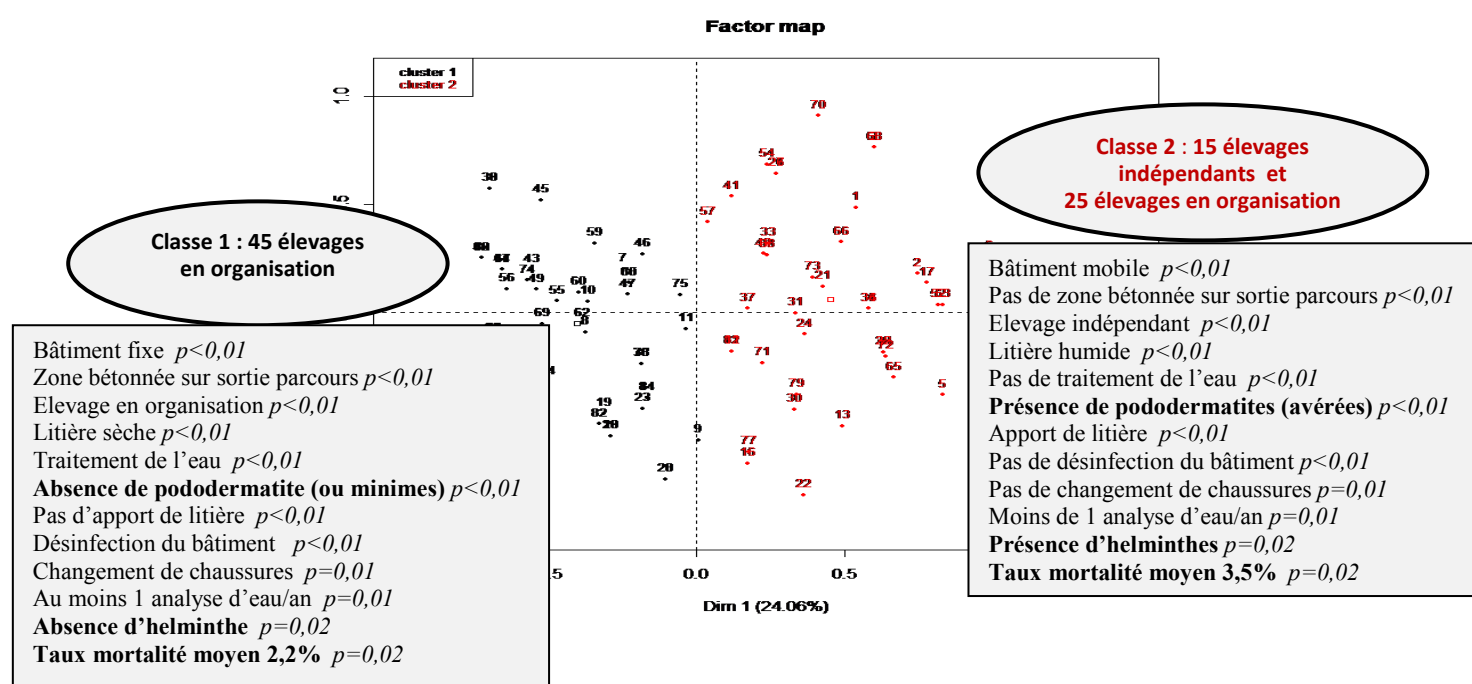
Tableau 1. La typologie des 85 exploitations

	Indépendants 15 éleveurs	Organisation de production 70 éleveurs
Nb bandes de poulets/an	Moyenne 10,6 (6 à 26) bande unique : 1 élevage bande multiple : 14 élevages	Moyenne 3,7 (2 à 15) bande unique : 47 élevages bande multiple : 23 élevages
Poulets /bande	Moyenne 518 (200 à 1000)	Moyenne 6317 (1150 à 16000)
Vente	Vente directe à la ferme	62 en circuit long 8 circuit long + en partie vente directe
Activité principale	Poulets bio : 10 élevages	Poulets bio : 32 élevages
Nb bâtiments poulets AB	En moyenne 6 (1 à 12) Des mobiles pour 6 élevages Des fixes pour 3 élevages Des fixes et mobiles pour 6 élevages	En moyenne 3 (1 à 16) Des mobiles dans 11 élevages Des fixes dans 49 élevages Des fixes et mobiles dans 10 élevages

Tableau 2. Examen parasitologique des poulets biologiques (5 poulets à chaque visite, 85 lots)

	Nombre de lots	
	Visite 1 Moyenne 22j	Visite 2 Moyenne 77j
Présence de coccidies	76	62
Lésions coccidiennes	24	2
<i>Eimeria acervulina</i>	13	
<i>Eimeria maxima</i>	5	
<i>Eimeria tenella</i>	3	2
<i>Eimeria maxima et tenella</i>	3	
Présence d'helminthes	2	50
<i>Heterakis</i>	1	27
<i>Ascaridia</i>	1	10
<i>Heterakis et Ascaridia</i>		13

Figure 1. Deux classes d'élevages suite à la CAH avec les modalités les caractérisant



SESSION
PATHOLOGIE - PREVENTION

Posters

CARACTERISTIQUES DES FOYERS FRANÇAIS D'INFLUENZA AVIAIRE HAUTEMENT PATHOGENES DE L'HIVER 2015-2016 : ANALYSE DES DONNEES ISSUES DES ENQUETES EPIDEMIOLOGIQUES

**Scoizec Axelle¹, Huneau-Salaün Adeline¹, Schmitz Audrey², Briand François-Xavier²,
Hamon Manon³, Bronner Anne³, Niqueux Eric², Le Bouquin Sophie¹**

¹*ANSES, Laboratoire de Ploufragan – Plouzané, Unité d'Epidémiologie et bien-être en aviculture et cuniculture, Université Bretagne-Loire, BP 53, 22440 PLOUFRAGAN,*

²*ANSES, Laboratoire de Ploufragan – Plouzané, Unité Virologie, immunologie, parasitologie aviaires et cunivores, Université Bretagne-Loire, BP 53, 22440 PLOUFRAGAN*

³*Direction générale de l'Alimentation, 251 rue de Vaugirard, 75732 PARIS Cedex 15*

axelle.scoizec@anses.fr

RÉSUMÉ

De novembre 2015 à avril 2016, 95 foyers d'influenza aviaire (IA) ont été déclarés (77 hautement pathogènes HP et 16 faiblement pathogènes FP) dans le sud-ouest de la France. Des enquêtes épidémiologiques ont été menées par les services de l'état dans chacun des foyers HP à partir de questionnaires standardisés. L'objectif de l'étude présentée était de décrire les caractéristiques d'élevage, cliniques et épidémiologiques des foyers HP investigués. Pour cela, une analyse descriptive des données issues des 78 questionnaires épidémiologiques a été réalisée. Le profil d'élevage majoritairement rencontré parmi les foyers HP est celui d'un élevage comprenant au moins un atelier de palmipèdes gras, un autre atelier dans environ 50% des cas, pouvant être un atelier de galliformes (20% des cas). Si une expression clinique (mortalité augmentée) était présente dans tous les foyers comportant un atelier de galliformes infecté, 76% des foyers avec seulement des palmipèdes détectés infectés étaient asymptomatiques. Les foyers étaient en lien épidémiologique avec en moyenne 9.3 élevages et ces liens étaient dus à 85% à des mouvements de palmipèdes. Le niveau de biosécurité des ateliers de palmipèdes était hétérogène et souvent faible. L'importance de la présence de la production de palmipèdes dans les foyers HP, associée aux facteurs favorisant la diffusion du virus que sont pour cette production les cas asymptomatiques, la multiplication des liens par mouvements d'animaux et des niveaux de biosécurité souvent faibles, explique l'ampleur de cet épisode épidémiologique d'IAH5HP et le rôle majeur de cette production dans celle-ci.

ABSTRACT

Characteristics of the highly pathogenic avian influenza cases in France during the winter 2015-2016 : epidemiological inquiries data analysis.

From November 2015 to April, 2016, 95 cases of avian influenza (AI) were declared (77 highly pathogenic HP and 16 low pathogenic LP) in the Southwestern region of France. Epidemiological inquiries were led by the national authorities in all HP cases using standardized questionnaires. The objective of the study was to describe the farming, clinical and epidemiological characteristics of the investigated HP cases. For that purpose, a descriptive analysis of the data from 78 epidemiological questionnaires was performed. The most frequent type of farm was a poultry farm including at least one flock of mule ducks, another flock in approximately 50% of the cases that could be a galliformes flock (20 % of the cases). Clinical signs (mortality increase) were recorded in every case with infected galliformes flock, but in 76% of the cases with only infected waterfowl, no symptoms were recorded. Each case was epidemiologically linked on average to 9.3 poultry farms. 85% of these links were related to waterfowl moves. Biosecurity levels in waterfowl flocks were uneven and generally poor.

The waterfowl production involvement in the HPAI cases associated with virus diffusion factors related to this production (asymptomatic cases, numerous links between farms by waterfowl moves, and poor biosecurity levels) explain the magnitude of this HPAI H5 epizootic episode and the major involvement of waterfowl in it.

INTRODUCTION

Durant l'hiver 2015-2016, une épizootie d'Influenza aviaire (IA) hautement pathogène (HP) et faiblement pathogène (FP) impliquant différents virus de sous-types H5 a été détectée dans le Sud-Ouest de la France, principalement dans des élevages organisés de volailles mais aussi dans quelques basses-cours de particuliers. De novembre 2015 à avril 2016, 95 foyers ont été déclarés (77 HP et 16 FP), suite à un résultat positif par RT-PCR temps réel gène H5 (au laboratoire national de référence). Dans le cadre des mesures réglementaires de gestion des foyers d'IA, des enquêtes épidémiologiques ont été menées par les services de l'état dans la totalité des foyers HP. Les premières enquêtes en décembre 2015 ont contribué à évaluer la situation épidémiologique de l'IAHP dans le sud-ouest de la France (Le Bouquin et al., 2016), conjointement avec les analyses des souches virales isolées. Au terme de l'épisode, une analyse générale des caractéristiques des foyers, à partir des données récoltées lors des enquêtes, a permis de décrire cet épisode épizootique à l'échelle des élevages détectés infectés. Cet article présente les conclusions de l'analyse descriptive.

1. MATERIELS ET METHODES

Les enquêtes ont été réalisées par des agents des Directions départementales en charge de la protection de la population concernées par un foyer (9 départements). Seules les dix premières enquêtes ont été menées conjointement avec une équipe Anses / Cirev sud-ouest (Cellule interrégionale d'épidémiologie vétérinaire). Les enquêtes ont donc été réalisées par une grande diversité d'enquêteurs (28 enquêteurs distincts recensés). Un modèle révisé de questionnaire standardisé a été produit et diffusé suite aux premières enquêtes réalisées avec l'appui de l'Anses. Les enquêtes suivantes ont donc été réalisées majoritairement avec ce modèle révisé mais certains départements ont néanmoins réalisé les enquêtes avec un modèle antérieur. De par la diversité des enquêteurs et des modèles de questionnaires utilisés, les données collectées ne sont pas totalement homogènes mais correspondent toutefois à une trame générale commune.

Le modèle de questionnaire n'avait pas été conçu pour une exploitation des données à une échelle autre que le foyer investigué. Néanmoins une centralisation des questionnaires a été mise en place dès le début de l'épisode et les données ont été saisies par la Cirev sud-ouest pour les foyers HP. Dans le cadre de cette étude, nous nous référerons à 78 entités foyers HP (78 élevages foyers) car l'un des foyers était constitué de deux élevages distincts. Des données complémentaires issues de la base de données SIGAL du Ministère de l'Agriculture et du Laboratoire national de référence ont également été utilisées dans

le cadre de cette étude. Le logiciel QGIS a été utilisé pour le traitement des données géographiques.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Caractéristiques d'élevage des foyers

Les 78 élevages foyers IA H5 HP se répartissent en 3 (4%) basses-cours non commerciales et 75 (96%) élevages commerciaux de volailles dont 65 sont en filière longue (intégration) et 10 en filière courte. Des palmipèdes (oies ou canards) sont présents dans 76 (97%) des élevages foyers dont 15 (19%) comportent également des galliformes (*Gallus* ou pintades). Au total, des galliformes étaient présents dans 17 élevages (21%). Plus d'une quinzaine d'organisations professionnelles intégratrices sont représentées parmi les élevages commerciaux en filière longue.

Sur les 78 élevages foyers, 220 ateliers peuplés de volailles au moment de la détection de l'infection ont été recensés : soit en moyenne 2,8 ateliers par élevage (52% des élevages avec au moins deux ateliers) et un maximum de 21 ateliers (couvoir). Les ateliers de palmipèdes gras (élevage, prégavage et gavage) représentent 132 (60%) de ces ateliers. Parmi ceux-ci, 11 (9%) sont des ateliers d'oies et 121 (91%) sont des ateliers de canards. Les ateliers de palmipèdes reproducteurs ou futur reproducteurs sont au nombre de 35 (16%) correspondant à deux couvoirs de canards, un élevage de futurs reproducteurs canards et un élevage avec un atelier d'oies reproductrices. Le reste des ateliers se répartit en 46 (21%) ateliers de volailles de chair majoritairement en *Gallus* (un de canettes et neuf avec des pintades), et 5 basses-cours de volailles (trois basses-cours de particuliers et deux basses-cours situées dans des élevages commerciaux). La production en plein air ou semi plein air représente 40% des ateliers, situés dans 35 élevages. Des volailles présentes ont été élevées une partie de leur vie en plein air ou semi plein air dans 74 (95%) des élevages. Ceci s'explique par la prédominance d'élevages de palmipèdes gras qui nécessitent un passage sur parcours des oiseaux au cours du processus d'élevage et par l'importance de la production Label en volailles de chair dans la zone sud-ouest.

Le profil d'élevage majoritairement rencontré comprend donc au moins un atelier de palmipèdes gras, avec un autre atelier dans environ 50% des cas, pouvant être un atelier de galliformes (20% des cas).

2.2. Caractéristiques cliniques des foyers

Dans les 78 foyers, parmi les 220 ateliers recensés, 84 ont été confirmés infectés par un ou des virus IA H5HP. Ils se répartissent en ateliers de palmipèdes gras pour 74% (majoritairement des ateliers de gavage), en ateliers de palmipèdes reproducteurs et futurs reproducteurs pour 7%, en ateliers de galliformes de chair pour 14% (*Gallus* ou Pintades),

en poules pondeuses pour 1% et en basse-cours non commerciales pour 4%.

Le détail des manifestations cliniques dans les 78 entités foyers IA H5 HP est présenté dans le tableau 1. Les foyers sont asymptomatiques dans 62% des foyers détectés. Cette proportion est sans doute sous-estimée, une partie des élevages infectés asymptomatiques ayant pu échapper à la surveillance active, qui n'était mise en œuvre qu'en zones de protection et de surveillance. Tous les foyers avec un cas index en galliformes ont été détectés par surveillance événementielle, basée sur la surveillance de signes cliniques et de la mortalité. Pour les foyers dont le ou les ateliers index sont en palmipèdes gras (N=61), les manifestations cliniques concernent 24% des cas. Une mortalité augmentée est reportée dans tous les foyers de galliforme de chair et dans 23% de ceux de palmipède gras. Les manifestations cliniques les plus rapportées après l'augmentation de la mortalité sont les symptômes respiratoires (depuis la toux jusqu'à la détresse respiratoire aigüe).

Dans les ateliers présentant une augmentation de la mortalité pour lesquels la donnée est disponible (N=27), les taux rapportés de mortalité varient de 3 à 30% en palmipèdes gras (N=14), de 2 à 7% en Gallus (N=6), de 12 à 17% en pintades (N=4) et de 24 à 70% en basse-cour (N=3). Un cas avec 75% de mortalité sur un atelier mélangeant Gallus et pintades a été également rapporté. L'exploitation des taux de mortalité est problématique car le recueil de la donnée n'a pas été standardisé et la date de début de l'infection n'est jamais connue (sauf lien épidémiologique évident). La durée de l'épisode de mortalité auquel se rapporte le taux déclaré est très variable : de 1 à 16 jours. L'évolution de la mortalité doit également être interprétée : épisode toujours en cours au moment de l'abattage des animaux ou épisode terminé/mortalité en diminution nette. Cette donnée sur la cinétique de la mortalité n'est généralement pas rapportée car elle n'est pas prévue dans les questionnaires standardisés utilisés. L'interprétation des taux de mortalité devrait également prendre en compte la taille considérée et la densité d'élevage des lots concernés.

L'évolution du taux de mortalité dans 12 ateliers infectés semble montrer, en tenant compte de la taille des lots, que la pintade présenterait une grande explosivité de la mortalité avec sans doute, si les épisodes allaient à terme, un taux de mortalité cumulée très important (Figure 1). Dans l'espèce canard, deux épisodes sur trois se terminent en 7 jours, avec des taux quotidiens ne dépassant pas 5%. Dans l'espèce Gallus la situation semble plus variée avec un épisode proche de la cinétique en pintade et d'un autre côté des cas dans lesquels la mortalité se maintient sans diminution sur plusieurs jours à un taux quotidien inférieur à 1% sur des lots de taille importante (4000 à 10 000) ; le taux de mortalité cumulée si les épisodes allaient à terme pourrait donc être bien supérieur à ceux des canards.

Des infections concomitantes ont été signalées par les éleveurs dans cinq ateliers de gavage présentant une augmentation de la mortalité (du coryza en début de gavage pour deux cas, de l'entérototoxicité pour deux cas dont l'un pour lequel la mortalité a chuté après mise en place d'un traitement antimicrobien, et du choléra aviaire dès l'arrivée en gavage pour le dernier cas selon les commémoratifs du vétérinaire). Ces co-infections n'ont pas été clairement confirmées par des tests diagnostiques, mais la présence d'une co-infection par un autre pathogène peut expliquer une augmentation de la mortalité ou l'apparition de signes cliniques lors d'une infection par un virus H5HP chez des palmipèdes (Nuñez et al., 2016). Ce facteur pourrait expliquer l'hétérogénéité entre lots infectés des symptômes sur les palmipèdes.

2.3. Caractéristiques épidémiologiques des foyers

Plusieurs sous-types de virus de même lignage (gènes H5 apparentés) ont été identifiés (Briand et al., 2016). Les sous-types ne semblent liés ni à une espèce ni à un niveau de pathogénicité : des cas symptomatiques sur palmipèdes existent pour chaque sous-type (tableau 2).

Les foyers H5HP sont situés dans la zone sud-ouest du territoire français qui est une zone importante d'élevage de volailles, en particulier les volailles de chair Label, les palmipèdes gras et les gibiers à plumes. Les foyers ne sont pas tous situés dans les zones de forte densité d'élevages de volailles (figure 2). Seuls 36% des foyers se situent dans des zones de densité importante à très importante (densité dans un rayon de 10km autour du foyer supérieure à 1,5 établissements par km²).

Les pratiques d'élevage décrites avant la détection de l'infection, présentent de nombreux points critiques concernant les risques d'introduction, de diffusion ou de maintien du virus. Les deux couvoirs de palmipèdes infectés présentaient des niveaux de biosécurité défaillants (ex : absence de vide sanitaire complet des bâtiments, absence de sas pour certains bâtiments). La conduite du nettoyage et de la désinfection entre chaque bande en élevage de palmipèdes gras surtout en salle de gavage était problématique : pas d'utilisation de détergent dans un tiers des cas lors du dernier vide, désinfection non systématique après le nettoyage dans une partie des élevages, durée de vide sanitaire inférieure à 48 heures dans près de 50% des cas lors du dernier vide. Le niveau de protection sanitaire était en général faible : passage de véhicules devant le bâtiment des volailles dans près de trois quart des cas, entrée de matériel à risque sans nettoyage et désinfection dans 15% des cas, non-respect du passage par un sas dans plus de la moitié des cas.

Dans les foyers ayant plus d'un atelier (n=41), l'infection a été détectée sur plusieurs troupeaux dans seulement 22% des cas (n=9). Cependant, le statut des autres ateliers n'a pas toujours été investigué avant l'abattage. Ainsi, dans 21 foyers ayant un atelier de

palmipèdes gras infecté, il y avait d'autres ateliers de palmipèdes dont le statut n'a pas été investigué, et dans 16 foyers, il y avait des ateliers de galliformes ne présentant pas de symptôme. La capacité du virus à se transmettre d'un atelier à l'autre ne semble donc pas très élevée. Ceci est également corroboré par le fait que peu d'ateliers de galliformes ont été détectés infectés malgré une densité élevée autour de certains foyers plein-air, suggérant que la transmission par voie aéroportée serait négligeable dans cet épisode, et que des mesures de biosécurité bien mises en œuvre permettent de prévenir l'introduction du virus dans les ateliers de galliformes.

La production de palmipèdes gras est liée à la quasi-totalité des foyers, par la présence d'un atelier sur l'élevage ou par un voisinage avec un atelier de palmipèdes gras en plein air à moins de 150 m (possibilité de contacts indirects via un vecteur mécanique). Seul le premier foyer détecté au cours de l'épisode, une basse-cour de Gallus, n'a pu être relié d'aucune façon à cette production. De plus, depuis 2004, une circulation récurrente de virus H5FP a été montrée dans certains élevages de palmipèdes en France (Cherbonnel et al., 2007), ce qui démontre que cette production est un espace favorable à la circulation de virus H5. Au regard de ces éléments, le rôle des palmipèdes dans cet épisode épizootique semble donc majeur.

Au total 727 liens épidémiologiques ont été recensés entre les foyers et 483 autres élevages de volailles. Ces liens sont principalement par mouvement d'animaux (91%) : lien amont (32%), lien aval (12%) et lien par lot jumeau (47%), l'élevage en lien ayant reçu un lot identique à celui reçu par le foyer. Le voisinage à moins de 500 m correspond à 6 % des liens recensés. Les liens indirects par personnel, véhicule et matériel représentent eux 3%. Les liens par mouvements concernent dans 94% des cas des palmipèdes gras. Ceux-ci concernaient à la fois les mouvements du lot détecté infecté mais également les liens par mouvement de tous les lots de palmipèdes ayant été présents sur l'exploitation lors de l'élevage

du lot infecté et ceux du lot précédemment dans le même bâtiment qu'un lot infecté de palmipèdes (élevages fournisseurs, destinataires ou ayant reçu un lot identique). La structuration de la production en phases réalisées dans différents élevages successifs, explique cette multiplication de liens par mouvement de palmipèdes.

En moyenne, sont recensés 9,3 liens par foyer (écart type de 8,8). Le maximum est de 45 liens pour un foyer. Soixante-dix foyers avaient des liens autres que par voisinage, avec des élevages distants en moyenne de 49 km par foyer, cette moyenne variant de 6 km à 446 km. Les établissements en lien épidémiologique sont donc souvent dispersés sur plusieurs départements, généralement limitrophes.

CONCLUSION

L'analyse des caractéristiques des foyers IAHP de l'hiver 2015-2016 en France révèle le rôle primordial joué par les ateliers de palmipèdes gras dans cet épisode épizootique. L'absence de signes cliniques dans trois quarts des ateliers de palmipèdes infectés, la multiplication des liens avec d'autres élevages via le mouvement de palmipèdes et des niveaux de biosécurité souvent faibles dans cette production sont des facteurs explicatifs de l'ampleur de cette épizootie. Outre l'assainissement de la zone réglementée du sud-ouest, principalement par la vidange complète des ateliers de production de palmipèdes au printemps 2016, une action majeure porte sur la mise en place progressive dans les filières de volailles de nouvelles mesures de biosécurité définies par l'arrêté ministériel du 8 février 2016 relatif aux mesures de biosécurité applicables dans les exploitations de volailles et d'autres oiseaux captifs dans le cadre de la prévention contre l'influenza aviaire. Ce renforcement de la biosécurité devrait permettre de réduire notablement les points critiques identifiés lors des enquêtes dans les foyers.

Remerciements à tous les enquêteurs qui ont conduit ces investigations et collectes d'information dans les foyers : Brousseau P., Chapoulie M., Cluseau S., Daniel V., Darrouy Pau C., Dauba C., D'Hervez J., Diouf F., Durand I., Eddiji C., Famose C., Garric G., Gerhards A., Guyoux B., Lalande S., Le Guyader E., Lequy A., Libespere M., Mainard H., Martin F., Mery L., Nabonne V., Pellarin S., Roubineau D., Thinet A. et Viateau E.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Briand F.-X., Niqueux É., Schmitz A., Ogor K., Le Prioux A., Guillou-Cloarec C., Guillemoto C., Allée C., Le Bras M.O., Hirschaud É., Touzain F., Quenault H., Cherbonnel-Pansart M., Lemaître É., Courtillon C., Gares H., Daniel P., Fediaevsky A., Blanchard Y., Eterradossi N., van der Werf S., Jestin V., 2016. XVIII Journées francophones de virologie, Paris, 24-25 mars 2016. *Virologie* 20 (2) : 127 (O42).
- Cherbonnel, M., Lamandé, J., Allée, C. Schmitz, A., Ogor, K., Le Gall-Reculé, G., Le Bras, M.O., Guillemoto, C., Pierre, I., Picault, J.-P., Jestin, V., 2007. *Avian Dis.* (51) (Suppl. 1), 408-413.
- Le Bouquin S., Huneau-Salaün A., Hamon M., Moisson M.C., Scoizec A., Niqueux E., Schmitz A., Briand F.-X., Van De Wiele A., Bronner A., 2016. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* (75) 2-8.
- Núñez A., Brookes S.M., Reid S.M., Garcia-Rueda C., Hicks D.J., Seekings J.M., Spencer Y.I., Brown I.H., 2016. *Transbound. Emerg. Dis.* (63) 5-9.

Figure 1. Episodes de mortalité dans 12 ateliers infectés IAH5HP : évolution du taux de mortalité

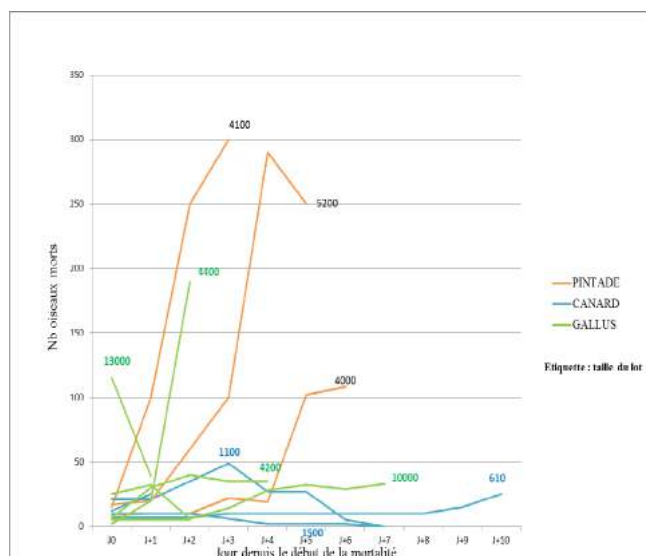


Figure 2. Histogramme de répartition des 78 entités foyers IA H5HP selon la densité d'établissements de volailles dans un rayon de 10km

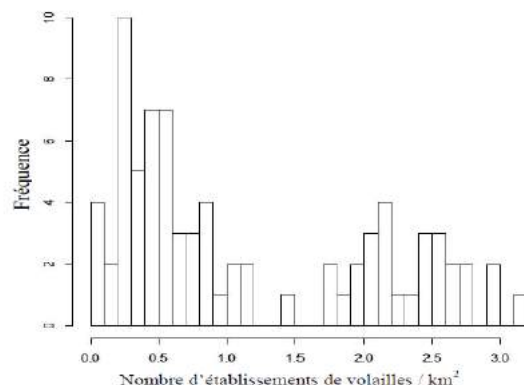


Tableau 1. Tableau clinique des 78 entités foyers IA H5 HP

Espèce des ateliers cas-index	Type de l'atelier	Clinique			Symptômes			Hém.	Chute ponté
		Asympto.	Signes cliniques	Infection concomit.	Mort.	Resp.	Nerv./ Loc.	Dig.	
Canard reproducteur	Futurs repro.		1			1			
	Repro.	2							
Canard gras	Gavage	39	11	5	10	3	1	4	3
	Dém. et PAG	6	1		1	1			
Oie grasse	Gavage		2		1	2			1
	Dém. et PAG	1	1		2	1			
Gallus	Elevage chair		4		4	3	1		
	Pondeuses		1						1
Pintade	Elevage chair		5		5	2	2	1	1
Gallus/Pintade	Elevage chair		1		1				
Basses-cours			3		3				
Total Général		48	30	5	28	13	4	5	1
Proportion des entités foyers		62%	38%	6%	36%	17%	5%	6%	1%

Tableau 2. Répartition des 78 entités foyers selon les sous-types des virus H5HP identifiés et les espèces présentes dans l'atelier infecté

Souches identifiées dans l'atelier	Basse-cour	Canard	Oie	Gallus	Pintade	Total général	Proportion
H5N1	3	6	2	3	1	15	19%
H5N1 et H5N9		5				5	6%
H5N2		7	2	1	1	11	14%
H5N2 et H5N9		1				1	1%
H5N9		21			4	25	32%
H5Nnon déterminé		20		2		22	28%

Scoizec Axelle¹, Huneau-Salaün Adeline¹, Schmitz Audrey², Briand François-Xavier², Hamon Manon³, Bronner Anne³, Niqueux Eric², Le Bouquin Sophie¹

¹ Anses, laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Épidémiologie et Bien-Être Avicoles et Cunicoles, BP53, 22440 Ploufragan

² Anses, laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Virologie, immunologie, parasitologie aviaires et cunicoles, BP 53, 22440 PLOUFRAGAN

³ Direction générale de l'Alimentation, 251 rue de Vaugirard, 75732 PARIS Cedex 15

axelle.scoizec@anses.fr

CONTEXTE et OBJECTIFS

De novembre 2015 à avril 2016, 95 foyers d'influenza aviaire (IA) ont été déclarés (77 hautement pathogènes HP et 16 faiblement pathogènes FP) dans le sud-ouest de la France. Des enquêtes épidémiologiques ont été menées par les services de l'état dans chacun des foyers HP à partir de questionnaires standardisés. L'objectif de l'étude présentée était de décrire les caractéristiques d'élevage, cliniques et épidémiologiques des foyers HP investigués. Pour cela, une analyse descriptive des données issues des 78 questionnaires épidémiologiques a été réalisée.

MATÉRIEL et MÉTHODES

POPULATION D'ÉTUDE

- 77 foyers IAHF correspondant à 78 élevages distincts
- répartis dans 9 départements



METHODE D'ENQUETE

- Questionnaire standardisé**
 - plusieurs versions utilisées
 - une trame générale commune
 - 78 questionnaires réalisés
- Enquêteurs**
 - agents des DD(CS)PP des départements concernés
 - une équipe Anses/CIREV sud ouest (10 enquêtes)
 - Au total : 28 enquêteurs distincts recensés

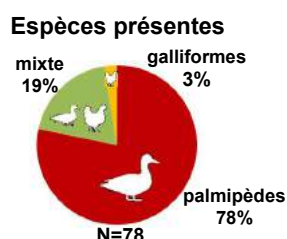
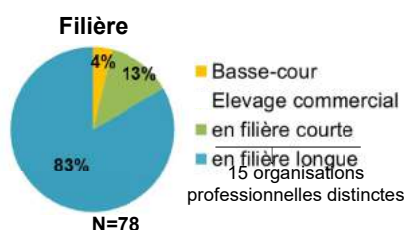
TRAITEMENT DES DONNEES

- Questionnaire conçu au départ pour la gestion d'un foyer**
- Volonté d'une exploitation des données à l'échelle de l'épizootie:**
 - centralisation des questionnaires
 - et saisie des données (par la CIREV sud ouest)
- Analyse descriptive**

RÉSULTATS

CARACTERISTIQUES D'ELEVAGE DES FOYERS

78 élevages, en moyenne 2,8 ateliers/foyer, 48% avec un seul atelier



Mode d'élevage

- 45% des foyers avec des ateliers de volailles élevées en plein air ou semi plein air
- 95% des foyers avec des lots de volailles ayant été élevées en plein air ou semi plein air une partie de leur vie

Profil majoritaire des foyers

Un atelier de palmipèdes gras, avec au moins un autre atelier dans 50% des cas, pouvant être un atelier de galliformes dans 20% des cas

CARACTERISTIQUES CLINIQUES DES FOYERS

Tableau clinique des 78 ateliers cas index des foyers IA H5HP

Type atelier index	N	Clinique	Mortalité	Si mortalité : taux rapporté
Palmipèdes gras	61	25% (15/61)	23% (13/61)	3 à 30%
Palmipèdes repro	3	1/3	0/3	
Galliformes chair	10	100% (10/10)	100% (10/10)	2 à 7% en Gallus et 12 à 17% en Pintades
Pondeuses	1	1/1	0/1	
Basse-cours	3	3/3	3/3	24 à 70%
Total	78	38%	36%	grande variabilité

Sous estimation probable de la proportion de foyers asymptomatiques : surveillance active sur une zone restreinte + surveillance exclusivement clinique pour les galliformes

- Manifestations cliniques majeures** : mortalité augmentée dans 95% des cas cliniques et symptômes respiratoires dans 43% des cas cliniques (de la toux jusqu'à la détresse respiratoire)
- Infection concomitante** : rapportée dans 5/11 des cas cliniques en salles de gavage (coryza, entéroxémie, choléra aviaire), rôle probable dans l'apparition de la mortalité sur les palmipèdes

Différence entre espèces

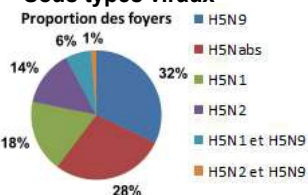
75% des foyers de palmipèdes gras asymptomatiques
100% des foyers de galliformes symptomatiques

Expression clinique variable dans les foyers symptomatiques

simple chute de ponte en pondeuses, 2 à 30% de mortalité en lot de volailles

CARACTERISTIQUES EPIDEMIOLOGIQUES DES FOYERS

Sous types viraux



Les sous types semblent liés ni à une espèce, ni à un niveau de pathogénicité.

Pratiques d'élevage

Nombreux points critiques concernant les risques d'introduction, de diffusion et de maintien du virus :

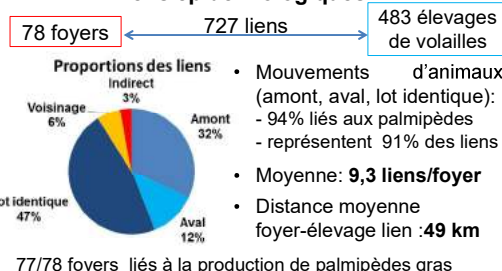
- Gestion entre bandes (ex)**
 - nettoyage sans détergent (33%)
 - désinfection non systématique
 - vide inférieur à 48H (50%), en gavage
- Général (ex)**
 - passage de véhicule à proximité des bâtiments (75%)
 - non respect du passage par sas (50%)

Transmission

Transmission aéroportée négligeable et mesures de biosécurité prévenant l'introduction dans les ateliers galliformes :

- 16 foyers avec atelier(s) infecté(s) de palmipèdes gras et des galliformes indemne(s) cliniquement
- peu d'ateliers de galliformes détectés infectés malgré une densité élevée autour de certains foyers plein air.

Liens épidémiologiques



Liens nombreux, distants et majoritairement liés à la filière palmipèdes

CONCLUSION

En conclusion, les ateliers de palmipèdes gras ont joué un rôle primordial dans l'ampleur de cette épizootie d'IAH5HP, de part l'absence de signes cliniques dans trois quart des cas en palmipèdes gras, la multiplication des liens avec d'autres élevages via les mouvements de palmipèdes et les niveaux faibles de biosécurité dans cette filière. Le renforcement de la biosécurité (arrêté ministériel du 8 février 2016) devrait permettre de réduire les points critiques de la filière.

DIVERSITE GENETIQUE DES VIRUS H5 HAUTEMENT PATHOGENES DETECTES DANS LE SUD-OUEST DE LA FRANCE EN 2015-2016

**Briand Francois-Xavier¹, Audrey Schmitz¹, Hirchaud Edouard², Quenault Hélène²,
Blanchard Yannick², Marie-Odile Le Bras¹, Chantal Allée¹, Le Prioux Aurélie¹, Guillou-
Cloarec¹, Ogor Katell¹, Gares Hélène³, Daniel Patrick⁴, Fediaevsky Alexandre⁵, Massin
Pascale¹, Le Bouquin Sophie⁶, Martenot Claire¹, Eterradosi Nicolas¹, Niqueux Eric¹**

¹Anses Unité VIPAC- 41, Rue de Beaucemaine - 22440 PLOUFRAGAN,

²Anses Unité GVB- 41, Rue de Beaucemaine - 22440 PLOUFRAGAN,

³Laboratoire Départemental d'Analyses et de Recherche -24138 COULOUNIEUX CHAMIE,

⁴Laboratoire des Pyrénées et des Lande- 40000 MONT-DE-MARSAN,

⁵Direction Générale de l'Alimentation - 75732 PARIS,

⁶Anses Unité EBEAC- 41, Rue de Beaucemaine - 22440 PLOUFRAGAN.

francois-xavier.briand@anses.fr

RÉSUMÉ

Depuis l'identification d'un virus H5N1 hautement pathogène en Dordogne fin novembre 2015 sur des poulets de basse-cour (première détection d'un tel virus en France depuis 2007), 81 foyers en élevage ont été identifiés dans dix départements du sud-ouest de la France. Ces virus ont principalement été mis en évidence dans des élevages de palmipèdes mais également dans des élevages de poulets ou pintades. L'analyse des séquences d'hémagglutinine des virus identifiés dans ces différents foyers a montré qu'elles sont toutes directement apparentées entre elles (site de clivage original HQRKRGLF), ainsi qu'avec des virus H5 faiblement pathogènes ayant précédemment circulé en Europe, mais qu'elles ne sont pas directement apparentées aux séquences des H5 hautement pathogènes de la lignée Gs/Gd/1/96 (potentiellement zoonotique). Grâce à des analyses de « Time of the Most Recent Common Ancestor » (tMRCA), l'âge de l'ancêtre commun de ces séquences H5 hautement pathogènes a été estimé à début 2014 (± 1 an). De plus, la détermination du gène de la neuraminidase a permis d'identifier 3 sous-types (N1, N2, N9), indiquant que des phénomènes de réassortiment ont déjà eu lieu avec d'autres virus Influenza aviaires. L'étude des gènes internes obtenus jusqu'à présent pour plusieurs virus H5N1, H5N2 et H5N9 hautement pathogènes, conforte l'idée que de nombreux réassortiments ont déjà eu lieu, indiquant un nombre important de co-infections depuis l'apparition du premier virus H5 hautement pathogène.

ABSTRACT

Genetic diversity of highly pathogenic H5 viruses detected in South-West of France during 2015-2016

Since the identification of highly pathogenic H5N1 in Dordogne in late November 2015 in backyard chickens (first detection of such viruses in France since 2007), 81 different outbreaks have been identified in ten departments of South-Western France. These viruses have mainly been demonstrated in farms of waterfowl but also in chickens or guinea fowl flocks. Preliminary analysis of the hemagglutinin sequences of the viruses identified in these outbreaks has shown that they are all directly related (original cleavage site HQRKRGLF) and with low pathogenic H5 virus had previously circulated in Europe, but they are not related to the highly pathogenic H5 lineage Gs / Gd / 1/96 (zoonotic potential). Through analysis of "Time of the Most Recent common ancestor", it was also estimated that the common ancestor of the highly pathogenic H5 sequences detected in South-Western France could date back to early 2014 (± 1 year). Moreover, the determination of the neuraminidase gene identified three subtypes (N1, N2, N9) in these viruses, indicating that reassortment events did already occur with other avian influenza viruses. The study of internal genes obtained to date for several H5N1, H5N2 and H5N9 highly pathogenic, supports the idea that many reassortment events did occur. This indicates that a large number of co-infections with highly pathogenic H5 and other influenza viruses did take place since the first highly pathogenic H5 virus emerged.

INTRODUCTION

Les oiseaux aquatiques sont le réservoir des Influenzavirus aviaires (AIV). Le génome des AIV est segmenté en 8 brins d'ARN négatifs codant pour 11 protéines, parmi lesquelles l'hémagglutinine (qui, une fois clivée dans le milieu extérieur, permet au virus entrant dans une nouvelle cellule de se lier à son récepteur) et la neuraminidase (qui permet aux particules virales nouvellement formées de se détacher de la cellule infectée). Actuellement 16 types d'hémagglutinines et 9 types de neuraminidases ont été décrits chez les oiseaux (Fouchier et al., 2005). L'évolution génétique de ces virus peut provenir de différents mécanismes incluant des mutations, des insertions, des délétions, et des réassortiments (Webster et al., 2007). Les mutations sont dues aux erreurs engendrées par le complexe polymérase au cours de la réplication. Ces mutations peuvent notamment changer le motif du site de clivage de la protéine HA, et par exemple le rendre facilement clivable dans tous les tissus de l'organisme, ce qui transforme les virus de sous-types H5 ou H7 faiblement pathogènes (FP) en virus hautement pathogènes (HP). Par ailleurs, des délétions peuvent également être observées sur la neuraminidase lors de l'adaptation du virus aux volailles domestiques (Matrosovich et al., 1999). Enfin, le dernier phénomène pouvant faire évoluer les virus Influenza provient de leur capacité à réassortir entre eux. En effet, lorsque plusieurs virus infectent simultanément un même hôte et se retrouvent au sein d'une même cellule, les virus résultant de cette co-infection peuvent partager des gènes hérités des différents virus parents, phénomène ayant par exemple généré les virus pandémiques (Kawaoka et al., 1989).

L'infection par des virus H5 ou H7 FP peut être asymptomatique chez les oiseaux sauvages ou domestiques mais elle peut également entraîner des symptômes non négligeables en cas de co-infections avec d'autres agents pathogènes. De plus, du fait de leur capacité à devenir hautement pathogènes, la présence des virus H5 ou H7 FP chez les volailles est indésirable et fait l'objet d'une réglementation internationale.

De novembre 2015 à décembre 2016, 81 foyers d'IA HP, appartenant à 3 sous-types différents (H5N1, H5N2, H5N9), ont été détectés dans les départements du sud-ouest de la France dans des élevages de canards domestiques ainsi que dans des élevages de poules ou pintades. Afin de mieux comprendre l'évolution génétique (mutations/réassortiments) des virus H5HP, le séquençage complet de 15 d'entre eux a été entrepris.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Détection, sous-typage et pathotypage moléculaire.

Dans un premier temps, les ARN viraux ont été extraits à partir de mélanges de 5 surnageants d'écouvillons trachéaux ou cloacaux (RNeasy mini kit, Qiagen). Ces ARN ont ensuite été testés en rRT-PCR gène M ainsi qu'en rRT-PCR H5 par les laboratoires départementaux agréés. Dans un second temps, les échantillons criblés positifs ont été expédiés au Laboratoire National de Référence pour l'Influenza aviaire et la maladie de Newcastle afin de déterminer la séquence nucléotidique codant la zone de clivage de l'hémagglutinine, par RT-PCR H5 KHA1/KHA3 (Slomka et al., 2007). La séquençage d'une partie du gène de la neuraminidase est également réalisé pour déterminer le type de neuraminidase (RT-PCR PanNA ; Gall et al., 2009). Les produits issus de ces deux RT-PCR ont ensuite été séquencés comme décrit précédemment (Briand et al.).

1.2. Isolement viral

A partir des écouvillons cloacaux ou trachéaux individuels certains virus H5 HP ont été isolés/multipliés sur des œufs embryonnés exempts d'organismes pathogènes spécifiés de 9 jours inoculés par voie intra-allantoïdienne. Les virus ainsi multipliés ont été identifiés par inhibition de leur activité hémagglutinante à l'aide d'antisérums de référence selon les recommandations internationales.

1.3. Préparation des bibliothèques, séquençage des génomes par Next Generation Sequencing (NGS), obtention des séquences génomiques

Les ARN les plus positifs en RT-PCR gène H5 ainsi que les ARN extraits de virus H5 HP isolés sur œufs ont été sélectionnés afin de déterminer les séquences complètes des génomes viraux par NGS. Une première étape a consisté à appliquer un traitement par DNase (DNA-free kit ; Ambion) ainsi qu'un traitement réduisant la quantité d'ARN ribosomique (Low Input RiboMinus Eukaryote System Kit ; Ambion). Les ARN ainsi obtenus ont alors été fragmentés par un traitement RNase avant d'être ligés à des adaptateurs nucléotidiques afin de créer les bibliothèques (Ion Total RNA-Seq Kit ; Life Technologies). Après validation de la qualité des bibliothèques, le séquençage a été réalisé par un séquenceur Ion Proton (Life Technologies) disponible sur la plateforme NGS/Transcriptomique (Anses, Ploufragan). Les séquences (*reads*) obtenus ont alors été nettoyés par le logiciel Trimmomatic 0.32 puis alignés avec un génome de référence par le logiciel Bowtie 2 afin d'obtenir une séquence consensus des génomes viraux étudiés. Par sécurité, ces séquences ont alors été comparées avec les séquences consensus recrées par assemblage *De Novo* des *reads* de départ.

1.4 Analyses phylogéniques et génotypage

Pour chacun des huit segments des virus Influenza, une analyse phylogénique a été effectuée. Pour cela les différentes séquences ont été alignées aux séquences les plus proches de celles des virus H5 HP français disponibles dans les banques de données internationales. La reconstruction de l'arbre phylogénétique par méthode bayésienne et l'estimation des âges (date à laquelle circulait l'ancêtre commun) des différentes ancêtres communs ont été réalisées en utilisant le logiciel BEAST.

La détermination des différents génotypes ainsi que l'estimation du nombre de recombinaisons depuis l'apparition du site de clivage hautement pathogène a été basée sur la comparaison de l'âge des ancêtres commun du gène H5 HP avec l'âge des ancêtres commun obtenus pour chaque groupe obtenu pour les autres gènes. En effet, pour chaque gène, différents groupes phylogénétiques ont été définis si l'ancêtre commun de 2 groupes a été trouvé antérieur à l'estimation de l'âge de l'ancêtre commun de tous les gènes H5 HP français.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

15 virus H5 HP provenant d'élevages du sud-ouest de la France ont été entièrement séquencés. Sur ces 15 virus, 5 correspondent à des virus H5N1, 5 à des H5N2 et 5 à des H5N9. Ces virus présentent tous un site de clivage polybasique de l'hémagglutinine correspondant à des virus hautement pathogènes (motif de clivage original : HQRKR/GLF). L'analyse phylogénique du gène H5 (Figure 1), indique bien que ces virus H5 HP français de 2015-2016 sont tous directement apparentés et que la date de circulation de leur ancêtre commun est estimée autour de début 2014 (± 1 an). L'analyse phylogénique du gène H5 a également permis de mettre en évidence 2 différents sous-clusters. Le premier sous-groupe est composé des virus H5N2 et H5N9 alors que le second groupe est composé uniquement par des virus H5N1. L'analyse phylogénique des 7 autres gènes a permis d'identifier plusieurs génogroupes. Notamment pour le gène PB2, 4 groupes phylogénétiques différents ont pu être identifiés (Figures 2). De la même manière,

pour les gènes PA, NP, NA et NS 4 groupes ont également été identifiés. Pour les gènes PB1 et M, 5 clusters différents ont pu être définis. Malgré la présence de plusieurs groupes phylogénétiques, toutes les séquences des 15 virus H5 HP français appartiennent à la lignée eurasiennne mais sont différentes de celles des gènes retrouvés chez des virus H5N1 HP de lignée asiatiques (Gs/Gd/96). Ces différents groupes phylogénétiques ainsi identifiés, ont permis de déterminer le génotype de chacun des virus (Tableau 1). Pour les 15 H5 virus détectés, 10 virus présentent des génotypes différents indiquant ainsi qu'au moins 9 événements de réassortiment ont eu lieu depuis l'apparition du site de clivage hautement pathogène des virus H5 ayant été découverts dans le sud-ouest de la France entre novembre 2015 et juillet 2016. Ce nombre important de réassortiments indique que de nombreuses co-infection ont eu lieu.

Afin de tenter d'éradiquer le virus H5 HP, un vide sanitaire a été appliqué du 18 avril au 16 mai dans les élevages de production de canards (prêts-à-gaver, en cours de gavage) dans les départements du sud-ouest. Malgré ce vide sanitaire, du virus H5 HP a été détecté dans 4 élevages en juillet 2016. Deux des quatre virus ont été entièrement séquencés et présentent le même génotype que la majorité des H5N1 HP détectés avant le vide sanitaire. Ce résultat semble indiquer que ces virus ne proviennent pas de l'introduction d'un nouveau virus hautement pathogène mais serait le fait de la détection de quelques cas sporadiques restant encore sur le terrain (même après action du vide sanitaire).

CONCLUSION

De novembre 2015 à juillet 2016, la France a été confrontée à un très grand nombre de foyers d'Influenza H5 hautement pathogène. L'analyse des séquences des virus a permis de démontrer que ces virus étaient apparus bien avant leur première détection, permettant ainsi d'évoluer et de réassortir. Afin de contrôler au mieux l'émergence de nouveaux virus HP ou la réémergence de virus H5HP déjà existants, il est essentiel de continuer et/ou renforcer la surveillance des virus Influenza sur le territoire français en particulier dans les élevages de palmipèdes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Briand, F.X., Le Gall-Reculé G, Guillou-Cloarec C, Ogor K, Jestin V. (2010). J Gen Virol, Apr;91(Pt 4):960-70.
- Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B., Osterhaus A.D. (2005). J Virol, 79, 2814-2822
- Gall, A., B. Hoffmann, T. Harder, C. Grund, R. Ehrlich, and M. Beer. (2009). J Clin Microbiol 47:2985-8.
- Kawoka, Y., Krauss, S., Webster, R.G. (1989). J Virol, 63, 2189-2191.
- Matrosovich, M., Zhou, N., Kawoka, Y., Webster, R.G. (1999). J Virol. 73(2),1146-1155
- Slomka, M.J.; Coward, V.J.; Banks, J.; LöndtZ.; Brown, I.H.; Voermans, J.; Koch, G.; Handberg, K.J.; Jørgensen, P.H.; Cherbonnel-Pansart, M.; Jestin, V.; Cattoli, G.; Capua, I.; Ejdersund, A.; Thorén, P.; Czifra, G. (2007). Avian Dis Mar, 51 (1 suppl) :227-34
- Webster, R.G., Krauss, S., Hulse-Post, D., Sturn-Ramirz, K. (2007). J Wildlife Diseases, 43(3)

Tableau 1. Génotypage de 15 virus H5 hautement pathogènes détectés dans le Sud-Ouest de la France en 2015-2016.

	Après vide		Avant vide sanitaire												
Hôte	poulet	canard	poulet	canard	canard	pintade	canard	pintade	canard	poulet	poulet	poulet	canard	oie	canard
departement	24	24	24	40	24	40	24	40	64	64	64	40	64	65	32
Subtype	H5N1	H5N1	H5N1	H5N1	H5N1	H5N9	H5N9	H5N9	H5N9	H5N9	H5N2	H5N2	H5N2	H5N2	H5N2
Virus Identifiant	160678	160683	150169	150253	150206	150223	150289	150207	150236	160102	160001	160013	160014	150294	150233
PB2															
PB1															
PA															
HA															
NP															
NA															
M															
NS															

Pour chaque ligne, chaque niveau de gris représente un groupe phylogénétique différent.

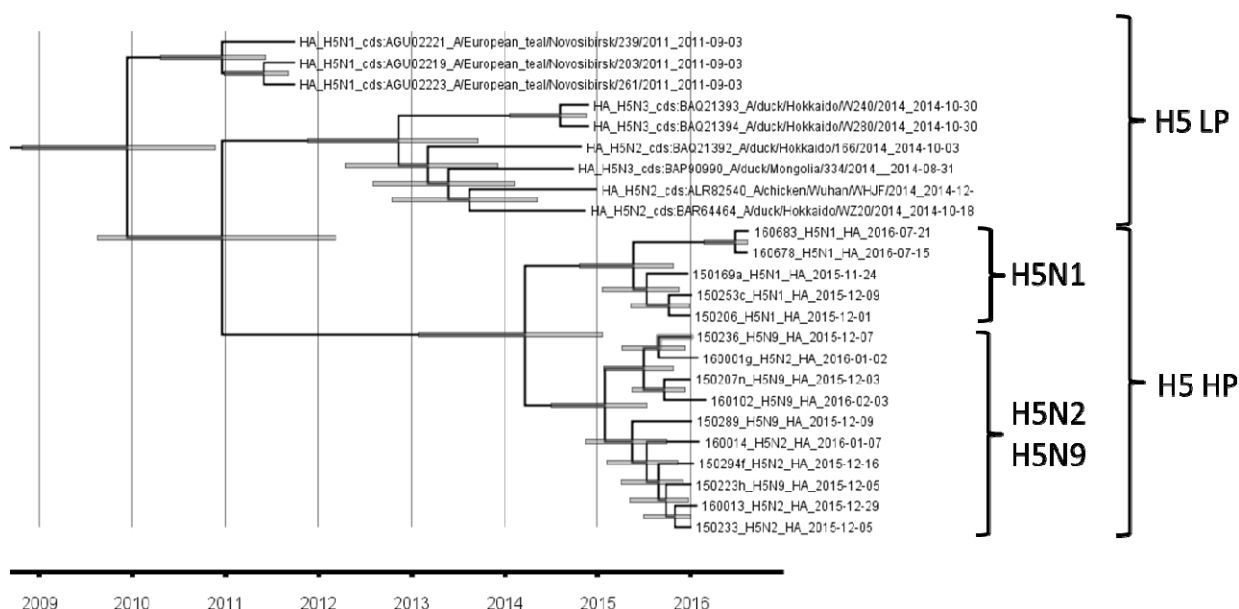


Figure 1.

Arbre MCC (maximum clade credibility) basé sur 1695 nucléotides du gène H5. Les barres horizontales présentent les intervalles de confiance (95% HPD) de la date estimée des ancêtres communs de chacun des nœuds de l'arbre.

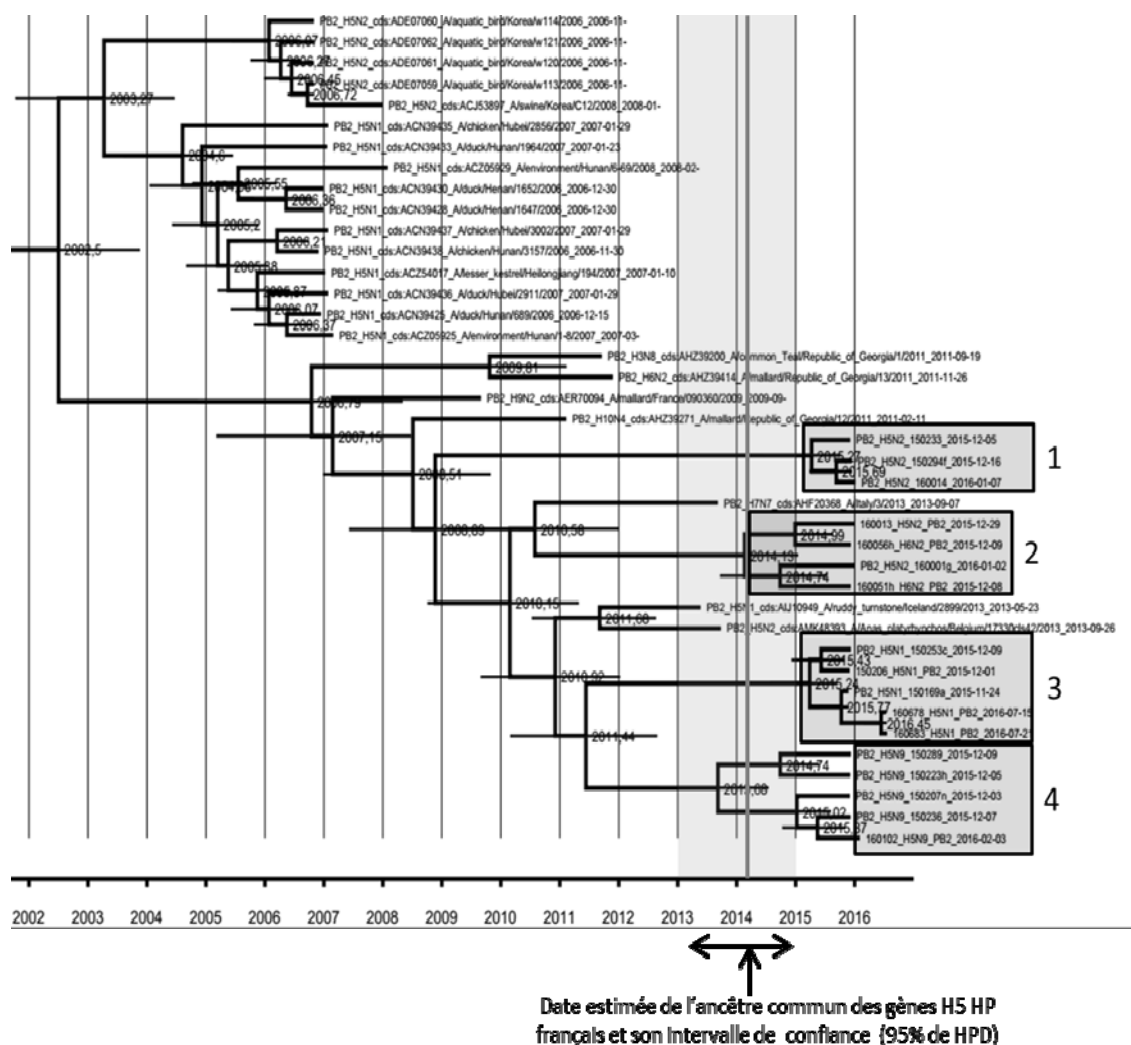


Figure 2.

Arbre MCC (maximum clade credibility) basé sur 2280 nucléotides du gène PB2. Les barres horizontales présentent les intervalles de confiances (95% HPD) de l'âge estimés des ancêtres communs de chacun des nœuds de l'arbre. Les 4 génogroupes différents identifiés pour les virus H5 HP français sont marqués par un rectangle gris.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE LA VIRULENCE D'UN INFLUENZAVIRUS AVIAIRE HAUTEMENT PATHOGÈNE H5N9 : CINÉTIQUES D'EXCRÉTION VIRALE, DE TRANSMISSION ET D'APPARITION DES ANTICORPS CHEZ LE CANARD DE BARBARIE

Niqueux Éric¹, Le Prioux Aurélie¹, Allée Chantal¹, Lebras Marie-Odile¹,
Pierre Isabelle¹, Guillou Cloarec Cécile¹, Ogor Katell¹, Guillemoto Carole¹,
Amelot Michel², Courtois David², Briand François-Xavier¹, Schmitz Audrey¹,
Keïta Alassane², Eterradosi Nicolas¹

¹Anses, unité VIPAC, LNR influenza aviaire - BP 53 - 22440 PLOUFRAGAN, France,

²Anses, SELEAC - BP 53 - 22440 PLOUFRAGAN, France,

^{1 et 2}Université Bretagne Loire, France

eric.niqueux@anses.fr

RÉSUMÉ

Depuis novembre 2015, 81 foyers d'infection à influenza virus aviaires hautement pathogènes (IAHP) de sous-type H5 ont été détectés en élevages de volailles (en majorité des palmipèdes domestiques) dans le Sud-Ouest de la France : des virus du sous-type H5N9 ont été le plus fréquemment identifiés. Une étude expérimentale de la réceptivité et de la sensibilité du canard de Barbarie à ces nouvelles souches a été entreprise afin de mieux comprendre la dynamique de l'infection, son tropisme et la cinétique d'induction des anticorps post-infectieux.

Un groupe de 6 canards de Barbarie exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) a été infecté par voie oculaire avec le virus IAHP H5N9 A/duck/France/150236b/2015, et un second groupe de 12 sujets contacts naïfs a été introduit 24 heures plus tard. L'excrétion et la cinétique de transmission du virus ont été suivies par RT-PCR temps réel à partir d'écouvillons oropharyngés et cloacaux individuels. Tous les canards inclus dans l'étude ont été excréteurs dans les 24 heures suivant l'infection expérimentale ou la mise en contact, sans signe clinique majeur durant toute la durée de l'étude (20 jours). Cette excrétion a persisté de façon continue pendant 6 à 9 jours par voie oropharyngée et pendant 7 à 13 jours par voie intestinale. La séroconversion de la totalité des sujets a pu être démontré par ELISA NP à partir de 7 jours après l'inoculation, et à partir de 14 jours après l'inoculation chez la majorité des sujets, par ELISA H5 et par la technique d'inhibition de l'hémagglutination vis-à-vis de l'antigène homologue au virus d'épreuve.

Ces résultats d'analyses sérologiques et virologiques sont similaires aux données précédemment obtenues lors d'infections expérimentales du canard de Barbarie EOPS par des virus IA H5 faiblement pathogènes.

ABSTRACT

Experimental infection with H5N9 highly pathogenic avian influenza virus: virus shedding, transmission and antibody production patterns in Muscovy ducks

Since November 2015, 81 outbreaks of H5 highly pathogenic avian influenza virus (HPAI) infection have been detected in poultry (usually domestic waterfowl) in south-western France: H5N9 HPAI appeared to be the most frequent. The receptivity and sensitivity of Muscovy ducks to these novel strains were assessed experimentally, in order to characterize the dynamics of infection, the virus shedding tropism and pattern, and the kinetics of antibody production after infection.

6 specific pathogen free (SPF) Muscovy ducks were inoculated intra-ocularly with HPAI A/duck/France/150236b/2015, and 12 contact ducks were introduced 24 hours later. Virus shedding and transmission were monitored by real-time RT-PCR on individual oropharyngeal and cloacal swabs. All ducks began shedding the virus 24 hours after inoculation or contact, and no major clinical signs were observed up to the end of the study (20 days). Oropharyngeal shedding persisted for continuous periods of 6 to 9 days, and intestinal shedding for 7 to 13 days. As soon as 7 days after inoculation, seroconversion was detected by NP ELISA in all ducks; and at 14 days after inoculation, seroconversion was detected in a majority of birds by H5 ELISA and hemagglutination inhibition tests against the homologous HPAI H5N9 antigen.

These virological and serological results are similar to previous observations from experimental infections of SPF Muscovy ducks with low pathogenic H5 AI.

INTRODUCTION

L'influenza aviaire est une maladie infectieuse pouvant toucher toutes les espèces d'oiseaux sauvages et domestiques, qui est classée comme danger sanitaire de première catégorie. Depuis novembre 2015, le Sud-Ouest de la France connaît un épisode d'infections chez les volailles par des virus influenza aviaries hautement pathogènes (IAHP) de sous-type H5, sans précédent au niveau national. 66 des 81 foyers déclarés jusqu'en août 2016 ont concerné des élevages de palmipèdes domestiques, et des signes cliniques et de la mortalité n'ont été signalés que pour 15 d'entre eux. Le caractère HP des virus IA H5 mis en évidence a toutefois été confirmé par séquençage du gène de l'hémagglutinine et par des tests *in vivo* de pathogénicité par voie intra-veineuse chez le poulet. Au moins trois sous-types de neuraminidase différents (N1, N2 et N9) ont été associés aux virus en cause : les virus IAHP H5N9 ont été le plus fréquemment identifiés, dans 31 foyers dont 6 foyers en co-infection avec l'un des deux autres sous-types (Le Bouquin *et al.*, 2016 ; données non publiées). Compte tenu de la présentation clinique modérée, observée sur le terrain chez les palmipèdes, une étude d'infection expérimentale par l'un de ces nouveaux virus a été mise en place afin de caractériser la réceptivité et la sensibilité du canard de Barbarie. Cette espèce a été retenue comme modèle d'étude, puisqu'elle constitue une partie du cheptel reproducteur de la filière de production de canard gras et qu'elle représente environ 80% de la filière de production du canard de chair. Une meilleure connaissance de la cinétique d'infection et de son tropisme, de l'excrétion et de la transmission du virus, et de la cinétique de production des anticorps chez l'animal infecté contribuera à l'interprétation des analyses de laboratoire et à l'évaluation du risque lié à l'infection par ces virus chez les palmipèdes.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Procédure d'expérimentation animale

Animaux

Les canards de Barbaries exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) proviennent de l'élevage de l'Anses – laboratoire de Ploufragan. Les animaux sont élevés en conditions confinées, atmosphère filtrée, et contrôlés vis-à-vis de l'infection par 20 bactéries ou virus aviaries, incluant les virus IA.

Dispositif expérimental

2 groupes de canards de Barbarie EOPS de 3 semaines (mâles et femelles) ont été constitués :

- 6 canards ont été infectés par instillation oculaire d'une dose de 10^6 DIE₅₀ (dans un volume de 100 µl) du virus H5N9 HP A/duck/France/150236b/2015 ;
- 12 canards contacts non infectés sont introduits dans le même enclos 24 heures après inoculation.

Le statut séronégatif et vironégatif individuel des canards a été préalablement vérifié vis-à-vis des virus IA, en ELISA NP, en ELISA H5 et en RT-PCR temps réel (r-RT-PCR) selon les méthodes décrites en 1.2.

Les animaux occupaient un enclos de 10 m² paillé au sol, et avaient un accès libre à l'eau et à la nourriture.

La procédure d'expérimentation animale a fait l'objet d'un avis favorable du comité d'éthique institutionnel (ComEth Anses/ENVA/UPEC, avis 11/12/14 sur le projet 12-061) et a été conduite en accord avec les législations européennes et françaises.

Prélèvements et examen clinique

Des écouillons oropharyngés et cloacaux ont été prélevés individuellement quotidiennement après l'inoculation (sauf le 12^e et le 18^e jour) et jusqu'à la fin de l'étude au 20^e jour. Les animaux ont également fait l'objet d'un examen clinique quotidien (observation des signes généraux, respiratoires, nerveux et cutanés éventuels). Des prélèvements sanguins individuels sans anticoagulants ont été réalisés 7, 14 et 20 jours après l'inoculation.

1.2. Analyses de laboratoire

Les écouillons individuels ont été repris, lysés et extraits comme décrit précédemment (Niqueux *et al.*, 2014). Le génome du virus influenza aviaire de type A a été recherché par RT-PCR temps réel (rRT-PCR) ciblant le gène M selon une méthode dérivée du manuel de diagnostic européen (Cherbonnel *et al.*, 2013 ; JOCE, 2006). Une valeur-seuil de positivité a été établie à partir des valeurs brutes de Ct en rRT-PCR obtenues à partir d'une série de dilutions de raison 10 d'un stock de virus H5N9 HP A/duck/France/150236b/2015 titrés en parallèle sur œufs embryonnés de poules EOPS : soit une dose équivalente à 2 DIE₅₀ / réaction PCR (Niqueux *et al.*, 2014).

Les sérums ont été testés individuellement par techniques ELISA par compétition (trousses commerciales) pour la recherche d'anticorps anti-influenza aviaire de type A (Influenza A virus Antibody test kit, Idexx Laboratories) et anti-H5 (ID Screen Influenza H5 Antibody Competition, ID Vet). Les valeurs d'indice de densité optique obtenues ont été interprétées selon la notice en vigueur du fournisseur. Des analyses ont également été effectuées par technique d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) selon la méthode normalisée (AFNOR, 2013) :

- avec des antigènes issus de souches IAHP isolées en 2015 en France : H5N9 A/duck/France/150236b/2015 et H5N1 A/chicken/France/150169a/2015 ;
- avec les antigènes recommandés pour les plans nationaux de surveillance, issus de souches IA faiblement pathogènes (FP) françaises : H5N3 A/Muscovy duck/France/070090b/2007 et H5N2 A/chicken/France/03426a/2003 ;
- et avec les antigènes recommandés par le LRUE pour le plan de surveillance européen annuel : H5N3 A/teal/England/7394-2805/2006, H5N1 A/chicken/Scotland/1959

et H5N8 A/duck/England/036254/2014.
Le seuil de positivité retenu est de 16.

1.3. Analyse des données

Les valeurs brutes de Ct obtenues en r-RT-PCR ont été interprétées qualitativement en fonction du seuil de positivité précédemment défini, afin d'estimer la période d'excrétion du virus. Cette durée a été déterminée séparément pour la voie oropharyngée et la voie cloacale comme le nombre de jours consécutifs où des résultats positifs sont détectés (incluant le cas échéant un résultat négatif isolé encadré par deux résultats positifs).

Les valeurs brutes de Ct ont également été normalisées en équivalents de DIE_{50} / réaction de PCR (en base $\log_{10}$), en utilisant une gamme d'ARN étalon de concentration connue pour chaque essai et une courbe de calibration pour la transformation en équivalents de DIE_{50} . La quantité totale de virus excrété a été estimée en calculant l'aire sous la courbe (ASC) d'excrétion en fonction du temps, en ne retenant que l'intervalle de temps correspondant à la période d'excrétion précédemment définie : la méthode d'interpolation trapézoïdale définie par Brown *et al.* (2009) a été utilisée. Si nécessaire, la valeur-seuil de 2 DIE_{50} / réaction PCR a été attribuée aux éventuels résultats négatifs obtenus.

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Signes cliniques (Tableau 1)

Au cours de l'étude expérimentale, seuls des symptômes respiratoires discrets (jetage ou râles et sifflements) ont été constatés très fréquemment du 3^e au 8^e jour après l'inoculation chez les canards infectés, et du 4^e au 8^e jour après mise en place chez les canards contacts. Des observations isolées ont également été notées aux 10^e, 11^e et 14^e jours.

Excrétion virale (Tableau 1 et Tableau 2)

L'excrétion virale chez les canards infectés a débuté par voie oropharyngée et cloacale dès 24 heures après inoculation. Cependant, l'excrétion intestinale a été légèrement retardée chez les canards contacts : tous les sujets excrétaient par voie oropharyngée 24 heures après leur mise en place, alors que seuls 7 canards contacts / 12 présentaient des charges virales détectables par voie cloacale. L'excrétion oropharyngée et cloacale a été complète à partir de 48 heures après la mise en contact.

Ce décalage a été également retrouvé au niveau de l'importance du délai entre le pic d'excrétion oropharyngée et le pic d'excrétion cloacale. Chez les canards inoculés, le pic d'excrétion cloacal était contemporain ou décalé d'au plus 24 heures par rapport au pic oropharyngé. Chez 9 canards contacts / 12, le retard du pic cloacal a atteint 3 à 7 jours.

Cependant, les autres indices de comparaison des profils d'excrétion du virus IAHP H5N9 ont présenté le même aspect entre le groupe de canards de Barbarie inoculés et le groupe de canards de Barbarie contacts.

Dans les deux groupes, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les valeurs maximales de titres oropharyngés et cloacaux, la durée d'excrétion par voie cloacale était significativement plus longue que par voie oropharyngée et en conséquence, l'indice ASC cloacal était significativement plus élevé que l'ASC oropharyngée, indiquant une charge d'excrétion intestinale totale plus forte que l'excrétion respiratoire totale chez le canard de Barbarie.

L'ensemble des résultats obtenus a montré que le virus IAHP H5N9 testé n'a pas présenté de tropisme respiratoire préférentiel chez le canard de Barbarie EOPS de 3 semaines.

Cinétique de l'immunité humorale spécifique (Tableau 3)

Tous les sérums prélevés au 20^e jour après l'inoculation étaient positifs en ELISA NP, en ELISA H5 et en test IHA vis-à-vis de l'antigène H5N9 HP homologue au virus d'épreuve. Bien que partielle pour les sérums prélevés au 14^e jour, la séroconversion a été détectée chez la majorité des canards testés en ELISA H5 (12 sérums positifs / 18) et en IHA homologue (16 sérums avec un titre IHA $\geq$ 16, pour 18 sérums testés).

Les tests IHA vis-à-vis des autres antigènes H5 utilisés ont présenté une proportion plus faible (moins de 12 sérums / 18) de sérums avec des titres IHA $\geq$ 16, lors de l'analyse des prélèvements au 14^e et au 20^e jour. De plus, aucun des sérums testés n'était détecté en IHA vis-à-vis de l'antigène H5N8 A/duck/England/036254/2014 (cet antigène étant connu a priori pour son faible croisement antigénique avec les autres virus IA H5).

Toutefois, l'ensemble des sérums testés étaient positifs en ELISA NP dès le 7^e jour après inoculation.

CONCLUSION

Les canards de Barbarie EOPS de 3 semaines étaient très réceptifs à l'infection par le virus IAHP H5N9 isolé en France en 2015, mais ont été très peu sensibles au développement de signe clinique. Toutefois, la transmission à des sujets contacts a été très efficace et très rapides : la totalité des animaux introduits ont été infectés et sont devenus excréteurs en moins de 24 heures après leur introduction.

De plus, l'excrétion du virus est restée majoritairement intestinale, bien que le niveau maximal d'excrétion par voie respiratoire ait été équivalent à celui observé par voie cloacale. Le profil de cinétique d'excrétion de ce virus est donc resté identique à celui observé pour certains virus H5 faiblement pathogène chez la même espèce (Niqueux *et al.*, 2014). L'infection de différentes espèces de canard, y compris le canard de Barbarie, par des virus IAHP H5N1 de la lignée A/goose/Guangdong/1/1996 se caractérisait au contraire par une excrétion respiratoire beaucoup plus marquée, en terme de titres

viraux détectés, que l'excrétion par voie cloacale (Guionie *et al.*, 2009 ; Pantin-Jacwood *et al.*, 2009 et 2013).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Le Bouquin S., Huneau-Salaün A., Hamon M., Moisson M.C., Scoizec A., Niqueux É., Schmitz A., Briand F.X., van de Wiele A., Bronner A., 2016. L'épisode d'influenza aviaire en France en 2015-2016 – Situation épidémiologique au 30 juin 2016. BE santé animale et alimentation, (75), 8 p.
- Cherbonnel M., Henry A., Ogor K., Jestin V., 2013. Validation of a duplex real-time RT-PCR assay to detect avian influenza virus matrix gene using armored RNA as an internal positive control. In : Book of abstracts, WVPAC 2013, 19-23 août 2013, Nantes, France. 466.
- Niqueux É., Picault J.P., Amelot M., Allée C., Lamandé J., Guillemoto C., Pierre I., Massin P., Blot G., Briand F.X., Rose N., Jestin V., 2014. Quantitative transmission characteristics of different H5 low pathogenic avian influenza viruses in Muscovy ducks. Vet Microbiol, (168), 78-87.
- AFNOR, 2013. NF U 47-036-1 et NF U 47-036-2, Méthodes d'analyse en santé animale – Recherche d'anticorps contre les orthomyxovirus (influenzavirus) aviaires de type A de sous-types H5 et H7 par la technique d'inhibition de l'hémagglutination – partie 1 : criblage et partie 2 : confirmation. 11 octobre 2013. AFNOR (Éd.), Paris, France.
- JOCE, 2006. Décision 2006/437/CE de la Commission du 4 août 2006 portant approbation d'un manuel de diagnostic pour l'influenza aviaire conformément à la directive 2005/94/CE du Conseil. (L237), 1-27.
- Brown J.D., Stallknecht D.E., Berghaus R.D., Swayne D.E., 2009. Infectious and lethal doses of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for house sparrows (*Passer domesticus*) and rock pigeons (*Columbia livia*). J Vet Diagn Invest, (21), 437-445.
- Guionie O., Guillou Cloarec C., Courtois D., Bougeard S., Amelot M., Jestin V., 2009. Experimental infection of Muscovy ducks with highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) belonging to clade 2.2. Av Dis, (54 S1), 538-547.
- Pantin-Jackwood M.J., Swayne D.E., 2009. Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds. OIE Rev Sci Tech, (28), 113-136.
- Pantin-Jackwood M.J., Swayne D.E.,

Tableau 1. Signes cliniques et profils individuels d'excrétion du virus IAHP H5N9 chez le canard de Barbarie EOPS de 3 semaines

		J-1	J0	J+1	J+2	J+3	J+4	J+5	J+6	J+7	J+8	J+9	J+10	J+11	J+12	J+13	J+14	J+15	J+16	J+17	J+18	J+19	J+20
canards de Barbarie inoculés (n = 6)	926	-/-	np	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	np	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	np	-/-	-/-
	927	-/-	np	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	np	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	np	-/-	-/-
	925	-/-	np	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	np	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	np	-/-	-/-
	929	-/-	np	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	np	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	np	-/-	-/-
	930	-/-	np	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	np	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	np	-/-	-/-
	928	-/-	np	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	np	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	np	-/-	-/-
canards de Barbarie contacts (n = 12)	914	-/-	np	np	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	np	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	np	-/-	-/-
	920	-/-	np	np	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	np	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	np	-/-	-/-
	915	-/-	np	np	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	np	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	np	-/-	-/-
	913	-/-	np	np	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	np	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	np	-/-	-/-
	924	-/-	np	np	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	np	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	np	-/-	-/-
	918	-/-	np	np	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	np	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	np	-/-	-/-
	923	-/-	np	np	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	np	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	np	-/-	-/-
	917	-/-	np	np	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	np	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	np	-/-	-/-
	919	-/-	np	np	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	np	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	np	-/-	-/-
	916	-/-	np	np	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	np	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	np	-/-	-/-
	921	-/-	np	np	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	np	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	np	-/-	-/-
	922	-/-	np	np	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	np	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	np	-/-	-/-

Détection du génome IA par RT-PCR à partir d'ARN extrait respectivement de surnageants d'écouvillons oropharyngés et cloacaux individuels.

Les résultats bruts en Ct sont interprétés qualitativement par rapport au seuil de positivité de 2 D_{IE50} / réaction PCR.

La détection des signes cliniques est représentée en gris clair (jetage seul) ou gris foncé (râles associés ou non à du jetage).

np : absence de prélèvements.

Tableau 2. Profils quantitatifs d'excrétion du virus IAHP H5N9 chez le canard de Barbarie EOPS de 3 semaines

		pic d'excrétion (jour post-infection)		titre viral maximum (log ₁₀ D _{IE50} / réaction PCR)		durée d'excrétion (jours)		ASC
		min	max	M. ± E.T. *		min	max	M. ± E.T.
canards de Barbarie inoculés (n = 6)	excrétion oropharyngée	1	2	3,43 ± 0,61		6	7	13,04 ± 1,43
	excrétion cloacale	1	2	3,29 ± 0,45		9	13	17,81 ± 3,03
canards de Barbarie contacts (n = 12)	excrétion oropharyngée	2		3,19 ± 0,48		6	9	13,32 ± 1,74
	excrétion cloacale	2	9	2,95 ± 0,34		7	12	17,04 ± 2,74

* : moyenne ± écart-type

Tableau 3. Nombre de sérums positifs en ELISA et nombre de sérums présentant un titre IHA ≥ 16, par type d'antigène et par date de prélèvement

	ELISA NP	ELISA H5	nombre de sérums positifs à J + 7 après inoculation					
			IHA					
			LRUE Ag H5N3	LRUE Ag H5N1	FP fr. Ag H5N3	FP fr. Ag H5N2	HP fr. Ag H5N9	HP fr. Ag H5N1
canards de Barbarie inoculés (n=6)	6	4	0	0	1	0	1	0
canards de Barbarie contacts (n=12)	12	3	0	0	0	0	0	0
	ELISA NP	ELISA H5	nombre de sérums positifs à J + 14 après inoculation					
			IHA					
			LRUE Ag H5N3	LRUE Ag H5N1	FP fr. Ag H5N3	FP fr. Ag H5N2	HP fr. Ag H5N9	HP fr. Ag H5N1
canards de Barbarie inoculés (n=6)	6	5	1	1	2	2	5	3
canards de Barbarie contacts (n=12)	12	7	3	0	4	1	11	5
	ELISA NP	ELISA H5	nombre de sérums positifs à J + 20 après inoculation					
			IHA					
			LRUE Ag H5N3	LRUE Ag H5N1	FP fr. Ag H5N3	FP fr. Ag H5N2	HP fr. Ag H5N9	HP fr. Ag H5N1
canards de Barbarie inoculés (n=6)	6	6	4	1	3	3	12	4
canards de Barbarie contacts (n=12)	12	12	5	1	3	2	6	8

DESCRIPTION D'UN CAS DE LIPIDOSE HEPATIQUE OBSERVE DANS UN TROUPEAU DE DINDES DE CHAIR

Nadir Alloui¹, Omar Benoune², Ayachi Ammar³

¹*Service des Sciences Avicoles, INSVSA- LEPSA-Université de Batna1.Algérie*

²*Laboratoire Anatomopathologique, INSVSA, Université de Batna1.Algérie*

³*Laboratoire de microbiologie, INSVSA, Université de Batna1.Algérie*

ridan2002@hotmail.com

RESUME

Cette étude décrit des cas particuliers de lipidose hépatique chez les dindes chair de souche "BUT" et les observations histopathologiques au niveau du foie chez les animaux malades. La lipidose hépatique est un syndrome observé chez plusieurs volailles mais aussi chez la dinde. La maladie apparaît soudainement à la fin de l'élevage. Les principaux symptômes sont la nonchalance, la prostration et parfois une diarrhée modérée. À l'autopsie, cette pathologie se caractérise par une hypertrophie des foies parsemés par des zones jaunes pâles. Histologiquement, la lésion principale sur le foie est une dégénérescence graisseuse des hépatocytes, associée parfois à la nécrose et l'hémorragie. La cause de la lipidose hépatique est incertaine, les facteurs nutritionnels et métaboliques sont suspectés comme des paramètres déterminants dans l'apparition de la maladie.

ABSTRACT

Description of a case hepatic lipidosis observed in a flock of turkeys meat

This study describes peculiar cases of hepatic lipidosis in turkeys and the results of histopathological approaches aimed at better detailing this condition. Hepatic lipidosis of the turkey is a syndrome described in poultry and turkeys meat. The disease has appears suddenly at the end of the breeding. The principal symptoms are the nonchalance, prostration and sometimes a moderate diarrhea was observed. At necropsy, it characterized by enlarged livers mottled by pale yellow areas. Histologically, the main feature is fatty degeneration associated with necrosis and hemorrhages. The cause of hepatic lipidosis is uncertain although nutritional and metabolic factors are suspected.

INTRODUCTION

Certains troubles hépatiques caractérisés par un changement de la structure histologique du foie peuvent affecter divers espèces aviaires comme par exemple: le syndrome hémorragique du foie et le syndrome du foie gras et du rein. Ce sont des hépatoses affectant les poulets (Leeson et al., 1995; Crespo et Shivaprasad, 2003). Cependant, chez les dindes, il existe aussi un syndrome hépatique connu sous le nom de lipidose hépatique. Il est typiquement caractérisé par des zones localement étendues sur la surface du foie sous la forme d'inclusions lipidiques (Gazdzinski et al., 1994, Azziz., 2008). La cause de cet état pathologique est incertaine et peu de données existent dans la littérature. Gazdzinski et al., 1994 décrivent ce syndrome chez les dindes reproductrices âgées de 12 à 24 semaines et spéculent sur un rôle possible de restrictions nutritionnelles dans l'apparition de la maladie. Plus récemment, Gallazzi et al. (2007) et Aziz (2008) ont souligné que la lipidose hépatique affecte les dindons de type viande dont les régimes alimentaires étaient trop énergétiques. Par conséquent, la cause exacte doit encore être clarifiée et les composants génétiques ou l'exposition à une toxine doit être pris en compte pour la pathogenèse (Aziz, 2008). Les dindes atteintes de cette maladie peuvent mourir subitement sans signes cliniques antérieurs. Parfois, elles peuvent présenter des signes de dyspnée et de cyanose peu de temps avant la mort. Notre étude décrit un cas particulier de lipidose hépatique observé dans un troupeau de dindes chair en Algérie. Le diagnostic clinique est confirmé grâce aux résultats histopathologiques du foie de dindes affectées par cette maladie.

1.MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'étude suivante a été réalisée à Ain Touta (Batna), dans l'est de l'Algérie. Cette région est connue par sa forte densité de volailles et produit environ 30% de la production nationale d'œufs et de viande blanche. Une mortalité modérée de 5% a été observée dans un troupeau de 1000 dindes femelles de souche "BUT". L'examen clinique post mortem a concerné 4 malades et 2 cadavres de dindes. Des fragments de foie ont été recueillis et immédiatement immergés dans 10% de formaline tamponnée pour empêcher l'autolyse et les modifications morphologiques subséquentes. Pour préparer les coupes histologiques, les tissus hépatiques ont été lavés pour éliminer la formaline et déshydratés dans des concentrations croissantes

d'éthanol, suivis d'une clarification et d'un enrobage utilisant respectivement le xylène et la paraffine. Des coupes minces (6 µm) ont été réalisées et colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine; selon la méthode décrite par Luna (1968) et Campbell (1995). Toutes les lames ont été soigneusement observées en utilisant le microscope optique (Axioskop 20; Carl Zeiss). Des analyses bactériologiques ont été aussi réalisées conformément aux normes AFNOR, pour rechercher certains germes pathogènes (*E. coli* et *Salmonella* spp). Les observations histopathologiques et bactériologiques ont été effectuées au laboratoire d'histologie et de microbiologie du département de médecine vétérinaire à l'Université de Batna en Algérie.

2.RÉSULTATS ET DISCUSSION

La maladie est apparue soudainement à la fin de l'élevage chez les animaux âgés de 11 semaines. Les principaux symptômes observés sur les animaux malades sont la nonchalance, la prostration et parfois une diarrhée modérée d'une couleur normale. A l'autopsie, les principales lésions sont localisées dans le foie, qui est généralement hypertrophié et sa surface est parsemée de nodules jaunâtres et parfois avec des foyers hémorragiques (figures 1 et 2). Certains foies ont des zones irrégulières, discrètes ou confluentes, pâles qui représentent l'accumulation de lipides. Les lésions sont totalement absentes dans les autres organes (poumon, foie, rate, rein, bourse de Fabricius, intestin grêle...). Les lésions post mortem observées au cours de la présente enquête étaient semblables à celles rapportées par Gazdzinski, 1994; Aziz, 2008 et Manarolla, 2010.

Les lésions microscopiques prédominantes sont la nécrose massive des hépatocytes (figure3). Les hépatocytes mourants sont rétrécis et arrondis et leurs noyaux peuvent être pycnotiques ou cario-rhéotiques. Les hépatocytes agrandis présentent des vacuoles qui remplacent le cytoplasme et déplacent périphériquement le noyau (nécrose cellulaire) (figure 4). Il n'y a pas de réponse inflammatoire à la nécrose des hépatocytes.

Les résultats bactériologiques, concernant la recherche de salmonelles et *E. coli* pathogènes sont négatifs. Le diagnostic différentiel (Tableau. 1) nous renseigne sur les différentes pathologies pouvant être confondues avec la lipidose hépatique de la dinde. La morbidité et la mortalité (5%) sont modérées dans cet élevage de dinde chair, ce qui exclue toutes infections à caractère épidémiologique.

La lipidose hépatique est un trouble occasionnel décrit pour la première fois par Gazdzinski et al. (1994) chez les dindes reproductrices. Ces oiseaux sont normalement nourris avec des régimes à faible teneur en protéines et de telles restrictions alimentaires peuvent conduire à une carence en acides aminés (en particulier la méthionine et la cystéine) qui sont nécessaires pour la synthèse des lipoprotéines. Cette hypothèse ne permet pas d'expliquer la lipidose hépatique affectant les dindes chair qui sont nourris sans restrictions alimentaires. Plus récemment, une approche nutritionnelle de la lipidose hépatique a également été discutée par Hazel (2009) qui soupçonne une carence en carnitine ou en acides aminés (lysine et méthionine) comme cause probable d'accumulation d'acides gras (mais non prouvée). Des recherches virologiques ont également été réalisées pour le même cas avec des résultats négatifs (données non présentées).

Nous avons décrit ce premier cas de lipidose hépatique survenus dans notre région. La minorité des cas de lipidose hépatique signalés par d'autres auteurs dans le monde sont similaires sur le plan clinique à celui que nous avons observé. Les dindes affectées de lipidose hépatique étaient dans une condition physique optimale et la mortalité due à cette maladie était très transitoire dans le troupeau. Même si l'étiologie reste à clarifier, il est au moins utile de restreindre l'éventail des hypothèses. Une meilleure compréhension de la lipidose hépatique pourrait tenir compte des particularités du métabolisme lipidique chez les dindons. Par conséquent, plus de recherches sont souhaitées pour déterminer le ou les facteurs déterminants dans l'apparition de cette maladie et sa pathogenèse.

CONCLUSION

Tableau1. Diagnostic différentiel de la lipidose hépatique du dindon

Maladies	Etiologie	Principaux signes cliniques et lésionnels
Mycotoxicooses	Mycotoxines	Diarrhée; ataxie, convulsion; hypertrophie du foie présentant des foyers nécrotiques et hémorragiques; rate, rein, pancréas hypertrophiés; atrophie de la bourse de Fabricius; retard de croissance; taux de mortalité élevé.
Histomonose	Histomonas meleagridis	Diarrhée de couleur jaune soufrée; typhlite; foyers nécrotiques en cocarde avec des bords surélevés et un centre de dépression.
Maladie de Marek	Herpesvirus	Dépression; perte de poids; lymphomes diffus ou nodulaires dans les viscères et les follicules plumeux.
Typhose	S. gallinarum pullorum	Crêtes pales, anémie; hépatite, oophorite, aerosaculite, taux de mortalité élevé.
Hépatite virale	Adenovirus	Mortalité élevée; hépatite; pancréatite, splénomégalie
Colibacillose	E.coli	Granulomes sur le foie et autres organes (caecum, méésentère); morbidité et mortalité élevées
Maladie lymphoproliférative	Retrovirus	Rate marbrée et hypertrophiée; tumeurs au niveau du foie, thymus, pancréas, rein, intestin, poumon et cœur; mortalité élevée

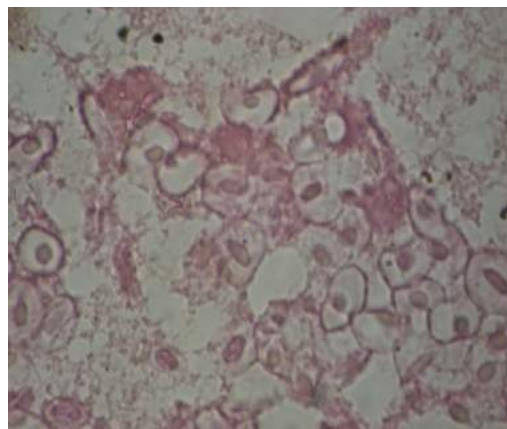
Figure1-Foie dans la cavité abdominale



Figure 2-Foie avec nodules gras



Figure3-Nécrose des hépatocytes (N) (X 100) **Figure4**-Lipidose des hepatocytes ((X 1000)



BIBLIOGRAPHIE

1. Aziz, T. 2008. Hepatic lipidosis in turkeys. *World Poultry* 24, 28-29.
2. Campbell, T.W. 1995. *Avian hematology and cytology*. Iowa State University Press, Ames, 2 Eds. p 104.
3. Crespo, R. Shivaprasad, H.L. 2003: Developmental, Metabolic, and Other Non-infectious Disorders. In: *Diseases of poultry*. (Saif, Y.M., H.J. Barnes, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, D.E. Swayne eds.) 11th ed. Ames: Iowa State University Press, USA, 1082-1085.
4. Gallazzi, D. Manarolla, G. Rampin, T. Saita, M. Sironi, G. 2007: Hepatic Lipidosis In Turkeys: Beyond The Current Pathogenetic Hypothesis. In *Proceedings of 56th Western Poultry Disease Conference*, Las Vegas, USA 122-124.
5. Gazdzinski, P., Squires, E.J. Julian, R.J. 1994: Hepatic lipidosis in turkeys. *Avian Diseases* 38, 379-384.
6. HazeL, K. 2009: Hepatic lipidosis: Is Carnitine deficiency the underlying causes? In: *Turkey production: Toward better Welfare and Health*. *Proceedings of the 5th International Meeting of the Working Group 10 (Turkey) of WPSA* (Ed. Hafez, H.M), Berlin. Mensch & Buch Verlag ISBN. 978-3-86664-701-5. pp. 271-276.
7. Leeson, S. Diaz, G. Summers, J.D. 1995: Fatty liver hemorrhagic syndrome. In: *Poultry metabolic disorders and mycotoxins*. University Books, Guelph, Ontario, Canada, 55-74.
8. Luna, L.G. 1968. *Manual of Histologic Staining Methods of the AFIP* 3rd Eds., Mc Graw-Hill, NY, p: 131.
9. Manarolla, G, Saita, M, Gallazzi, D, Sironi, V and Tiziana Rampin, 2011. Histological and histochemical investigations on hepatic lipidosis in turkeys. *Arch.Geflügelk.*, **75** (1). S. 56-60, 2011

IMPLICATION DE *LYSINIBACILLUS* *SPHAERICUS* DANS LES TROUBLES LOCOMOTEURS DU CANARD PRET-A-GAVER

J. Fontaine¹ et P. Bernard¹

¹RESEAU CRISTAL - Fili@vet - 7 rue des Artisans - Zone Alphaparc, 79300 BRESSUIRE,
France

j.fontaine@reseaucristal.fr

RÉSUMÉ

Les boiteries peuvent impacter fortement l'homogénéité et la croissance des canards mulards prêts-à-gaver. Depuis quelques années, notre laboratoire étudie précisément les différents tableaux lésionnels associés aux troubles locomoteurs. Sur 142 dossiers, l'âge moyen de consultation est de 35 jours. Les articulations des membres postérieurs sont le plus souvent touchées sous forme d'arthrites plus ou moins suppurées ou de nécroses du cartilage de la tête du fémur. Cependant, dans certains cas les symptômes sont associés à des myosites. Cette inflammation des muscles striés, se caractérise en autopsie par l'apparition de stries blanchâtres à la surface des muscles. L'ensemencement bactériologique de différents organes tels que les muscles mais aussi le cerveau, la moëlle osseuse et le foie permet d'isoler *Lysinibacillus sphaericus* anciennement dénommé *Bacillus sphaericus* en culture pure. L'histologie des lésions musculaires permet de confirmer l'atteinte musculaire et l'implication de *Lysinibacillus sphaericus*.

ABSTRACT

Involvement of *Lysinibacillus sphaericus* in mulard ducks musculoskeletal disorders

Lameness in mulard ducks can strongly affect the homogeneity and growth of the flock. In recent years, our laboratory has been studying the different types of lesion in connection with locomotor disorders. Out of 142 cases consultations, the average age recorded is 35 days. The hind limbs articulations are most often affected. Arthritis and cartilage necroses of the femoral head are most often observed. However, in some cases the symptoms are associated with myositis. This inflammation of the striated muscles is characterized by autopsy by the appearance of whitish streaks on the muscles surfaces. *Lysinibacillus sphaericus*, formerly called *Bacillus sphaericus*, can be isolated from different organs such as muscles, brain, bone marrow and liver. The histology of muscular lesions confirms the muscular disorder and the strong involvement of *Lysinibacillus sphaericus*.

INTRODUCTION

Sur des problématiques de boiterie sur des canards mulards prêt-à-gaver, le laboratoire d'analyse Fili@vet a confirmé dans certains cas un tableau lésionnel locomoteur avec une décoloration punctiforme à diffuse de certains muscles des pattes. A plusieurs reprises, *Lysinibacillus sphaericus* a été isolé sur ce type d'organes en bactériologie. Pourtant, *Lysinibacillus sphaericus*, anciennement nommé *Bacillus sphaericus*, a surtout été décrit comme responsable de syndromes neurologiques, respiratoires ou de septicémies de type *Riemerella*. Il touche des canards de trois à quatre semaines. En médecine humaine, des symptômes similaires sont décrits sur des patients immunodéprimés.

Cet article présente une synthèse sur 5 ans des informations enregistrées par notre laboratoire concernant l'âge des animaux infectés par *L. sphaericus*, les lésions macroscopiques et microscopiques rencontrées, et les organes d'isolement de cette bactérie.

1. MATERIELS ET METHODES

Lorsqu'un producteur de canards rencontre un problème sanitaire d'élevage, il amène en général cinq animaux malades ou fraîchement morts au laboratoire afin de réaliser une autopsie. En cas d'hypothèse d'infection, des examens complémentaires tels que bactériologie ou histologie sont parfois demandés.

Pour chaque examen nécropsique, les laboratoires du Réseau Cristal attribuent différentes catégories de mots clés. Un premier niveau de mots-clés identifie la ou les lésions majoritaires (par exemple, congestion généralisée, péricardite, pneumonie...); un deuxième niveau caractérise l'appareil majoritairement touché (digestif, respiratoire, neurologique, locomoteur, septicémique, métabolique...).

L'extraction des données a été ciblée sur la période 2011-2016, pour des analyses d'autopsie de canards mulards ayant donné lieu à une bactériologie dans le laboratoire Fili@vet. Dans un deuxième temps, nous avons sélectionné les dossiers ayant renseigné des lésions d'arthrites des pattes (A), de nécrose de tête fémorale (NTF) et / ou de myosites des muscles des pattes (M). Ensuite, parmi ces dossiers, nous avons choisi ceux ayant conduit le vétérinaire traitant à poser un diagnostic concernant l'appareil locomoteur. En effet, dans certains cas, les lésions A, NTF ou M accompagnent un tableau lésionnel plus large. Enfin, notre attention s'est portée sur les analyses où *L. sphaericus* était isolé.

Sur les cas de myosites, nous avons confronté notre analyse macroscopique à un examen histologique réalisé au Laboratoire d'histopathologie animale Oniris, CS 40706, 44307 Nantes cedex 03.

2. RESULTATS

De 2011 à 2016, 193 analyses ont concerné des canards mulards prêt-à-gaver avec lésions d'arthrite, de nécrose de tête fémorale ou de myosite. L'âge moyen des animaux de ce premier échantillon était de 38 jours.

De là, 142 dossiers étaient en lien avec une problématique majoritairement locomotrice. Dans cette seconde étape, l'âge moyen de l'échantillon était de 35 jours.

Ensuite, la sélection de 39 dossiers contenant l'isolement de *Lysinibacillus sphaericus* portait l'âge moyen des canards contaminés à 26 jours. Les organes ensemencés, en pool ou en individuel, étaient le cœur, le foie et la moëlle osseuse, pour 30 examens bactériologiques, puis le muscle ou la tête fémorale dans 6 cas, et le cerveau pour 3 dossiers.

En histologie, sont décrites des lésions de dégénérescence voire de nécrose des fibres musculaires et une inflammation associée secondaire. Moins fréquemment, quelques fibres musculaires en cours de régénérescence sont également notées.

3. DISCUSSION

Lysinibacillus sphaericus peut provoquer un syndrome locomoteur sur des canards mulards de 3 à 4 semaines. Le bactériologiste peut le mettre en évidence sur différents organes courants comme le foie, le cœur ou la moëlle osseuse, néanmoins il est parfois nécessaire de prélever le cerveau ou le muscle présentant une lésion de myosite pour l'isoler.

Cette bactérie peut se retrouver sur le sol naturel, des sédiments marins ou de l'eau douce. Les élevages ayant rencontré la maladie semblent plus facilement réinfectés, probablement parce que la source de contamination n'est pas éradiquée.

Ce bacille Gram + est généralement sensible à l'amoxicilline, antibiotique auquel un traitement complémentaire de vitamine E et Sélénium est conseillé. L'analyse ultérieure de Phytogrammes® devrait permettre d'identifier les solutions alternatives les plus pertinentes.

L'autovaccin est préconisé dans les élevages chroniquement infectés.

CONCLUSION

Lysinibacillus sphaericus est donc une bactérie isolée relativement fréquemment dans les pathologies de l'appareil locomoteur du canard mulard prêt-à-gaver et doit faire partie du diagnostic différentiel. Les récurrences sur plusieurs lots consécutifs observées impliquent de renforcer les mesures de nettoyage et désinfection des bâtiments d'élevage ainsi que les mesures de biosécurité dans les élevages concernés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Doumalin L., 2008. Filières avicoles, juillet-aout.

Gavaret et al., , 2ème colloque international de bactériologie vétérinaire, 2002, Ploufragan: pp. 27-28

<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico//bb/sphaericus.html>



Figure 1 - Culture de *Lysinibacillus sphaericus*



Figure 3 - Myosite marquée sur le muscle de la cuisse gauche d'un canard mulard âgé de 4 semaines

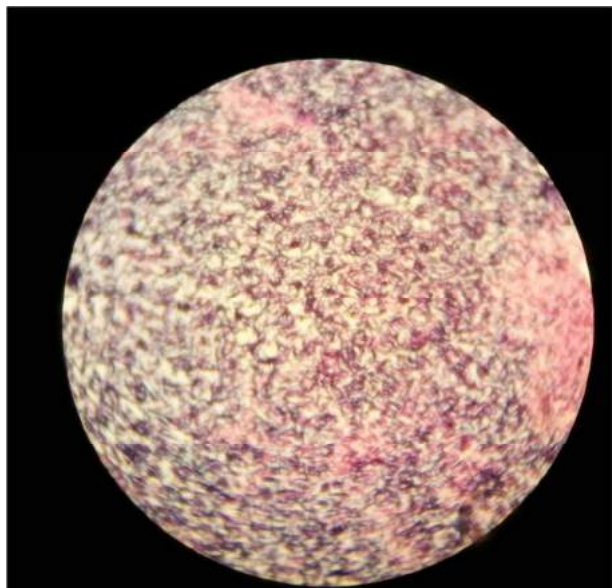


Figure 2 - Coloration de Gram sur une culture de *L.sphaericus*



IMPLICATION DE *LYSINIBACILLUS SPHAERICUS* DANS LES TROUBLES LOCOMOTEURS DU CANARD PRÊT-À-GAVER

J. FONTAINE¹ et P. BERNARD¹

¹RESEAU CRISTAL - Fili@vet - 7 rue des Artisans - Zone Alphaparc, 79300 BRESSUIRE, France

INTRODUCTION

Sur des problématiques de boiterie sur des canards mulards prêt-à-gaver, le laboratoire d'analyse Fili@vet a confirmé dans certains cas un tableau lésionnel locomoteur avec une décoloration punctiforme à diffuse de certains muscles des pattes.

A plusieurs reprises, *Lysinibacillus sphaericus* a été isolé sur ce type d'organes en bactériologie. Pourtant, *Lysinibacillus sphaericus*, anciennement nommé *Bacillus sphaericus*, a surtout été décrit comme responsable de syndromes neurologiques, respiratoires ou de septicémies de type *Riemerella*. Il touche des canards de trois à quatre semaines. En médecine humaine, des symptômes similaires sont décrits sur des patients immunodéprimés.

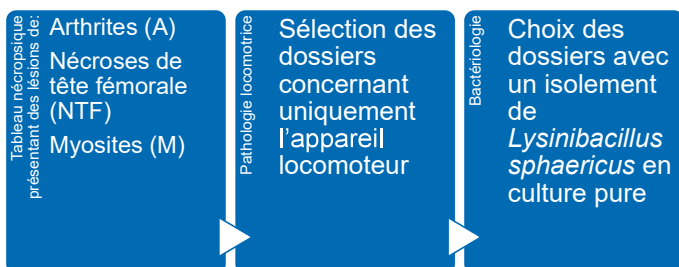
Cet article présente une synthèse sur 5 ans des informations enregistrées par notre laboratoire concernant l'âge des animaux infectés par *L.sphaericus*, les lésions macroscopiques et microscopiques rencontrées, et les organes d'isolement de cette bactérie.

MATERIEL ET METHODE

Lorsqu'un producteur de canards rencontre un problème sanitaire d'élevage, il amène en général cinq animaux malades ou fraîchement morts au laboratoire afin de réaliser une autopsie. En cas d'hypothèse d'infection, des examens complémentaires tels que bactériologie ou histologie sont parfois demandés.

Pour chaque examen nécropsique, les laboratoires du Réseau Cristal attribuent différentes catégories de mots clés. Un premier niveau de mots-clés identifie la ou les lésions majoritaires (par exemple, congestion généralisée, péricardite, pneumonie...) ; un deuxième niveau caractérise l'appareil majoritairement touché (digestif, respiratoire, neurologique, locomoteur, septicémique, métabolique...).

L'extraction des données a été ciblée sur la période 2011-2016, pour des analyses d'autopsie de canards mulards ayant donné lieu à une bactériologie dans le laboratoire Fili@vet.



Les lésions de myosites ont été confrontées à un examen histologique réalisé au Laboratoire d'histopathologie animale Oniris, CS 40706, 44307 Nantes cedex 03.

RESULTATS

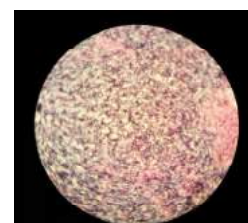
	Lésions A / NTF / M	Pathologie locomotrice	Isolement de <i>L. sphaericus</i>
Nombre d'analyses	193	142	39
Age moyen (jours)	38	35	26



Myosite marquée sur le muscle de la cuisse gauche d'un canard mulard âgé de 4 semaines



Culture de *L. sphaericus* sur gélose au sang



Coloration de Gram sur une culture de *L.sphaericus*

En histologie, sont décrites des lésions de dégénérescence voire de nécrose des fibres musculaires et une inflammation associée secondaire.

DISCUSSION

- *Lysinibacillus sphaericus* peut provoquer un syndrome locomoteur avec lésions d'arthrites, nécroses de tête fémorale, myosites, sur des canards mulards de 3 à 4 semaines.
- Bactérie isolée sur: foie, cœur, moelle osseuse, cerveau ou muscle.
- Origine environnementale: sol naturel, sédiments marins ou eau douce.
- Bactérie souvent résidente dans des élevages chroniquement infectés.
- Bacille Gram+ généralement sensible à l'amoxicilline.
- Autovaccin possible.

CONCLUSION

Lysinibacillus sphaericus est donc une bactérie isolée relativement fréquemment dans les pathologies de l'appareil locomoteur (arthrites, nécroses de tête fémorale, myosites) du jeune canard mulard prêt-à-gaver, et doit faire partie du diagnostic différentiel.

Les récurrences sur plusieurs lots consécutifs observées impliquent de renforcer les mesures de nettoyage et désinfection des bâtiments d'élevage ainsi que les mesures de biosécurité dans les élevages concernés.

REFERENCES

- Doumalin L., 2008. Filières avicoles, juillet-août.
Gavaret et al., 2ème colloque international de bactériologie vétérinaire, 2002, Ploufragan: pp. 27-28
<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico//bb/sphaericus.html>

DIAGNOSTIC DES MYCOPLASMOSES AVIAIRES CHEZ LA POULE PONDEUSE PAR LA TECHNIQUE D'AGGLUTINATION RAPIDE SUR LAME : ATTENTION AUX FAUX NEGATIFS !

Gautier-Bouchardon Anne V., Balan Odile, Ferré Séverine, Cineux Maelan, Kempf Isabelle

*ANSES - Laboratoire de Ploufragan-Plouzané et Université Bretagne-Loire, Unité
Mycoplasmologie-Bactériologie, 22440 PLOUFRAGAN, France
anne.bouchardon@anses.fr*

RÉSUMÉ

Les mycoplasmoses aviaires dues à *Mycoplasma gallisepticum* (MG) ou *Mycoplasma synoviae* (MS) sont à l'origine de pertes économiques importantes dans les élevages de poules. L'agglutination rapide sur lame (ARL) est couramment utilisée pour détecter ces infections dans les élevages. Une étude réalisée dans un élevage de poules pondeuses infecté par MS a cependant mis en évidence une différence significative entre le nombre de poules positives vis-à-vis de MS par culture ou PCR (80 à 100 %) et par la technique ARL (0 à 7 %). Des prises de sang ont été réalisées dans d'autres élevages de poules afin de comparer différentes techniques sérologiques : l'ELISA, la technique ARL classique utilisée par les laboratoires d'analyse (dilution au 1/5 et décomplémentation des seuls sérums qui s'avèrent positifs lorsque non dilués), et une technique ARL modifiée (dilution au 1/5 et décomplémentation systématique de tous les sérums). La comparaison des résultats obtenus avec ces trois techniques a mis en évidence des différences très significatives entre la technique ARL classique et la technique ARL modifiée ou l'ELISA : alors que 67 à 100 % des poules étaient positives avec ces deux dernières techniques, de très fortes variations ont été observées avec la technique ARL classique, avec 3 à 97% de poules positives. Ces différences ont également été observées dans plusieurs lots de poules pondeuses infectées par MG, avec 20 à 37 % de poules positives avec la technique ARL classique, et 77 à 100 % de poules positives avec la technique ARL modifiée ou l'ELISA. Les différences observées entre les techniques ARL classique et modifiée suggèrent un effet « prozone », caractérisé par un excès d'anticorps, qui empêche l'observation d'une réaction d'agglutination normale : la réaction d'agglutination peut se produire après dilution du sérum. Ces différents travaux montrent l'importance des techniques de diagnostic utilisées pour dépister les infections par MG et MS chez les poules pondeuses, l'utilisation de la technique ARL classique pouvant conduire à une sous-estimation du pourcentage de poules infectées, voire à la non détection d'un lot infecté.

ABSTRACT

Diagnostic of avian mycoplasmoses in laying hens by the rapid serum agglutination technique: beware of false negatives!

Avian mycoplasmoses due to *Mycoplasma gallisepticum* (MG) or *Mycoplasma synoviae* (MS) cause significant economic losses in chicken farms. Rapid slide agglutination (RSA) is a commonly used technique to detect these infections in farms. A study carried out in a laying hen farm infected with MS showed however a significant difference between the number of hens positive to MS by culture or PCR (80 to 100%, from tracheal swabs) and RSA (0 to 7%). Blood samples were taken from several other laying hen farms in order to compare different serological techniques for detection of antibodies against MS: ELISA, the standard RSA technique used by laboratories for analysis (1/5 dilution and decomplexation only of the undiluted positive sera), and a modified RSA technique (systematic 1/5 dilution and decomplexation of all the sera). Comparison of the results obtained with these three techniques revealed very significant differences between the conventional RSA technique and the modified RSA technique or the ELISA: while 67 to 100% of the chickens were positive with the latter two techniques, strong variations were observed with the conventional RSA technique, with 3 to 97% of positive chickens. These differences were also observed in several batches of laying hens infected with MG, 20-37% positive chickens with conventional RSA, and 77-100% positive chickens with modified RSA or ELISA. The differences observed between conventional and modified RSA techniques suggest a "prozone" effect, characterized by an excess of antibodies, which prevents the observation of a normal agglutination reaction: the agglutination reaction can occur after dilution of serum. These different studies show the importance of the diagnostic techniques used to detect MG and MS infections in laying hens, as the use of the conventional RSA technique may lead to an underestimation of the percentage of infected chickens, or even to the non-detection of an infected batch.

INTRODUCTION

Les mycoplasmoses aviaires sont à l'origine de lourdes pertes économiques dues essentiellement à des retards de croissance, à l'augmentation des indices de consommation, à des saisies à l'abattoir et à des baisses de production d'œufs (Gautier-Bouchardon et Kempf, 2008).

Mycoplasma gallisepticum est responsable de la maladie respiratoire chronique chez la poule et de la sinusite infectieuse chez la dinde. La présence d'autres agents pathogènes (virus ou bactéries) peut aggraver la maladie et entraîner des mortalités (Raviv et Ley, 2013). C'est une maladie réglementée.

M. synoviae est à l'origine d'infections subcliniques de l'appareil respiratoire (diminution des performances zootechniques), de la synovite infectieuse (arthrites, boiteries) et du syndrome des œufs à extrémité de verre (Fergusson-Noel et Noormohammadi, 2013 ; Gautier-Bouchardon, 2012). Son pouvoir pathogène peut être exacerbé lors d'association à des virus ou des bactéries.

Le contrôle des mycoplasmoses aviaires repose essentiellement sur l'éradication dans les troupeaux et sur une prophylaxie sanitaire exigeante. Les programmes de contrôle des mycoplasmoses à *M. gallisepticum* en Europe sont basés sur le maintien des troupeaux de sélection et de reproduction indemnes (directive 2009/158/EC et décision 2011/214/EU). Les contrôles sérologiques (ARL ou ELISA) et bactériologiques (culture ou PCR) sont réalisés lors de la mise en place des troupeaux puis régulièrement afin de s'assurer de l'absence de contamination (Kempf, 2006). Pour les troupeaux de production, les moyens de contrôle utilisés visent essentiellement à limiter les conséquences économiques de la mycoplasmoses (traitements, vaccination, amélioration de l'hygiène).

Le dépistage sérologique des mycoplasmoses aviaires consiste à mettre en évidence des anticorps d'origine infectieuse, maternelle ou vaccinale dans le sérum ou le vitellus. Les principales techniques utilisées sont l'agglutination rapide sur lame (ARL) et les tests immuno-enzymatiques (ELISA) (Gautier-Bouchardon et Kempf, 2008). L'ARL est une technique sérologique simple et peu coûteuse, très employée en France. Elle permet de détecter les IgM (premières immunoglobulines produites suite à l'infection). Des réactions non spécifiques peuvent parfois se produire. Les tests ELISA permettent de détecter les IgY, sont spécifiques, mais leur coût est plus élevé que l'ARL. Ils sont souvent utilisés pour confirmer des résultats sérologiques positifs obtenus par la technique ARL.

L'objectif principal de ce travail était de comparer les différentes techniques (bactériologiques et sérologiques) de dépistage des mycoplasmoses aviaires chez l'espèce poule. La mise en évidence d'une faible détection de poules positives vis-à-vis de *M. synoviae* par la technique ARL classique nous a

conduits à mener des études comparatives plus poussées dans différents élevages afin de mieux caractériser ce phénomène.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Prélèvements dans les élevages

Différents prélèvements ont été réalisés dans des élevages de poules pondeuses présentant ou non des signes d'infection par *M. synoviae* (syndrome des œufs à extrémité de verre et/ou infection subclinique des voies respiratoires) ou par *M. gallisepticum* (problèmes respiratoires) : écouvillonnages trachéaux pour effectuer des isolements bactériologiques ou des PCR, prises de sang au niveau de la veine alaire pour la recherche d'anticorps anti-*M. synoviae* et/ou anti *M. gallisepticum* dans les sérums. Les prélèvements ont été réalisés sur au minimum 20 poules prises au hasard dans les différents élevages visités.

1.2. Traitement des prélèvements au laboratoire

Les écouvillonnages trachéaux ont été placés dans 2 mL de milieu FM4 (Frey *et al.*, 1968) supplémenté avec des antibiotiques (pour limiter la croissance de contaminants) et vortexés. Ces suspensions initiales ont ensuite été utilisées pour effectuer en parallèle des mises en culture (4 dilutions de raison 10 en milieu de culture FM4) et des tests PCR spécifiques de *M. synoviae* ou *M. gallisepticum* (Lauerman *et al.*, 1993 ; Kempf *et al.*, 1993) après une étape de lyse (Kellog et Kwok, 1990). La croissance des mycoplasmes en milieu de culture a été détectée par virage du milieu de culture (dû à leur activité métabolique). La présence de *M. synoviae* et/ou *M. gallisepticum* dans les cultures virées a été confirmée ou infirmée par mise en culture sur milieu FM4 gélosé et par PCR.

Les prélèvements de sang (entre 1 et 2 mL par poule) ont été centrifugés pour récolter les sérums. La présence d'anticorps dirigés contre *M. synoviae* et/ou *M. gallisepticum* a ensuite été investiguée par différentes méthodes sérologiques :

- la technique d'agglutination rapide sur lame classique (ARL) (OIE, 2008) : mise en présence de 25 µL de sérum (entre 24 et 72 h après la prise de sang) et 25 µL d'antigène (*M. synoviae* ou *M. gallisepticum*, Soleil SARL ou Biovac) ; les sérums positifs (mise en évidence d'une réaction d'agglutination) ont ensuite été dilués au 1/5 et décomplémentés (30 min à 56 °C ± 1 °C) avant d'être retestés ; seuls les sérums encore positifs après dilution/décomplémentation ont été considérés comme positifs, comme préconisé par l'OIE et par la norme NF U47-012.
- Une technique ARL modifiée (ARL dilution) : dilution et décomplémentation systématique de tous les sérums avant la mise en présence des sérums et de l'antigène.

- Une technique ELISA (*Mycoplasma synoviae* Kit (Ab) et *Mycoplasma gallisepticum* Kit (Ab), Biocheck) permettant de détecter les anticorps anti-*M. synoviae* et anti-*M. gallisepticum*) mise en œuvre selon les recommandations du fournisseur.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Une première étude de comparaison de différentes méthodes de diagnostic a été réalisée dans quatre bâtiments d'un élevage de poules pondeuses d'œufs de consommation atteint du syndrome des œufs à extrémité de verre. *M. synoviae* a pu être isolé d'écouvillonnages trachéaux (70 à 90 % des prélèvements positifs par PCR et culture) (Tableau 1). Les résultats des analyses sérologiques effectuées par la technique d'agglutination rapide sur lame (ARL classique) ont mis en évidence une réponse sérologique faible (de 0 à 26,7 % des poules positives) malgré la forte proportion de poules infectées au niveau de la trachée et l'apparition du syndrome des œufs à extrémité de verre plusieurs semaines avant les prélèvements.

Tableau 1 : comparaison de l'ARL classique avec la PCR et la culture pour détecter une infection à *M. synoviae* au sein de quatre bâtiments d'un élevage atteint du syndrome des œufs à extrémité de verre.

	ARL classique	PCR	Culture
P1 ^a	8/30 ^b (26,7) ^c	22/30 (73,3)	26/30 (86,7)
P2	4/30 (13,3)	25/30 (83,3)	27/30 (90)
P3	3/30 (10)	22/30 (73,3)	21/30 (70)
P4	0/30 (0)	27/30 (90)	26/30 (86,7)

^a : bâtiments P1 à P4 ; ^b : nombre de poules positives sur nombre total de poules ; ^c : pourcentage de poules positives.

Afin de confirmer ces premières observations, des prélèvements (écouvillonnages trachéaux et prises de sang) ont été effectués dans deux nouveaux élevages de poules pondeuses : un élevage positif pour *M. synoviae* et non touché par le syndrome des œufs à extrémité de verre, et un élevage positif pour *M. synoviae* et touché par le syndrome dans un de ses deux poulaillers. *M. synoviae* a été isolé d'écouvillonnages trachéaux dans les deux élevages (dans les trois poulaillers), avec plus de 88 % des prélèvements positifs (Tableau 2). La comparaison des résultats obtenus sur les différents prélèvements a mis en évidence des différences très significative entre le nombre de poules positives par culture/PCR à partir des écouvillonnages trachéaux et le nombre de poules positives par la technique ARL classique, confirmant les résultats obtenus au cours de la première étude. La comparaison des résultats obtenus avec deux techniques sérologiques employées pour détecter les anticorps anti-*M. synoviae* a également mis en évidence une différence très significative entre l'ARL classique et l'ELISA. Peu de poules ont en

effet été détectées positives avec la technique ARL classique (de 3,3 à 13,3 % en fonction des bâtiments), alors que la quasi-totalité des poules étaient positives avec la technique ELISA (de 96,7 à 100 %). En revanche, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre le lot atteint par le syndrome des œufs à extrémité de verre et les deux autres lots ne présentant pas d'anomalies de la coquille. Ceci suggère que les différences observées entre les deux tests sérologiques ne sont pas liés à la présence de ce syndrome au sein des élevages (qui pourrait être dû à une infection par des souches variantes de *M. synoviae*).

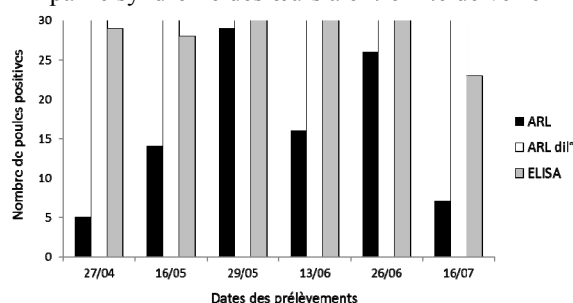
Tableau 2 : comparaison de l'ARL classique et de l'ELISA avec la PCR et la culture pour détecter une infection à *M. synoviae* dans deux élevages.

	Elevage A (EAA-) ^a	Elevage B (EAA-) ^a (EAA+)	
PCR	49/60 ^b (81,7) ^c	28/30 (93,3)	29/30 (96,7)
Culture	45/60 (75)	18/30 (60)	19/30 (63,3)
PCR + Culture	53/60 (88,3)	30/30 (100)	30/30 (100)
ARL	8/60 (13,3)	2/30 (6,7)	1/30 (3,3)
ELISA	60/60 (100)	29/29 (100)	29/30 (96,7)

^a : EAA+, avec syndrome des œufs à extrémité de verre, EAA-, sans syndrome ; ^b : nombre de poules positives sur nombre total de poules ; ^c : pourcentage de poules positives.

Afin de vérifier si ces différences observées entre les techniques sérologiques n'apparaissent que ponctuellement ou pouvaient être observées sur plusieurs semaines, un suivi sérologique de différents lots de poules pondeuses (deux lots de 39 semaines et deux lots de 50 semaines) au sein d'un troupeau atteint du syndrome des œufs à extrémité de verre a été réalisé sur plusieurs semaines. Des prises de sang ont été réalisées environ toutes les deux semaines pendant 2,5 mois.

Figure 1 : comparaison de trois techniques de détection des anticorps anti-*M. synoviae* au cours d'un suivi sérologique d'un lot de poules pondeuses atteint par le syndrome des œufs à extrémité de verre

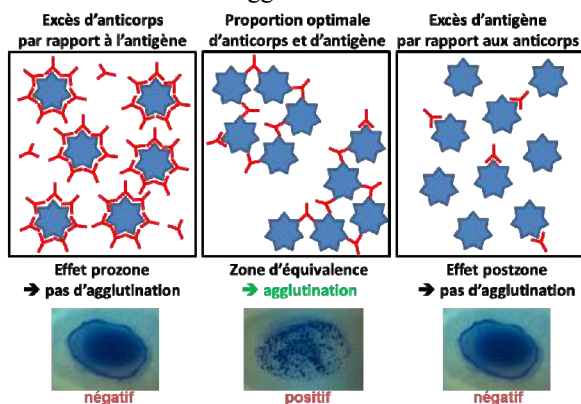


La comparaison des résultats obtenus avec trois techniques (ELISA, ARL classique, et ARL dilution) a mis en évidence des différences très significatives entre la technique ARL classique et la technique ARL

dilution ou l'ELISA dans tous les lots de poules prélevés : alors que la majorité des poules étaient positives avec ces deux dernières techniques (de 76,7 à 100 % en fonction des points de cinétique, du lot de poules et de la technique), de très fortes variations ont été observées avec la technique ARL classique, avec 3 à 96,7% de poules positives en fonction des points de cinétique (Figure 1, un seul lot de poules représenté). Des résultats similaires ont été obtenus avec les deux antigènes disponibles en France pour la technique ARL (Soleil SARL et Biovac) suggérant que ce phénomène n'est pas lié à la qualité de l'antigène utilisé.

Les différences observées entre les deux techniques ARL (classique et dilution) suggèrent un effet prozone, caractérisé par un excès d'anticorps dans le sérum, qui empêcherait l'observation d'une réaction d'agglutination normale (Figure 2). La formation de complexes antigènes-anticorps se produit en effet de façon optimale lorsque les sites antigéniques et les molécules d'anticorps sont approximativement en quantité égale (zone d'équivalence). La dilution systématique des sérums permettrait ainsi de réduire la concentration en anticorps par rapport à l'antigène et d'observer à nouveau une agglutination (retour à une proportion optimale d'anticorps et d'antigène).

Figure 2 : effet d'un excès d'anticorps ou d'antigène lors d'une réaction d'agglutination.



Ces différences importantes entre les deux techniques ARL ont été observées au cours de l'année 2016 dans d'autres élevages de poules pondeuses infectés par *M. synoviae*, avec ou sans syndrome des œufs à extrémité de verre (résultats non présentés). Elles ont également pu être mises en évidence dans des élevages infectés par *M. gallisepticum* (Tableau 3) : la

technique ARL dilution a permis de détecter significativement plus de poules positives vis-à-vis de *M. gallisepticum* que la technique ARL classique dans la plupart des lots prélevés. Ces résultats suggèrent que ce phénomène ne se limite pas aux infections par *M. synoviae* sur le terrain.

Tableau 3 : comparaison de différentes techniques sérologiques pour détecter une infection à *M. gallisepticum* dans différents lots de poules pondeuses.

	ARL classique	ARL dilution	ELISA
Elevage 1	6/20 ^a (30) ^b	20/20 (100)	20/20 (100)
Elevage 2			
Bât. A	11/30 (36,7)	29/30 (96,7)	ND
Bât. B	10/30 (33,3)	23/30 (76,7)	ND
Bât. C	2/20 (10)	2/20 (10)	ND
Bât. D	4/20 (20)	16/20 (80)	ND

^a : nombre de poules positives sur nombre total de poules ; ^b : pourcentage de poules positives.

CONCLUSION

Ces différents travaux montrent l'importance de la nature des prélèvements et des techniques de diagnostic utilisées pour dépister les infections par *M. synoviae* et *M. gallisepticum* chez les poules pondeuses. L'utilisation de la technique ARL classique peut en effet conduire à une forte sous-estimation du pourcentage de poules infectées (proportion importante de faux négatifs), voire à la non détection d'un lot infecté si d'autres techniques ne sont pas utilisées en complément (ELISA ou PCR). Ils posent également la question d'une modification des conditions d'utilisation de la technique ARL par les laboratoires de diagnostic (dilution systématique des sérums avant la mise en œuvre de la technique) pour permettre un meilleur dépistage des troupeaux infectés par *M. synoviae*. Cependant, cette technique modifiée n'est pas décrite dans les méthodes officielles de contrôle des mycoplasmoses aviaires (OIE et méthode NF U47-012).

D'autres études, notamment sur des lots de poulets de chair et de dindes, seraient nécessaires pour déterminer si ce phénomène peut être également observé dans ces deux filières.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Fergusson-Noel N., Noormohammadi A., 2013. In Diseases of poultry (Swayne D.E. et al., Ed.), Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA. p. 877-893.
- Frey M.L., Hanson R.P., Anderson D.P., 1968. Am. J. Vet. Res., 29, 2163-2171.
- Gautier-Bouchardon A.V., 2012. Le Nouveau Praticien Vétérinaire, 5 (20), 40-43.
- Gautier-Bouchardon A.V., Kempf I., 2008. Bull. Acad. Vét. France, 161 (2), 185-190.

- Kellog D. E., Kwok S., 1990. *In* PCR protocols: a guide to methods and amplification (Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., Eds), pp. 339–43. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Kempf I., 2006. *Le Nouveau Praticien Vétérinaire*, (3), 49-53.
- Kempf I., Blanchard A., Gesbert F., Guittet M., Bennejean G., 1993. *Avian Pathol.*, 22(4), 739-750.
- Lauerman L.H, Hoerr F.J., Sharpton A.R., Shah S.M., van Santen V.L., 1993. *Avian Dis.*, 37(3), 829-834.
- OIE, 2008. *In* Manuel des tests diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres (OIE Ed.), chap. 2.3.5., 16 pages.
- Raviv Z., Ley D.H., 2013. *In* Diseases of poultry (Swayne D.E. *et al.*, Ed.), Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA. p. 900-906.

DETECTION ET CARACTÉRISATION DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS ISOLÉ A PARTIR DE POULET DE CHAIR PRESENTANT DES SIGNES D'ENTÉRITE NÉCROTIQUE AU NIVEAU DE LA REGION DE TIARET

Merati Rachid^{1,2}. Temim Soraya² et Mohamed A.A.Abd El-Fattah³.

¹ *Laboratoire d'hygiène et de pathologie animale, université Ibn Khaldoun ,14000 Tiaret, Algérie.*

² *Laboratoire de recherche « santé et production animales»,
Ecole nationale supérieure vétérinaire d'Alger, 16000 Alger, Algérie.*

³ *Veterinary Serum and Vaccine Research Institute, Cairo, Egypt.*

drmerachi@yahoo.fr

RESUMÉ

L'objectif de cette étude est de détecter la présence du *Clostridium perfringens* (*Cl.perfringens*) agent causal de l'entérite nécrotique (EN) chez le poulet de chair dans différentes régions au niveau de la wilaya de Tiaret et de caractériser les souches isolées pour la présence des gènes *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA* et *netB*. Un total de 180 échantillons de contenu intestinal prélevés à partir de 70 élevages de poulet de chair (2 à 3 prélèvements par élevage) présentant des signes cliniques et des lésions évoquant une atteinte par l'EN, sur une période de 12 mois (août 2015 à juillet 2016), ont été analysés par des méthodes classiques d'isolement bactériologique et par PCR. *Cl.perfringens* a été isolé avec un taux de 34,44% (62/180) et confirmé par les caractères morphologiques, culturels et biochimiques. Sur les 62 souches de *Cl.perfringens*, 83,87% (52/62) étaient toxigènes et 16,13% (10/62) étaient non toxigènes. La PCR multiplex a été utilisée sur les 52 souches toxigènes afin de détecter les types de toxines sécrétées. Toutes les souches étaient positives pour le gène *cpa* et négatives pour les gènes *cpb*, *etx* et *iA*, indiquant ainsi que toutes les souches toxigènes correspondaient au *Cl.perfringens* de type A à 100% (52/52). Comme certaines études récentes ont mis en évidence un nouveau gène de virulence codant pour la toxine NetB, la PCR a été réalisée sur une sélection de 22 souches de type A afin de détecter ce dernier. Aucune souche n'a été positive pour le gène *netB*. Nos résultats indiquent que *Cl.perfringens*, agent causal de l'EN est détecté chez le poulet de chair au niveau de la région de Tiaret, et que toutes les souches toxigènes sont de type A avec une absence du gène *NetB* sur les souches sélectionnées. Ces résultats méritent d'être confirmés par d'autres investigations sur un plus grand nombre d'échantillons.

ABSTRACT

Detection and characterization of *Clostridium perfringens* isolated from necrotic enteritis in broiler chickens in Tiaret

The present study was carried out to investigate the presence of *Clostridium perfringens* (*Cl.perfringens*) in broiler chickens at different locations in Tiaret province, western Algeria, and characterization of *Cl.perfringens* isolates for the presence of *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA* and *netB* gene. A total of 180 samples collected from 70 broiler chicken flocks (2 to 3 samples by flock) in a period of 12 months from august 2015 to July 2016 representing intestinal contents of broiler chickens showing clinical signs and lesions suspected to be NE were analyzed by conventional methods and PCR. *C.perfringens* was isolated at the rate of 34.44 % (62/180) confirmed by cultural and biochemical characterization, out of 62 *C.perfringens* isolates, 83.87% (52/62) isolates were toxigenic and 16.13 % (10/62) were non toxigenic. Multiplex polymerase chain reaction was performed for toxinotyping of the 52 toxigenic isolates, all isolates were positives for the gene *cpa* and negatives for *cpb*, *etx* and *iA*, indicating that all the toxigenic isolates were *C.perfringens* type A 100% (52/52). Recent studies have shown the involvement of NetB toxin in the pathogenesis of the disease, therefore, PCR was carried out on 22 types A isolates, and which showed that none of the isolates were positive for the gene *netB*. This result indicates that the *C.perfringens* causative agent of NE is detected in broiler chickens in Tiaret province and characterized by type A positive *netB* negative genotype. These results should be confirmed by further investigations on an important number of samples.

INTRODUCTION

Clostridium perfringens (*Cl.perfringens*) est une bactérie anaérobie gram positif ayant un rôle primordial dans l'étiologie de l'entérite nécrotique (EN) qui cause de grandes pertes économiques dans l'industrie des volailles (Van Immerseel *et al.*, 2004). *Cl.perfringens* est responsable de la synthèse et la sécrétion de plus de 17 différentes toxines. Les souches de *Cl.perfringens* sont habituellement classées en 5 toxinotypes A, B, C, D et E en fonction de leurs capacités à produire des toxines possédant une activité létale majeure alpha (α), beta (β), epsilon (ϵ) et iota (i) (Uzal *et al.*, 2014). L'EN est causée principalement par le type A produisant la toxine alpha et parfois le type C produisant la toxine alpha et la toxine beta (Enstrom *et al.*, 2003), la toxine alpha a longtemps été considérée comme la principale cause de l'EN, alors qu'une nouvelle toxine NetB a été démontrée dans des souches de *Cl.perfringens* isolées d'animaux atteints d'entérite nécrotique (Keyburn *et al.*, 2008).

L'EN peut se présenter sous deux formes cliniques : elle peut se manifester comme une maladie aigue caractérisée par une augmentation soudaine du taux de mortalité allant jusqu'à 50% du cheptel avec une nécrose intestinale sévère (McDevitt *et al.*, 2006 ; Lee *et al.*, 2011), ou bien comme une infection sub-clinique associée à des lésions chroniques de la muqueuse intestinale conduisant à des problèmes tels qu'une diminution des performances et une réduction du gain de poids (Skinner *et al.*, 2010).

Autrefois, l'utilisation des antibiotiques promoteurs de croissance a permis le contrôle de cette maladie dans les élevages de volaille (Williams, 2005). Cependant, depuis l'interdiction de ces suppléments, une recrudescence de l'EN au sein des élevages a été observée (Cooper and Songer, 2009).

En Algérie, peu d'informations sur le *Cl.perfringens* agent causale de l'EN sont disponibles, en dépit de l'importance de cette pathologie dans les élevages avicoles. La présente étude a pour objectif de détecter la présence du *Cl.perfringens* agent causal de EN chez le poulet de chair dans différentes régions de la wilaya de Tiaret et de caractériser les souches isolées pour la présence des gènes *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA* et *netB* par la technique PCR.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Echantillonnage

Un total de 180 échantillons de contenu intestinal ont été prélevés de façon aseptique chez des poulets de chair (2-8 semaines) présentant des signes cliniques et des lésions évoquant une atteinte par l'EN, provenant de 70 élevages de poulet de chair (2 à 3 prélèvements par élevage d'un effectif moyen de 2500 poulets) localisés à différentes régions au niveau de la wilaya de Tiaret, sur une période de 12 mois (août 2015 à juillet 2016).

1.2. Isolement et identification du *Cl.perfringens*

Les contenus intestinaux ont été inoculés dans des tubes contenant du milieu viande cuite (Oxoid, UK) et incubés en anaérobiose à 37°C pendant 24 heures pour enrichissement, ensuite la culture a été ensemencée sur gélose TSC (Tryptone Sulphate Cycloserine) (Oxoid, UK) et incubée en anaérobiose à 37°C pendant 24-48 heures pour isolement du *Cl.perfringens* (Harmon, 1984).

Les colonies suspectées d'être *Cl. Perfringens* ont été identifiées par les caractères morphologiques et biochimiques comme recommandé précédemment (Koneman *et al.*, 1992 ; Macfaddin, 2000).

1.3. Détermination des souches toxigènes de *Cl.perfringens*

- Test de létalité sur souris effectué selon la méthode de Mariano *et al.* 2007.
- Test de la réaction de nagler par l'utilisation d'antitoxine spécifique, réalisé selon la méthode de Smith et Holdman 1968.

1.4. Extraction d'ADN

L'ADN a été extrait des souches toxigènes de *Cl.perfringens* en utilisant le kit de purification d'ADN (QIAamp DNA mini kit, QIAGEN, USA) comme recommandé par les instructions du fabricant.

1.5. La PCR multiplex pour la détection des toxines alpha, beta, epsilon et iota

Les amorces oligonucleotidiques spécifiques utilisées pour la détection des toxines alpha (α), beta (β), epsilon (ϵ) et iota (i) (Yoo *et al.*, 1996) sont illustrées dans le tableau 1. La réaction de PCR a été réalisée dans un cycleur thermique (TRIO thermal cycler, Biometric, Germany) sur un volume de réaction totale de 50 µl contenant : 8 µl d'extrait d'ADN, 25 µl EmeraldAmp GT PCR master mix (TAKARA, USA), 2 µl de chaque paire d'amorces spécifiques

pour les toxines alpha, beta, epsilon et iota (20 pmol μl^{-1}), 9 μl de PCR grade water. L'amplification pour la détection des toxines des gènes toxiques a été obtenue par une dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 min suivie par 35 cycles. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation à 94 °C pendant 30 sec, une étape d'hybridation à 55 °C pendant 45 sec, et une étape d'élongation à 72 °C pendant 45 sec et pour finir une étape d'élongation de 10 min à 72 °C.

Tableau 1. Les séquences des amorces oligonucleotidiques utilisées dans cette étude

Gènes	amorces	Séquences	Taille du produit (bp)
<i>cpa</i>	F	GTTGATAGCGCAGGACATGTTAAG	402
(α toxin)	R	CATGTAGTCATCTGTTCCAGCATC	
<i>cpb</i>	F	ACTATACAGACAGATCAATCAACC	236
(β toxin)	R	TTAGGAGCAGTTAGAACTACAGAC	
<i>etr</i>	F	ACTGCACTACTACTCATCTGTG	541
(ϵ toxin)	R	CTGGTGCCTTAATAGAAAGACTCC	
<i>it</i>	F	GCGATGAAAAGCCTACACCACTAC	317
(ι toxin)	R	GGTATATCCTCCAGCATATAGTC	
<i>NetB</i>	F	GCTGGTGTGGAATAATGC	560
(NetB toxin)	R	TCGCCATTGAGTAGTTTCCC	

1.6. La PCR uniplex pour la détection de la toxine NetB

Les amorces oligonucleotidiques spécifiques utilisées pour la détection de la toxine NetB (Datta *et al.*, 2014) sont illustrées dans le tableau 1. La PCR a été réalisée sur un volume de réaction totale de 25 μl contenant : 6 μl d'extrait d'ADN, 12,5 μl EmeraldAmp GT PCR master mix (TAKARA, USA), 2 μl de la paire d'amorces spécifiques pour la toxine NetB (20 pmol μl^{-1}), et la réaction a été complétée par 4,5 de PCR grade water. L'amplification pour la détection du gène toxique de la toxine a été obtenue par 35 cycles suivant une dénaturation initiale de 5 min à 94 °C. Chaque cycle comprend une dénaturation à 94 °C pendant 30 sec, hybridation à 58 °C pendant 45 sec, élongation à 72 °C pendant 45 sec et pour finir une élongation de 10 min à 72 °C.

Par la suite, 30 μl du produit d'amplification pour les gènes (α , β , ϵ et ι) et 20 μl de produit d'amplification pour le gène *netB* ont été soumis à l'électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% suivi d'une coloration au bromure d'éthidium. Les bandes amplifiées ont été visualisées et photographiées sous une lumière ultra violette.

2.1. Détection de *Cl.perfringens*

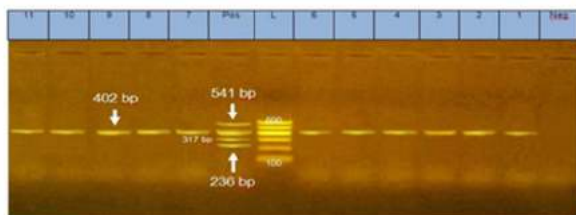
La présence de *Cl.perfringens* dans les élevages avicoles a été rapportée dans la plupart des régions du monde. Cette bactérie est considérée comme l'une des causes les plus fréquentes des infections gastro-intestinales et d'entérites nécrotiques chez la volaille (Van Immerseel *et al.*, 2004 ; McDevitt *et al.*, 2006). Dans la présente étude *Cl.perfringens* a été isolé à partir de 62 échantillons sur 180 analysés avec un taux de 34,44 %. Ces résultats sont en partie similaires à ceux rapportés par Bjerrum *et al.* (2006) qui ont mentionné que *Cl.perfringens* a été isolé avec un taux de 30%. Alors que, le groupe de Svobodova *et al.* (2007) ont isolé *Cl.perfringens* avec un taux de 18,39%, Schocken- iturrino *et al.* (2013) ont analysé 560 contenus intestinaux et ont démontré que *Cl.perfringens* a été trouvé dans 94 échantillons avec un taux de 16,78%.

Contrairement à nos résultats, Miwa *et al.* (1997) ont isolé *Cl.perfringens* dans 40 sur 50 contenus intestinaux de poulet de chair avec un taux de 80%. Ces variations constatées peuvent être expliquées par les différentes méthodologies utilisées pour l'isolement de la bactérie, la sélection des échantillons à analyser et les différences de gestion des exploitations de volaille. La faible proportion déterminée dans notre étude peut être expliquée par le fait que, en Algérie et particulièrement dans la région de Tiaret, l'utilisation incontrôlée des antibiotiques à titre préventif et curatif sans pour autant avoir déterminé la sensibilité à ces derniers, peut conduire à une destruction et un dysfonctionnement de la population bactérienne dans le tractus intestinal. *Cl.perfringens* est considéré comme étant un organisme commensal de l'intestin (Petit *et al.*, 1997), pour cette raison, on doit différencier entre les souches toxigènes de celles qui sont non toxigènes. Nos résultats ont révélé que sur les 62 souches de *Cl.perfringens* isolées, 52 souches (83,87%) étaient toxigènes et 10 souches non toxigènes prouvés par le test de létalité sur souris et le test de la réaction de nagler par l'utilisation d'antitoxine spécifique. Les résultats obtenus sont en partie en accord à ceux démontrés par El Jakee *et al.* (2013) qui ont enregistré une incidence des souches toxigènes de *Cl.perfringens* de 69,8%, tandis que, ceux non toxigènes était 30,2%.

2.2. La caractérisation moléculaire des souches toxigènes de *CL.perfringens* *Cl.perfringens* est associé à sa capacité à sécréter des toxines majeures et mineures qui jouent un rôle important dans la pathogénie et l'induction de la maladie. Le typage

moléculaire de *Cl.perfringens* par la PCR multiplex est une méthode rapide et efficace. Dans notre étude le typage de 52 souches toxigènes de *Cl.perfringens* par la PCR multiplex a révélé que toutes les souches étaient *Cl.perfringens* type A (figure1). Ceci est en accord avec les études précédentes menées aux Etats-unis (Trinh *et al.*, 2010), en Europe (Svobodova *et al.*, 2007) et en Australie (Keyburn *et al.*, 2006) .

Figure 2. la multiplex PCR pour le typage de *Cl.perfringens*

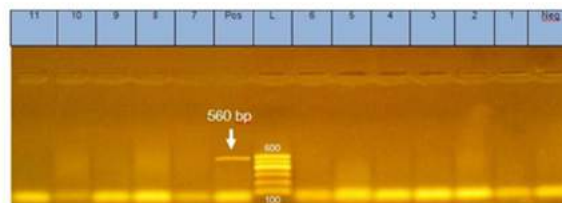


Pos : contrôle positif; Neg : contrôle négatif; L :échelle de marqueurs de poids moléculaires nucléotidiques (100-bp) ; lignes 1-11 : les souches de *Cl.perfringens* positifs pour le gène *cpa*.

Plusieurs études récentes ont démontrées l'implication d'autres toxines dans l'induction de l'EN .La plus intéressante d'entre elles est l'entérite nécrotique toxine B (NetB) , une toxine capable de causer des lésions typiques d'EN dans des modèles expérimentaux (Keyburn *et al.*, 2008).Selon notre étude, sur une sélection de 22 souches toxigènes de *Cl.perfringens* type A analysées par PCR uniplex , aucune des souches étaient positives pour la toxine NetB (figure 2).Ces résultats sont similaires aux résultats des travaux de Datta et al. (2014) qui ont enquêté sur la présence du gène *netB* dans 26 souches de *Cl.perfringens* type A et ont démontré qu'aucune des souches n'étaient positives pour ce gène. Les mêmes résultats ont été rapportés par Thomas *et al.* (2014) qui ont enregistré que les souches de *Cl.perfringens* testées pour la présence du gène *netB*

étaient négatives .A l'inverse, plusieurs études ont démontrées la présence du gène *netB* parmi une grande variété de souches de *Cl.perfringens*. Johansson *et al.* (2009) ont étudié la prévalence du gène *NetB* et ont rapporté que plus de 90 % des souches isolées à partir d'organes présentant des lésions spécifiques d'EN portaient le gène *NetB* .De plus, la présence de ce gène a été étudiée sur 36 souches de *CL.perfringens* provenant d'élevages infectés par Talooe et al.(2011) et a été détecté sur 19 souches avec un taux de 52.8% . L'absence de ce gène dans notre étude peut être expliquée par le nombre insuffisant d'échantillons analysés, ou l'origine des échantillons selon l'expression de la maladie.

Figure 3.Uniplex PCR pour la détection du gène *netB*



Pos : contrôle positif; Neg : contrôle négatif; L :échelle de marqueurs de poids moléculaires nucléotidiques (100-bp) ; lignes 1-11 : les souches de *Cl.perfringens* négatifs pour le gène *netB*.

3. CONCLUSION

La présente étude a démontré que *Cl.perfringens*, agent causal de l'EN est détecté chez le poulet de chair au niveau de la région de Tiaret, et que toutes les souches toxigènes sont de type A avec une absence du gène *netB* sur les souches sélectionnées. Ces résultats méritent d'être confirmés par d'autres investigations sur un plus grand nombre d'échantillons, et sur d'autres régions au niveau de l'Algérie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bjerrum L., Engberg R.M., Leser T.D., Jensen B.B., Finster K et Pedersen K .2006. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poultry Sci.*, (85), 1151-1164.
2. Datta S., Rakha N.K ., Narang G ., Arora D et Mahajan N.K .2014. Prevalence of α , β and Netb toxin producing strains of *Clostridium perfringens* in broiler chickens in Haryana. *Haryana Vet.*, 53 (1), 39-42.
3. Drigo I., Agnoletti F ., Bacchin C ., Bettini F ., Cocchi M ., Ferro T ., Marcon B et Bano L .2008. Toxin genotyping of *Clostridium perfringens* field strains isolated from healthy and diseased chickens. *Ital J anim Sci.*,(7), 397–400.

4. EI-Jakee J., Nagwa S.A., Mona A.E., Azza S.M.A., Riham H. H., Shawky N.M et Shawky H.M .2013 . Characterization of *Clostridium perfringens* isolated from poultry. *Global Vet.*, 11 (1), 88-94.
5. Enstrom B.E., Fermer C., Lindberg A., Saarinen .,Baverud A et Gunnarsson A .2003. Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Vet Microbiol.*, (94), 225-235.
6. Harmon S .1984. *Clostridium perfringens*: enumeration and identification . In : FDA bacteriological Analytical manual. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA; 1984 pp. 1701–1710.
7. Johansson A., Aspan A., Kaldhusdal M., et Engstrom B.E. 2009. Genetic diversity and prevalence of netB in *Clostridium perfringens* isolated from a broiler flock affected by mild necrotic enteritis. *Vet Microbiol.*, (144), 87-
8. Keyburn A. L., Boyce J.D., Vaz P., Bannam T. L., Ford M.E., Parker D., Di Rubbo A., Rood J et Moore R.J.2008.NetB a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLOS Pathog.*, (4), e26-e26.
9. Keyburn A. L., Sheedy S. A., Ford M. E., Williamson M.M., Awad M.M., Rood J.I et Moore R.J. 2006. Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect Immun.*, (74), 6496-6500.
10. Koneman E. W., Allen S. D., Janda W. M., Schreckenberger P.C et Winn W.C.1992. In : Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 4th ed. Philadelphia, USA: J.B. Lippincott Company.
11. Lee K.W., Lillehoj H.S., Jeong W., Jeoung H.Y and et D. J. 2011. Avian necrotic enteritis: experimental models host immunity pathogenesis risk factors and vaccine development. *Poultry Sci.*, (90), 1381–1390.
12. Macfaddin J.F. 2000 . Biochemical test for identification of medical bacteria 3rd Ed. Washington, Philadelphia, USA: Lippincott Williams and Wilkins.
13. McDevitt R. M., Brooker J.D., Acamovic T et Sparks N.H.C. 2006. Necrotic enteritis: a continuing challenge for the poultry industry. *World Poultry Sci J.*, (62), 221–247. 26.
14. Mariano E.F., Derek J.F., Rachael P., Sameera S., Vicki A., Julian I.R., Bruce A.M et Francisco A.U. 2007. Both epsilon-toxin and beta-toxin are important for the lethal properties of *Clostridium perfringens* Type B isolates in the mouse intravenous injection model. *Infect Immun.*, 75 (3):1443-1452.
15. Miwa N ., Nishina T., Kubo S et Honda H.1997. Most probable numbers of enterotoxigenic *clostridium perfringens* in intestinal contents of domestic livestock detected by nested PCR. *J Vet Med Sci.*, (59), 557 -560.
16. Petit L., Gilbert M et Popoff MR . 1997. *Clostridium perfringens*: Toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.*, (7), 104-110.
17. Schocken-Iturrino R.P., Vittori J., Massoli M.C.B et Meirelles Gama L.F.S.A. 2013 . Presence of *Clostridium perfringens* in broiler from chicken farms in ribeirão preto-sp. *ARS Vet.*, 29 (1), 37-41.
18. Skinner J.T., Bauer S., Young V., Pauling G et Wilson J. 2010. An economic analysis of the impact of subclinical (mild) necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Dis.*, (54), 1237-1240.
19. Smith L.D et Holdeman L.V. 1968. The Pathogenic Anaerobic Bacteria .1st Ed., Charles C- Thomas Publisher, U.S.A. pp: 201 - 205.
20. Talooe A., Shojadoost B., Peighambar S .M, Tamaddon Y.2011. Prevalence of netB gene among *Clostridium perfringens* isolates obtained from healthy and diseased chicks. *J Anim Vet Adv.*, (10) , 106–110 .
21. Thomas P, Arun T.R ., Arthik K. K., Berin P.V ., Kumar M.A., Usharani M.P., Gupta S.K., Dhama K et Viswas K. N . 2014. Molecular characterization and toxinotyping of a *Clostridium perfringens* isolate from a case of necrotic enteritis in Indian kadaknath fowl. *Asian J Anim. Vet Adv.*, (9), 385-394.
22. Uzal F.A., Freedman J. C., Shrestha A., Theoret R., Garcia J., Awad M.M ., Adam S.V., Moore R.J,

- Rood J et McClane B.2014.Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiol.*, (9), 361-377.
23. Van Immerseel F.J.D., Buck F., Pasmans G., Huyghebaert F., Haesebrouck et Ducatelle R.2004. *Clostridium perfringens* in poultry: An emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol.*,(33)537-549.
24. Williams R.B. 2005.Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens : Rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathol.* (34),159–180.
25. Yoo H.S., Lee S.U., Park K.Y et Park Y.H. 1996. Molecular Typing and Epidemiological Survey of Prevalence of *Clostridium perfringens* Types by Multiplex PCR. *J Med Microbiol.*, (35), 228-232.

Détection et caractérisation de *Clostridium perfringens* isolé à partir de poulet de chair présentant des signes d'entérite nécrotique au niveau de la région de Tiaret



Merati Rachid ^{1,2}. Temim Soraya ² et Mohamed A.A.Abd El-Fattah³.



¹ Laboratoire d'hygiène et de pathologie animale, université Ibn Khaldoun ,14000 Tiaret, Algérie.

² Laboratoire de recherche « santé et production animale », école nationale supérieure vétérinaire, 16000 Alger, Algérie.

³ Veterinary Serum and Vaccine Research Institute, Cairo, Egypt.
drmerachi@yahoo.fr

INTRODUCTION

Clostridium perfringens (*Cl. perfringens*) est une bactérie anaérobie gram positif ayant un rôle primordial dans l'étiologie de l'entérite nécrotique (EN) qui cause de grandes pertes économiques dans l'industrie des volailles (Van Immerseel *et al.*, 2004).

L'EN peut se manifester comme une maladie aigue caractérisée par une augmentation soudaine du taux de mortalité allant jusqu'à 50% du cheptel avec une nécrose intestinale sévère (Lee *et al.*, 2011), ou bien comme une infection sub-clinique associée à des lésions chroniques de la muqueuse intestinale conduisant à des problèmes tels qu'une diminution des performances et une réduction du gain de poids (Skinner *et al.*, 2010).

Autrefois, l'utilisation des antibiotiques promoteurs de croissance a permis le contrôle de cette maladie dans les élevages de volaille (Williams, 2005). Cependant, depuis l'interdiction de ces suppléments, une recrudescence de l'EN au sein des élevages a été observée (Cooper and Songer, 2009).

En Algérie, peu d'informations sur le *Cl. perfringens* agent causal de l'EN sont disponibles, en dépit de l'importance de cette pathologie dans les élevages avicoles.

OBJECTIFS

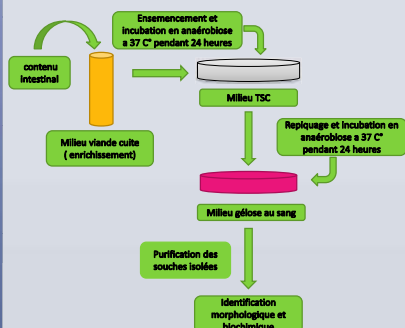
La présente étude a pour objectif de détecter la présence de *Cl. perfringens* agent causal de EN chez le poulet de chair dans différentes régions de la wilaya de Tiaret et de caractériser les souches isolées pour la présence des gènes *cpa*, *cpb*, *etx*, *ia* et *netB* par la technique PCR.

MATERIELS ET METHODES

Echantillonnage:

180 échantillons de contenu intestinal ont été prélevés à partir de poulet de chair présentant des signes cliniques et des lésions évoquant une atteinte par EN, sur une période de 12 mois (août 2015 - juillet 2016).

Isolément et identification:



Détermination des souches toxigènes de *Cl. perfringens*:

- Test de létalité sur souris.
- Test de la réaction de Nagler par l'utilisation d'antitoxine spécifique.

Typage moléculaire des souches toxigènes de *Cl. perfringens*

- La PCR multiplex a été réalisée sur 52 souches toxigènes de *Cl. perfringens* pour la détection des toxines alpha, beta, epsilon, iota.

Détection du gène *netB*:

- La PCR uniplex a été réalisée sur une sélection de 22 souches toxigènes de *Cl. perfringens* type A pour la détection du gène *netB*.

RESULTATS



Photo 1 : parties d'un intestin présentant des lésions évoquant une atteinte par EN

Détection de *Cl. perfringens*:

- *Cl. perfringens* a été isolé à partir de 62 échantillons sur 180 analysés (Figure.1):



Photo 2 : colonies entourées d'un halo noir caractéristique de *Cl. perfringens* sur milieu TSC



Photo 3: colonies de *Cl. perfringens* entourées de deux halos caractéristiques d'hémolyse sur milieu gélose au sang



Figure.1 : Taux de détection de *Cl. perfringens*

Activité toxigénique de *Cl. perfringens*:

- Sur les 62 souches de *Cl. perfringens* isolées, 52 souches étaient toxigènes et 10 souches non toxigènes (Figure.3).

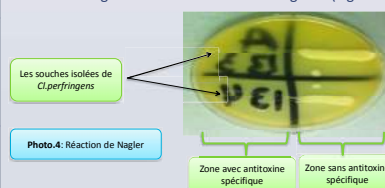


Figure.2 : Taux des souches toxigènes de *Cl. perfringens*

La caractérisation moléculaire des souches toxigènes de *Cl. perfringens*:

Application	Nombre de souche toxigènes de <i>Cl. perfringens</i>	Type de toxine			
		Alpha	Beta	Epsilon	Iota
PCR multiplex	52	52	00	00	00

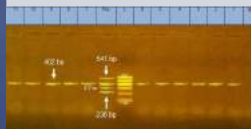


Figure.3 : la multiplex PCR pour le typage de *Cl. perfringens*

Pos : contrôle positif ; Neg : contrôle négatif ; L : échelle de marqueurs de poids moléculaires nucléotidiques (100-bp) ; lignes 1-11 : les souches de *Cl. perfringens* positifs pour le gène *cpa*.

Application	Nombre de souche toxigènes de <i>Cl. perfringens</i> Type A	Gène <i>netB</i>
PCR uniplex	22	00

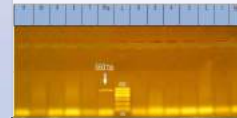


Figure.4 : Uniplex PCR pour la détection du gène *netB*

Pos : contrôle positif ; Neg : contrôle négatif ; L : échelle de marqueurs de poids moléculaires nucléotidiques (100-bp) ; lignes 1-11 : les souches de *Cl. perfringens* négatifs pour le gène *netB*.

DISCUSSION

Dans la présente étude *Cl. perfringens* a été isolé à partir de 62 échantillons sur 180 analysés avec un taux de 34,44 %. Ces résultats sont en partie similaires à ceux rapportés par Bjerrum *et al.* (2006), Svobodova *et al.* (2007) et Schocken-turrino *et al.* (2013) qui ont mentionné que *Cl. perfringens* a été isolé avec un taux de 30%, 18,39% et 16,78%, respectivement. Ces variations constatées peuvent être expliquées par les différentes méthodologies utilisées pour l'isolement de la bactérie, la sélection des échantillons à analyser et les différences de gestion des exploitations de volaille.

Sur les 62 souches de *Cl. perfringens* isolées, 52 souches (83,87%) étaient toxigènes et 10 souches non toxigènes. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux rapportés par El Jakee *et al.* (2013) qui ont enregistré une incidence des souches toxigènes de *Cl. perfringens* de 69,8%, tandis que, ceux non toxigènes étaient 30,2%.

Dans notre étude, le typage de 52 souches toxigènes de *Cl. perfringens* par la PCR multiplex a révélé que toutes les souches étaient *Cl. perfringens* type A (figure 4). Ceci est en accord avec les études précédentes menées aux Etats-unis (Trinh *et al.*, 2010), en Europe (Svobodova *et al.*, 2007) et en Australie (Keyburn *et al.*, 2006).

Sur une sélection de 22 souches toxigènes de *Cl. perfringens* type A analysées par PCR uniplex, aucune des souches étaient positives pour la toxine *netB* (figure 4). Ces résultats sont similaires aux résultats des travaux de Datta *et al.* (2014) et Thomas *et al.* (2014) qui ont noté que les souches de *Cl. perfringens* testées pour la présence du gène *netB* étaient négatives. A l'inverse, plusieurs études menées par Johansson *et al.* (2009) et Talooe *et al.* (2011) ont démontré la présence du gène *netB* parmi une grande variété de souches de *Cl. perfringens*. L'absence de ce gène dans notre étude peut être expliquée par le nombre insuffisant d'échantillons analysés, ou l'origine des échantillons selon l'expression de la maladie.

CONCLUSIONS

La présente étude montre que *Cl. perfringens*, agent causal de l'EN est détecté chez le poulet de chair au niveau de la région de Tiaret, et que toutes les souches toxigènes sont de type A avec absence du gène *netB* sur les souches sélectionnées. Ces résultats méritent d'être confirmés par d'autres investigations sur un plus grand nombre d'échantillons, et sur d'autres régions au niveau de l'Algérie.

REFERENCES

1. Bjerrum J., Engberg R.M., Leser T.D., Jensen B.B., Finster K et Pedersen K. 2006. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poultry Sci.*, (85), 1151-1164.
2. Datta S., Rakha N.K., Narang G., Arora D et Mahajan N.K. 2014. Prevalence of α and β toxin producing strains of *Clostridium perfringens* in broiler chickens in Haryana. *Haryana Vet.*, 53 (1), 39-42.
3. El-Jakee I., Nagve S.A., Mona A.E., Azza S.M.A., Riham H. H., Shawky N.M et Shawky H.M. 2013. Characterization of *Clostridium perfringens* isolated from poultry. *Global Vet.*, 11 (1), 88-94.
4. Johansson A., Asparn A., Kaldhusdal M., et Engstrom B.E. 2009. Genetic diversity and prevalence of *netB* in *Clostridium perfringens* isolated from a broiler flock affected by mild necrotic enteritis. *Vet Microbiol.*, (144), 87-92.
5. Keyburn A. L., Boyce J.D., Vaz P., Bannam T. L., Ford M.E., Parker D., Di Rubbo A., Rood J et Moore R.J. 2008. *NetB* a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLOS Pathog.*, (4), e26-e26.
6. Keyburn A. L., Sheedy S. A., Ford M. E., Williamson M.M., Awad M.M., Rood J. I et Moore R.J. 2006. Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect Immun.*, (74), 6406-6400.
7. Schocken-turrino R.P., Vittori J., Massoli M.C.B et Meirelles Gama L.F.S.A. 2013. Presence of *Clostridium perfringens* in broiler from chicken farms in ribeirão preto-sp. *ARS Vet.*, 29 (1),37-41.
8. Skinner J.T., Bauer S., Young V., Pauling G et Wilson J. 2010. An economic analysis of the impact of subclinical (mild) necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Dis.*, (54), 1237-1240.
9. Talooe A., Shojadoost B., Peighambar S. M, Tamaddon Y.2011. Prevalence of *netB* gene among *Clostridium perfringens* isolates obtained from healthy and diseased chicks. *J Anim Vet Adv.* (10), 106-110.
10. Thomas P., Arun T.R., Arthik K. K., Berin P.V., Kumar M.A., Usharani M.P., Gupta S.K., Dhama K et Vivas R. N. 2014. Molecular characterization and toxinotyping of a *Clostridium perfringens* isolate from a case of necrotic enteritis in Indian kadaknath fowl. *Asian J Anim. Vet Adv.*, (9), 385-394.
11. Trinh HT, Mallozzi M, Vedantam G, Songer JG: *Clostridium perfringens* alpha toxin is produced in the intestines of broiler chicks inoculated with an alpha toxin mutant. *Anaerobe*, 15 (6), 614-617, 2010.
12. Van Immerseel F.J.D., Buck F., Pasmans G., Huyghebaert F., Haesebrouck et Ducatelle R. 2004. *Clostridium perfringens* in poultry: An emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol.*, (33)537-549.
13. Williams R.B. 2005. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens : Rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathol.* (34),159-180.

DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE NOUVELLE METHODE DE DIAGNOSTIC DU BOTULISME AVIAIRE.

C. Le Maréchal¹, S. Rouxel¹, V. Ballan¹, E. Houard¹, T. Poezevara¹, M.H Bayon-Auboyer³, R. Souillard², H. Morvan³, Séverine Rautureau⁶, Isabelle Guerri⁶, Loïc Cartau⁶, M.A. Baudouard³, C. Woudstra⁴, C. Mazuet⁵, S. Le Bouquin², P. Fach⁴, M. Popoff⁵, M. Chemaly¹

¹ Anses, Laboratoire de Ploufragan – Plouzané, Unité Hygiène et qualité des produits avicoles et porcins, Université Bretagne-Loire, BP 53, 22440 Ploufragan, France

² Anses, Laboratoire de Ploufragan – Plouzané, Unité d'Epidémiologie et bien-être en aviculture et cuniculture, Université Bretagne-Loire, BP 53, 22440 Ploufragan, France

³ Laboce, 22440 Ploufragan, France

⁴ Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, 94 700 Maisons Alfort, France

⁵ Institut Pasteur, Bactéries anaérobies et Toxines, 75 724 Paris Cedex 15, France

⁶ Direction Générale de l'Alimentation 251 rue de Vaugirard, 75732 Paris Cedex 15, France

Caroline.lemarechal@anses.fr

RÉSUMÉ

Le diagnostic du botulisme aviaire est réalisé sur la base des symptômes cliniques qui sont évocateurs mais non caractéristiques et nécessite une confirmation en laboratoire pour identifier le type toxinique impliqué. Pour cela, deux approches sont possibles : la démonstration de la présence de la toxine botulique ou la démonstration de la présence du pathogène capable de produire la toxine botulique. Cette dernière approche a été retenue et une étude a été mise en place afin 1) d'identifier les prélèvements les plus pertinents à analyser pour confirmer le botulisme en laboratoire et 2) d'optimiser les paramètres de l'analyse. Le développement et la validation de la méthode ont été réalisés selon les recommandations de la norme NF U 47-600. Pour 63 suspicions de botulisme aviaire, les foies, rates, écouvillons cloacaux et contenus intestinaux ont été prélevés sur des animaux suspects et ont été analysés par PCR temps réel après enrichissement en conditions anaérobies. Suite à la sélection de l'organe à prélever lors de la première partie de l'étude, les étapes allant des conditions de conservation du prélèvement jusqu'à l'extraction d'ADN ont été optimisées à partir de matrices d'origine aviaire naturellement et artificiellement contaminées. Cette étude montre que l'analyse des foies prélevés sur 4 animaux suspects permet d'obtenir le taux de confirmation le plus élevé (97%). Les prélèvements de foie peuvent être conservés 24h à 5°C avant mise en analyse ou à une température inférieure à -18°C s'ils doivent être conservés plus longtemps. La prise d'essai optimal est l'organe entier. La température optimale d'enrichissement est 37°C de préférence en enceinte anaérobie. L'analyse de 73 suspicions en appliquant cette méthode montre une spécificité de 100 % et une sensibilité de 95.35% en comparaison avec d'autres méthodes PCR.

ABSTRACT

Development and validation of a new method for the diagnosis of avian botulism

Avian botulism diagnosis is based on clinical symptoms which are indicative but not specific and requires laboratory confirmation. Two strategies can be applied: demonstration of the presence of the BoNT or of the presence of the BoNT-producing clostridia. This latter strategy was selected and a study was implemented to 1) determine the most relevant samples for avian botulism diagnosis, 2) optimize the method. Development and validation of the method was done according to the recommendations of Norma NF U 47-600. Livers, spleens, cloacal swabs and intestinal contents from 63 suspicions were collected from suspected animals and analyzed using real-time PCR after an enrichment step in anaerobic conditions. After the selection of the most relevant matrix, steps going from the conditions of sample preservation to DNA extraction were optimized using both naturally contaminated samples and spiked samples. This study shows that the analysis of whole livers collected from 4 animals is the best approach to confirm botulism (97% of confirmation). Livers can be stored at 5°C during 24h before the analysis or at -18°C if needed. Analysis of whole liver is recommended. Optimal temperature for the enrichment is 37°C in an anaerobic station. Analysis of 73 suspicions using the method developed here, showed a specificity of 100 % and sensitivity of 95.35 % when compared to other PCR methods.

INTRODUCTION

Le botulisme est une affection neuromusculaire due à l'action de toxines produites par *Clostridium botulinum*. Il existe 7 types toxiques annotés de A à G. Le botulisme humain est associé aux types A, B, E et F. Les cas de botulisme animal recensés ces dernières années en Europe sont majoritairement associés aux toxines mosaïques C/D et D/C (Skarin et al. 2013; Woudstra et al., 2012). Le diagnostic du botulisme animal peut se faire de deux façons : soit par la mise en évidence de la toxine botulique soit par la mise en évidence de la présence de clostridies capables de produire la toxine botulique. Cette dernière approche a été retenue et un outil de détection de PCR en temps réel a été développé (Woudstra et al. 2012). Les étapes d'analyse qui précèdent l'étape de PCR en temps réel n'ont pas été optimisées jusqu'à présent. Dans cette étude nous nous sommes donc intéressés aux étapes d'analyse réalisées en amont de la PCR en temps réel et à leur optimisation: choix du prélèvement à analyser, conditions de conservation des prélèvements, prise d'essai, conditions d'enrichissement. La méthode ainsi développée a ensuite été validée selon les recommandations de la norme NF U 47-600 partie 2. Des échantillons naturellement ou artificiellement contaminés ont été utilisés dans cette étude.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Analyse des prélèvements sur animaux

Entre 2013 et 2016, il a été demandé aux vétérinaires (sur la base du volontariat) d'envoyer des foies, rates, contenus intestinaux, écouvillons cloacaux prélevés sur 5 animaux (de préférence animaux malades euthanasiés) en cas de suspicion de botulisme aviaire. Les contenus intestinaux ont été regroupés et 1g de mélange a été analysé. Pour les foies, différentes prises d'essai ont été testées : pool des 5 foies puis analyse d'1g, analyse individuelle d'1g de chaque foie, analyse des foies entiers individuellement (max 25g).

Tous les prélèvements ont été dilués au 1/10^{ème} dans du milieu régénéré Tryptone Peptone Glucose Yeast (TPGY) (Skarin et al. 2010), homogénéisés à l'aide d'un Pulsifier® (Microgen, Surrey, UK) pendant 15 secondes. L'ensemble des prélèvements a été incubé au moins 48h à 37°C dans une enceinte anaérobie.

1.2 Inoculation artificielle des foies.

Des foies de poulets de chair ont été broyés à l'aide d'un mixeur puis aliquotés par 5g. Ils ont ensuite été artificiellement inoculés par différentes quantités de spores de clostridies. Une souche de type C (CIP 109 785), une de type D (CIP 105 256) et une de type E (HV) ont été utilisées. Les spores ont été préparées selon Lindberg et al. 2010.

Une fois contaminés, les échantillons ont été dilués au 1/10^{ème} dans du TPGY régénéré puis homogénéisés via l'utilisation du Pulsifier® pendant 15 secondes et incubés au moins 24h en anaérobiose avant extraction d'ADN.

1.3. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir d'1ml de chaque enrichissement via le kit commercial QiaAmp DNA MiniKit® (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

1.4 PCR en temps réel

La détection des gènes codant pour les toxines C, D, C/D, D/C et E a été réalisée par PCR en temps réel tel que décrit précédemment (Le Maréchal et al. 2016) et un kit commercial (QuantiFast Pathogen +IC kits, Qiagen) a été utilisé comme contrôle interne.

1.5 Conditions de conservation des prélèvements

Des foies contaminés artificiellement ont été conservés à température ambiante, 5°C ou -18°C pendant des durées variables (allant de 24h à 6 mois selon les températures). Ils ont ensuite été analysés selon la méthode décrite ci-dessus. Six réplicats ont été réalisés pour chaque condition.

1.6 Conditions d'enrichissement

Des foies contaminés artificiellement ont été incubés à 3 températures : 30°C, 37°C et 41,5°C. Ils ont ensuite été analysés selon la méthode décrite ci-dessus. Six réplicats ont été réalisés pour chaque condition.

Trois modes d'anaérobiose ont aussi été testés : enceinte anaérobiose, jarre avec gaz ou jarre avec AnaeroGen (Oxoid). Six réplicats ont été réalisés pour chaque condition.

1.7 Validation de la méthode

Des foies ont été contaminés artificiellement avec différents niveaux de spores puis analysés selon la méthode développée dans l'étude. La dernière dilution de spores permettant d'obtenir 100 % de détection est considérée comme la limite de détection de la méthode. Huit réplicats ont été réalisés pour chaque condition.

L'analyse de 73 suspicions a été réalisée avec la méthode développée. Les résultats obtenus ont été comparés avec d'autres méthodes PCR publiées (Hill et al. 2010 ; Kougouchi et al. 2006) afin de déterminer la spécificité et sensibilité de la méthode.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Identification du prélèvement à analyser.

Soixante-trois suspicions (49 en élevage, 14 en faune sauvage) ont été analysées et 37 d'entre-elles ont été confirmées. Les épisodes étaient majoritairement de type C/D (84 %), aucun épisode de type E n'a été

diagnostiqué. L'analyse des foies a permis de confirmer 97 % des épisodes de botulisme contre 90 % via l'analyse des rates, 93 % via l'analyse des écouvillons cloacaux et 46 % via l'analyse des contenus intestinaux poolés (Figure 1) et constitue donc la matrice la plus appropriée pour la détection de *C. botulinum* en cas de botulisme aviaire. Le foie avait été choisi à l'origine car la présence de *C. botulinum* dans cet organe lors d'épisodes de botulisme aviaire a été rapportée à plusieurs reprises dans la littérature (Annibali et al. 2013, Dohms et al. 1982, Franciosa et al. 1996, Popp et al. 2012, Włodarczyk et al. 2014). Les contenus intestinaux poolés ne semblent pas une bonne matrice pour détecter *C. botulinum* par PCR. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de la flore annexe qui inhiberait *C. botulinum* pendant la phase d'enrichissement (Okereke et al. 1991, Krüger et al. 2013) ou par le fait de pooler les échantillons qui pourrait avoir un effet de dilution (Le Maréchal et al. 2016).

L'analyse de 4 foies permet d'obtenir les mêmes résultats que l'analyse de 5 foies (méthode statistique adaptée de Sandberg et al. 2006). Ceci pourrait s'expliquer par le fort taux d'échantillons positifs parmi les échantillons analysés dans les élevages atteints.

2.2 Prise d'essai pour l'analyse des foies

Différentes prises d'essai ont été testées pour 34 suspicions de botulisme aviaire dont 22 confirmés. L'analyse des foies en entier (dans la limite de 25g) est la méthode qui permet d'obtenir la meilleure sensibilité (100 % de détection) par rapport à l'analyse d'1g de chaque foie (90 % de confirmation), ou de pools de foie (58 % de confirmation). Ces résultats montrent que la contamination n'est pas homogène dans le foie et que l'analyse de l'organe en entier est préférable.

2.3 Conditions de conservation des foies.

Des foies inoculés artificiellement avec 5 spores par gramme de foie ont été conservés 7 jours à température ambiante, à 5°C et à -18°C. Seuls les foies stockés à -18°C ont permis de détecter *C. botulinum*, aucune détection n'a été mise en évidence pour les foies stockés à 5°C ou à température ambiante pendant 7 jours. La conservation des foies à 5°C est possible pendant 24 h sans modification de sensibilité de la méthode mais une diminution de la détection est observée à partir de 48 h de conservation à cette température (83,5 % de détection pour le type C et 50 % pour le type D pour les foies inoculés avec 5 spores/g de foie). Au contraire la détection reste identique après 1 mois et 6 mois de stockage à -18°C. Ces résultats montrent que les foies peuvent être stockés avant analyse à 5°C pendant 24 h ou à -18°C pour une durée de stockage plus longue.

Conditions d'enrichissement

Des foies inoculés artificiellement avec 5 spores par gramme de foie ont été incubés 24 h dans une enceinte anaérobie ou une jarre remplie de gaz ou une jarre avec un sachet AnaeroGen (Oxoid) à 37°C. Les résultats montrent que l'enceinte anaérobie permet d'obtenir une meilleure sensibilité que les deux autres méthodes (100 % de détection pour les foies inoculés avec 5 spores/g de foie contre 33,3% pour la jarre avec le gaz et 66,7 % pour la jarre avec un sachet pour la souche de type C) et doit donc être privilégiée. Aucune différence n'a été notée avec la souche de type D pour les 3 modes d'anaérobiose.

Des foies inoculés artificiellement avec 5 spores par gramme de foie ont été incubés 24 h à 30°C, 37°C ou 41,5°C en anaérobiose. Les résultats montrent que la souche de type C est bien détectée à 41,5°C et 37°C alors que la souche de type D est bien détectée à 30°C et 37°C. La température de 37°C apparaît donc comme la température consensus pour détecter les deux souches en même temps.

Validation de la méthode

Des foies ont été inoculés artificiellement avec différentes quantités de spores de *C. botulinum* de type C, D ou E (Tableau 1) et analysés selon la méthode développée dans cette étude (Figure 2). La limite de détection est de 5 spores/g de foie pour les souches de type C et D testées et 250 spores/g de foie pour la souche de type E.

Des échantillons naturellement contaminés (268 foies provenant de 73 suspicions de botulisme en France en 2014 et 2015) ont été analysés selon la méthode développée dans cette étude (Figure 2) et les résultats obtenus ont été comparés avec d'autres PCR (Kougouchi et al. 2006, Hill et al. 2010). A l'échelle de la suspicion, la méthode a une sensibilité de 95,35 % [90,52 %-100 %] et une spécificité de 100 %.

CONCLUSION

Cette étude a permis de développer et valider une méthode robuste et sensible pour le diagnostic du botulisme aviaire. Cette méthode consiste en l'analyse de 4 foies entiers (dans la limite de 25g) prélevés sur des animaux symptomatiques. Les prélèvements peuvent être conservés 24 h à 5°C puis à -18°C avant mise en analyse. Chaque foie est enrichi individuellement à 37°C en enceinte anaérobie pendant au moins 24 h puis l'ADN est extrait et la détection est réalisée par PCR en temps réel.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier l'ensemble des éleveurs, des vétérinaires et des organisations de production pour leur participation à l'étude. Cette étude est financée par le conseil général des Côtes d'Armor et la Direction Générale de l'Alimentation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFNOR 2015 NF U47-600-1. Méthodes d'analyse en santé animale - PCR (réaction de polymérisation en chaîne) - Partie 1 : exigences et recommandations pour la mise en œuvre de la PCR en santé animale.
- AFNOR 2015 NFU 47-600-2. Méthodes d'analyse en santé animale - PCR (réaction de polymérisation en chaîne) - Partie 2 : exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale.
- Anniballi, F., Auricchio, B., Woudstra, C., Fach, P., Fiore, A., Skarin, H., Bano, L., Segerman, B., Knutsson, R., De Medici, D., 2013. Multiplex real-time PCR for detecting and typing *Clostridium botulinum* group III organisms and their mosaic variants. *Biosecurity and Bioterrorism* 11, S207-S214.
- Dohms, J.E., Allen, P.H., Rosenberger, J.K., 1982. Cases of type C botulism in broiler chickens. *Avian Dis* 26, 204-210.
- Dohms, J.E., Cloud, S.S., 1982. Susceptibility of broiler chickens to *Clostridium botulinum* type C toxin. *Avian Dis* 26, 89-96.
- Hill, B.J., Skerry, J.C., Smith, T.J., Arnon, S.S., Douek, D.C., 2010. Universal and specific quantitative detection of botulinum neurotoxin genes. *BMC Microbiol* 10, 267.
- Kouguchi, H., Suzuki, T., Hasegawa, K., Mutoh, S., Watanabe, T., Niwa, K., Yoneyama, T., Katoh, Y., Ohyama, T., 2006. Quantitative detection of gene expression and toxin complex produced by *Clostridium botulinum* serotype D strain 4947. *J Microbiol Methods* 67, 416-423.
- Krüger, M., Shehata, A.A., Schrödl, W., Rodloff, A., 2013. Glyphosate suppresses the antagonistic effect of *Enterococcus* spp. on *Clostridium botulinum*. *Anaerobe* 20, 74-78.
- Le Marechal, C., Ballan, V., Rouxel, S., Bayon-Auboyer, M.H., Baudouard, M.A., Morvan, H., Houard, E., Poezevara, T., Souillard, R., Woudstra, C., Le Bouquin, S., Fach, P., Chemaly, M., 2016. Livers provide a reliable matrix for real-time PCR confirmation of avian botulism. *Anaerobe* 38, 7-13.
- Lindberg, A., Skarin, H., Knutsson, R., Blomqvist, G., Baverud, V., 2010. Real-time PCR for *Clostridium botulinum* type C neurotoxin (BoNTC) gene, also covering a chimeric C/D sequence-Application on outbreaks of botulism in poultry. *Veterinary Microbiology* 146, 118-123.
- Okereke, A., Montville, T.J., 1991. Bacteriocin-mediated inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria at refrigeration and abuse temperatures. *Appl Environ Microbiol* 57, 3423-3428.
- Popp, C., Hauck, R., Gad, W., Hafez, H.M., 2012. Type C botulism in a commercial Turkey farm: A case report. *Avian Diseases* 56, 760-763.
- Sandberg, M., Ostensvik, O., Aunsmo, A.L., Skjerve, E., Hofshagen, M., 2006. An evaluation of sampling- and culturing methods in the Norwegian action plan against *Campylobacter* in broilers. *Int J Food Microbiol* 106, 313-317.
- Skarin, H., Lindberg, A., Blomqvist, G., Aspan, A., Baverud, V., 2010. Molecular characterization and comparison of *Clostridium botulinum* type C avian strains. *Avian Pathology* 39, 511-518.
- Skarin, H., Tevell Åberg, A., Woudstra, C., Hansen, T., Löfström, C., Koene, M., Bano, L., Hedeland, M., Anniballi, F., De Medici, D., Olsson Engvall, E., 2013. The workshop on animal botulism in Europe. *Biosecurity and Bioterrorism* 11, S183-S190.
- Wlodarczyk, R., Minias, P., Kukier, E., Grenda, T., Smietanka, K., Janiszewski, T., 2014. The first case of a major avian type C botulism outbreak in Poland. *Avian Dis* 58, 488-490.
- Woudstra, C., Skarin, H., Anniballi, F., Fenicia, L., Bano, L., Drigo, I., Koene, M., Bayon-Auboyer, M.H., Buffereau, J.P., De Medici, D., Fach, P., 2012. Neurotoxin gene profiling of *Clostridium botulinum* types C and D native to different countries within Europe. *Appl Environ Microbiol* 78, 3120-3127.

Tableau 1. Détermination des limites de détection de la méthode : Pourcentage de détection pour chaque souche en fonction de la quantité de spores artificiellement inoculée dans la matrice foie. (- : Non Testé, NPP : Nombre le plus probable)

		Type toxinique		
		C	D	E
Spores (NPP/g foie)	500	-	-	100%
	250	-	-	100%
	50	100%	100%	75%
	5	100%	100%	0%
	<1	38%	63%	-

Figure 1. Résultats de confirmation des suspicions de botulisme aviaire en fonction des prélèvements analysés.
CI : pool de contenus intestinaux

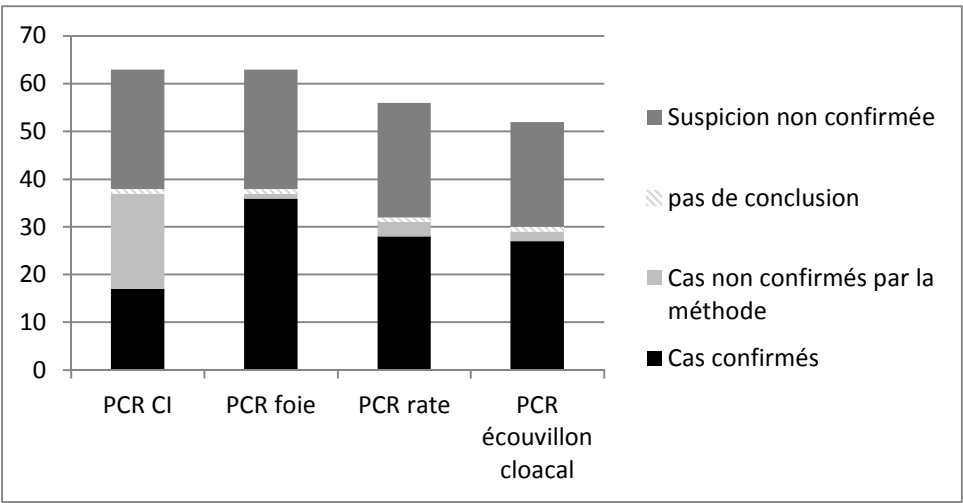
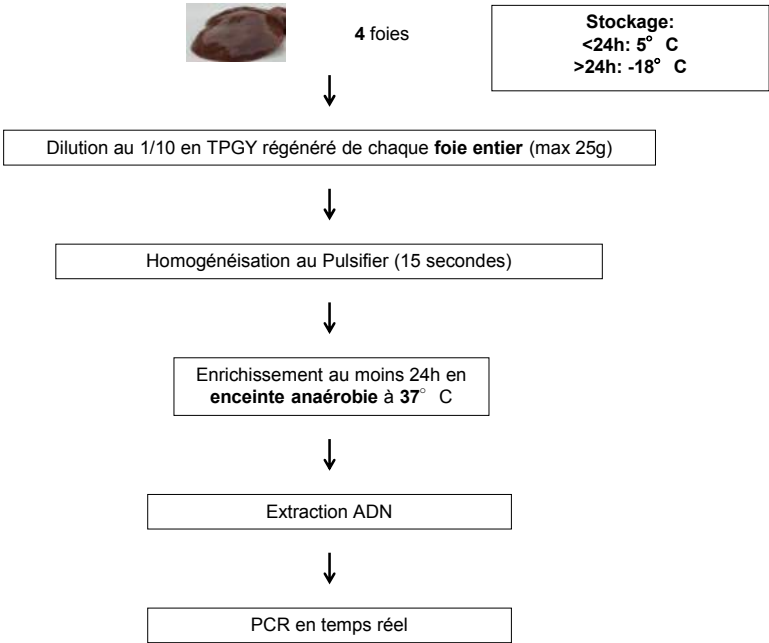


Figure 2 : Méthode de diagnostic du botulisme aviaire développée et validée dans cette étude.



EVALUATION DE LA CONTAMINATION DU FUMIER SUITE A UN EPISODE DE BOTULISME AVIAIRE

C. Le Maréchal, S. Rouxel, L. Balaine, T. Poëzévara, V. Ballan, M. Chemaly, S. Le
Bouquin et R. Souillard

ANSES Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, BP53, 22440 PLOUFRAGAN, France
caroline.lemarechal@anses.fr

RÉSUMÉ

Des épisodes de botulisme sont rapportés annuellement dans les élevages avicoles. La gestion des opérations de nettoyage-désinfection et des effluents reste délicate. *C. botulinum* est en effet une bactérie sporulante, capable de résister dans l'environnement pendant plusieurs années et pouvant donner lieu à des récurrences. L'objectif de cette étude préliminaire est d'évaluer la contamination de fumier stocké suite à un épisode de botulisme et l'évolution de cette contamination dans le temps. Pour cela, 5 élevages ont été suivis : 2 élevages de dindes (type D et D/C), 2 élevages de poulets (type C/D) et un élevage de poules (type C/D). Pour chaque élevage, suite au stockage du fumier à l'extérieur, 2 visites ont été réalisées avec 1 à 2 mois d'intervalle. Lors de chaque visite, le tas de fumier a fait l'objet de 15 prélèvements avec 5 prélèvements (2 en surface et 3 en profondeur) réalisés dans 3 endroits différents. Des données épidémiologiques sur les épisodes de botulisme et la gestion du fumier ont également été collectées. Les prélèvements de fumier ont été enrichis en milieu TPGY pendant au moins 4 jours à 37°C en conditions anaérobies puis stockés à -18°C. L'ADN a ensuite été extrait via l'utilisation d'un kit commercial puis la présence des gènes codant pour les toxines botuliques a été détectée par PCR en temps réel. *C. botulinum* a été détecté dans les tas de fumiers des 5 élevages investigués lors d'au moins une des deux visites, que ce soit dans les prélèvements réalisés en surface (60,7%) ou en profondeur (46,9 %). Le nombre de prélèvements détectés positifs était plus élevé lors de la seconde visite (68 %) que lors de la première (42,2 %), indiquant une forte persistance de *C. botulinum* dans les fumiers au cours du temps. Cette étude préliminaire montre l'importance de la mise en place de mesures appropriées pour la gestion des fumiers qui constitue une source de re-contamination.

ABSTRACT

Botulism is a neuroparalytic disease due to the action of botulinum toxins, produced by *Clostridium botulinum*. Botulism outbreaks are reported each year in poultry farms in France. Animal botulism management is tricky, notably cleaning and disinfection operations and management of contaminated manure. *C. botulinum* is a spore-producing pathogen that can survive decades in the environment and induce recurrence of botulism outbreaks or cross-contaminations between farms. The objective of this preliminary study is to evaluate the contamination of manure after an outbreak and its development over time. Five farms were selected: 2 turkey farms (type D and D/C), 2 broiler farms (type C/D) and one laying farm (type C/D). Each farm was visited twice one month apart after removal of the manure from the house and its storage outside. Fifteen different samples were collected each time, including 5 samples (2 on the surface and 3 at depth) at 3 different positions. Epidemiological data were collected regarding the outbreak and manure management. Samples were diluted in TPGY and incubated during at least 4 days at 37°C under anaerobic conditions and then stored at a temperature below -18°C. DNA extraction was performed using a commercial kit and detection of genes encoding botulinum toxin was performed using real-time PCR. *C. botulinum* was detected in all investigated manure during at least one of the visits, in both samples collected on surface (60.7 %) or in depth (46.9 %). *C. botulinum* was detected in a higher number of samples at the second visit (68 %) than at the first one (42.2 %), showing a high persistence of *C. botulinum* in manure over time. This study demonstrates that management of manure is a key point in preventing recurrence of the outbreak.

INTRODUCTION

Le botulisme est une affection nerveuse paralytique provoquée par l'action de neurotoxines produites par *Clostridium botulinum*, une bactérie anaérobie et sporulante. Le botulisme humain est principalement associé aux toxines A, B et E et plus rarement F, alors que le botulisme animal est principalement lié aux toxines C/D, D/C, C et D (Woudstra et al., 2012, Skarin et al. 2013). Des épisodes de botulisme aviaire de type E ont déjà été diagnostiqués en France en élevage et en faune sauvage. Ce type toxinique étant dangereux pour l'homme, il fait l'objet d'une surveillance. Les spores de *C. botulinum* peuvent résister pendant de nombreuses années dans l'environnement et être à l'origine de récurrences dans les élevages (Okamoto et al., 1999). Le fumier de volailles peut également être à l'origine de cas de botulisme chez les bovins, suite à de l'épandage de fumier sur les pâtures (Popoff 1989, Payne, 2011). La gestion des opérations de décontamination d'un élevage de volailles suite à un épisode de botulisme est délicate, notamment en ce qui concerne le devenir des effluents. Aucune donnée n'est actuellement disponible sur la persistance des spores de *C. botulinum* dans le fumier. L'objectif de cette étude préliminaire est d'évaluer la contamination par *C. botulinum* de fumiers stockés suite à un épisode de botulisme aviaire et l'évolution de cette contamination dans le temps.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Prélèvements des échantillons de fumier et collecte de données en élevage

Cinq élevages de volailles atteints de botulisme ont été suivis. Pour chaque élevage, après l'enlèvement du fumier du bâtiment et son stockage à l'extérieur, 2 visites ont été réalisées. La première visite a eu lieu 1 à 2 semaines après la sortie du fumier et la seconde visite a eu lieu 1 à 2 mois plus tard. Le délai pour la seconde visite était variable, car dépendait du devenir du fumier et de sa présence sur l'exploitation. Lors de chaque visite, le tas de fumier a fait l'objet de 15 prélèvements : 5 prélèvements (2 en surface et 3 en profondeur) réalisés à 3 endroits différents. Les prélèvements en profondeur ont été effectués à environ 50 cm. Par ailleurs, la température du fumier a été relevée à l'aide d'une sonde lors de chaque prélèvement. Des données épidémiologiques sur les cas de botulisme et sur les modalités de gestion du fumier ont également été collectées.

1.2. Analyses des échantillons de fumier

Les fumiers ont été dilués au $\frac{1}{2}$ puis au $\frac{1}{5}$ dans du milieu TPGY (Tryptone Peptone Glucose Yeast) puis homogénéisés à l'aide d'un Pulsifier® (Microgenbioproducts) pendant 15 secondes. Ils ont ensuite été incubés pendant au moins 4 jours à 37°C en conditions anaérobies (Station A35, Don Whitley). Les enrichissements ont ensuite été stockés plusieurs mois à une température inférieure à -18°C. L'ADN a été extrait à partir d'1 ml de chaque enrichissement avec le kit NucleoSpin Soil (Macherey Nagel). Les gènes codant pour les toxines C, D, C/D et D/C ont été détectés par PCR en temps réel à partir de ces extraits. Les amorces et sondes utilisées sont celles décrites précédemment (Souillard et al. 2014). Chaque PCR est réalisée dans un volume final de 25 µL, contenant 5 µL d'ADN, 10 µL de PerfeCTa qPCR ToughMix (Quanta BioSciences), une concentration finale de 600 nm des amorces et 400 nm de sonde. Le profil d'amplification consiste en une dénaturation pendant 5 minutes à 95°C puis à 45 cycles avec une dénaturation à 95°C pendant 15 secondes, puis une extension à 55°C pendant 30 secondes. Un kit commercial (QuantiFast Pathogen +IC kits, Qiagen) a été utilisé comme contrôle interne.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Les 5 épisodes de botulisme et la gestion du fumier

Les 5 épisodes de botulisme ont été suivis dans 2 élevages de dindes (type D et D/C), 2 élevages de poulets (type C/D) et 1 élevage de poules pondeuses (type C/D). Pour chaque élevage, la contamination par des spores de *C. botulinum* a été investiguée dans un seul tas de fumier, sauf pour l'élevage 46 pour lequel 2 tas de fumiers ont été suivis, suite au départ non simultané des dindes femelles et mâles. Les caractéristiques des cas de botulisme et les modalités de gestion du fumier dans ces élevages sont décrites dans le tableau 1. Pour les volailles de chair, la maladie est apparue entre 40j et 87j d'âge, et pour les poules pondeuses en fin de période de ponte à 62 semaines. La mortalité associée à la maladie a varié de 2% à 25%. Concernant la gestion du fumier, sur les 6 tas de fumiers suivis, de la chaux a été ajoutée dans 4 tas de fumier : ajout de chaux dans le bâtiment (Cas 4), ajout de chaux dans le bâtiment et également lors de la mise en tas à l'extérieur (Cas 22), et ajout de

chaux uniquement lors de la mise en tas à l'extérieur (Cas 44 et 46F). Pour 2 d'entre eux, le tas a ensuite été bâché (cas 22 et 4). Une incinération du fumier a été observée lors des visites pour 2 tas: cas 44 et le cas 46F. Celle-ci était en cours dès la première visite. Pour les 2 tas de fumier pour lesquels aucun produit n'a été ajouté (cas 46M et cas B9), ils ont simplement été stockés et bâchés pour l'un d'entre eux (cas B9). Suite à un épisode de botulisme aviaire, le fumier représente une source de contamination pour l'environnement et peut notamment être à l'origine de cas de botulisme chez des bovins lors de l'épandage de fumier sur les pâtures (Appleyard et al., 1985 ; Clegg et al., 1985 ; Payne et al. 2011, Popoff 1989). Selon le rapport AFSSA (AFSSA, 2002), sachant que *Clostridium botulinum*, sous forme de spores, peut survivre pendant plusieurs années dans le milieu extérieur et que le compostage ou l'enfouissement peuvent créer des conditions d'anaérobiose associées à de basses températures, potentiellement favorables à *C. botulinum*, la seule solution économiquement acceptable pour détruire un fumier riche en éléments botuliques reste l'incinération, sous contrôle des pompiers. En pratique, la méthode la plus utilisée sur le terrain pour l'incinération du fumier est le mélange avec de la chaux (Balloy et al, 2009), dans une zone éloignée des bâtiments d'élevage, des pâtures destinées aux bovins et de tout voisinage, et en prenant toutes les précautions par rapport au risque d'incendie et à la protection des personnes. Mais, cette méthode reste délicate à mettre en œuvre (problème lié au voisinage et à la dangerosité) et il n'existe pas de méthode appropriée et facilement réalisable sur le terrain.

2.2. La contamination du fumier par *C. botulinum*

C. botulinum a été détecté dans les 6 tas de fumier lors d'au moins une des 2 visites (Tableau 2). Le nombre de prélèvements positifs était plus élevé lors de la seconde visite que lors de la première visite : 42,2% de prélèvements positifs en visite 1 et 68% en visite 2.

Quelle que soit la modalité de gestion du fumier, avec ou sans mélange de chaux, des spores de *C. botulinum* ont été détectées. Il n'a pas été observé de différence selon les modalités de gestion du fumier, même si pour le fumier du cas 44 traité à la chaux, une diminution du nombre de positifs entre la première et la seconde visite a été notée pour les prélèvements réalisés en profondeur. L'ajout de chaux vive dans un fumier humidifié, en quantité suffisante, (5 à 7% selon Balloy et al. 2009) permet une incinération complète du fumier au bout de plusieurs semaines. Dans notre étude, une incinération quasi complète a été observée pour 2 tas de fumiers ayant été mélangés avec de la chaux. Les prélèvements ont été réalisés à partir du fumier restant non incinéré, en périphérie du tas, ce qui pourrait expliquer les résultats positifs obtenus.

Pour les 2 autres tas de fumiers pour lesquels la chaux avait été mélangée au fumier sans conduire à une incinération, il est possible que la quantité de chaux utilisée ait été insuffisante ou que le fumier n'ait pas été assez humidifié. Ces résultats montrent que du fumier résiduel reste contaminé après une incinération à la chaux. Il est donc nécessaire que tout le tas soit incinéré en suivant un protocole rigoureux et en prenant toutes les précautions par rapport au risque d'incendie et à la protection des personnes.

Quelle que soit la modalité de gestion du fumier, le nombre de prélèvements positifs était plus important au bout de 1 à 2 mois de stockage du fumier que lors des prélèvements initiaux. Deux hypothèses pourraient expliquer l'augmentation du nombre de prélèvements positifs au cours du temps : soit il y a un développement de *C. botulinum* dans le fumier, milieu potentiellement favorable à la bactérie (conditions anaérobies et présence de matière organique), soit il y a un abattement au niveau de la flore annexe inhibitrice de *C. botulinum*, permettant une meilleure détection du pathogène (Shehata et al. 2012). Dans tous les cas, cette méthode montre une persistance de la bactérie au cours du temps. Ces résultats montrent l'importance d'incinérer en totalité le fumier suite à un épisode de botulisme aviaire, puisque la contamination du fumier par *C. botulinum* persiste si celui-ci est simplement stocké ou incomplètement incinéré.

Parmi les prélèvements réalisés en surface, 60,7% sont positifs vs 46,9% pour ceux réalisés en profondeur. La température moyenne du fumier pour les prélèvements réalisés en surface était de 20,1°C (écart type 14,6) et de 36,7°C (écart type 16,6) pour ceux en profondeur. Il a été observé un lien statistique (test Wilcoxon $p < 0.01$) entre la détection de *C. botulinum* dans le fumier et la température du fumier, avec une température moyenne du fumier pour les prélèvements positifs de 20,2°C (écart type 16,5°C) vs 38,2°C (écart type 13,4°C) pour les prélèvements négatifs. Ces résultats montrent que *C. botulinum* a été détecté plus souvent en surface et à une température moyenne de 20,2°C. La température optimale de croissance de *C. botulinum* est comprise entre 30°C et 42°C selon les types toxiques. La température moyenne mesurée en profondeur est comprise dans cet intervalle et pourrait permettre la stimulation de la germination des spores puis les conditions environnementales présentes (pH, flore annexe...) pourraient induire l'inactivation des cellules végétatives. Ce phénomène a déjà été rapporté pour *Clostridium difficile* dont l'inactivation indirecte à 55°C dans des boues d'épuration a été montrée via la germination des spores puis l'inactivation des cellules végétatives (Xu et al. 2016). Néanmoins, l'identification des facteurs expliquant ces résultats nécessitent des investigations complémentaires.

CONCLUSION

Cette étude préliminaire montre que les fumiers provenant de lots de volailles ayant connu un épisode de botulisme sont contaminés par *C. botulinum* et que cette contamination persiste dans le temps quelle que soit la méthode de gestion utilisée. L'incinération à la chaux permet de consommer le fumier et de détruire les spores mais une incinération complète du fumier est nécessaire puisqu'une contamination persiste au niveau des résidus de cette incinération. Il est donc essentiel de ne pas épandre de fumier après stockage

et/ou incinération partielle, surtout à proximité de pâtures de bovins, d'autres élevages ou de voies de circulation, afin d'éviter toute contamination croisée.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier l'ensemble des éleveurs, des vétérinaires et des organisations de production pour leur participation à l'étude. Cette étude est financée par le conseil général des Côtes d'Armor et la Direction Générale de l'Alimentation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFSSA, 2002. Rapport sur le botulisme d'origine aviaire et bovine.
- Appleyard, W.T., Mollison, A., 1985. Suspected bovine botulism associated with broiler litter waste. *Vet Rec* 116, 522.
- Balloy, D., Facon, C., Chatenet, X., Durand, J. 2009. Botulisme aviaire, les constats de terrain. Huitièmes journées de la recherche avicole, Saint Malo, 25 et 26 mars, 340-344.
- Clegg, F.G., Jones, T.O., Smart, J.L., McMurty, M.J., 1985. Bovine botulism associated with broiler litter waste. *Vet Rec* 117, 22.
- Okamoto, K., Sato, K., Adachi, M., Chuma, T., 1999. Epidemiological factors in chicken botulism. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association* 52, 168-173.
- Payne, J.H., Hogg, R.A., Otter, A., Roest, H.I.J., Livesey, C.T., 2011. Emergence of suspected type D botulism in ruminants in England and Wales (2001 to 2009), associated with exposure to broiler litter. *Veterinary Record* 168, 640.
- Popoff, M., 1989. Revue sur l'épidémiologie du botulisme bovin en France et analyse de sa relation avec les élevages de volailles. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 8, 129-145.
- Shehata, A., Schrod, W., Neuhaus, J., Kruger, M., 2013. Antagonistic effect of different bacteria on *Clostridium botulinum* types A, B, D and E in vitro. *Vet Rec* 172, 47.
- Skarin, H., Tevell Åberg, A., Woudstra, C., Hansen, T., Löfström, C., Koene, M., Bano, L., Hedeland, M., Anniballi, F., De Medici, D., Olsson Engvall, E., 2013. The workshop on animal botulism in Europe. *Biosecurity and Bioterrorism* 11, S183-S190.
- Souillard, R., Woudstra, C., Le Marechal, C., Dia, M., Bayon-Auboyer, M.H., Chemaly, M., Fach, P., Le Bouquin, S., 2014. Investigation of *Clostridium botulinum* in commercial poultry farms in France between 2011 and 2013. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A* 43, 458-464.
- Woudstra, C., Skarin, H., Anniballi, F., Fenicia, L., Bano, L., Drigo, I., Koene, M., Bayon-Auboyer, M.H., Buffereau, J.P., De Medici, D., Fach, P., 2012. Neurotoxin gene profiling of *Clostridium botulinum* types C and D native to different countries within Europe. *Appl Environ Microbiol* 78, 3120-3127.
- Xu, C., Salsali, H., Weese, S., Warriner, K., 2016. Inactivation of *Clostridium difficile* in sewage sludge by anaerobic thermophilic digestion. *Canadian journal of microbiology* 62, 16-23.

Tableau 1. Description des 5 épisodes de botulisme

N°	Espèce	Effectif	Bâtiment	Age	Mortalité	Gestion du fumier
22	Poules pondeuses plein air	20 000	2150m ²	62 semaines	5000 mortes sur 8 semaines (25%)	Chaux dans le bâtiment (1T) Chaux à la mise en tas à l'extérieur (1T) Tas bâché Tas non incinéré aux 2 visites
4	Poulets certifiés	23 756	1200 m ²	40j	1300 morts sur 5j (5,5%)	Chaux dans le bâtiment (2.8T) Tas bâché Tas non incinéré aux 2 visites
44	Dindes	3900 mâles et 3600 femelles	1000 m ²	mâle à 87j après départ des femelles	80 morts sur 7j (2%)	Chaux à la mise en tas à l'extérieur (6.6T) Tas non bâché Incinération en cours à V1 et presque entièrement incinéré en V2
46F		3264 femelles		64j	400 mortes sur 16j (12%)	Chaux à la mise en tas à l'extérieur (1T) Tas non bâché Tas presque intégralement incinéré en V1 *, plus de fumier en V2
46M	Dindes	3876 males	980 m ²	50j	450 morts sur 24j (11.6%)	Tas mis à côté du tas de fumier femelle Tas non bâché Tas normal en V1 et a été presque entièrement épandu en V2 *
B9	poulet lourd	11 852 males et 12628 femelles	1200 m ²	mâle à 42j après départ des femelles	1050 males sur 3 j (8.8%)	Tas bâché Tas normal bâché aux 2 visites

**prélèvements uniquement en surface, pas assez de fumier pour prélever en profondeur*

Tableau 2. Résultats de la détection de *C. botulinum* dans les prélèvements de fumier (nombre de prélèvements positifs/nombre de prélèvements analysés)

N°	Visite 1			Visite 2		
	Profondeur	Surface	Total V1	Profondeur	Surface	Total V2
22	0/9	2/6	2/15	9/9	5/6	14/15
4	3/9	2/6	5/15	8/9	5/6	13/15
44	4/9	0/6	4/15	2/9	1/6	3/15
46F	NR	12/15	12/15	NR	NR	NR
46M	9/9	6/6	15/15	NR	15/15	15/15
B9	0/9	0/6	0/15	3/9	3/6	6/15
Total	16/45	22/45	38/90	22/36	29/39	51/75

ETUDE MICROBIOLOGIQUE DES BIOAEROSOLS DANS LES BATIMENTS D'ELEVAGE : COMPARAISON DE DIFFERENTES ESPECES ET MODES DE PRODUCTION AVICOLES

Delpont Mattias¹, Durand Thibaud¹, Croville Guillaume¹ et Guérin Jean-Luc¹

¹ENVT, UNIVERSITE DE TOULOUSE, INRA, UMR1225 - 23 Chemin des Capelles - 31076
TOULOUSE,
mdelpont@envt.fr

RÉSUMÉ

La qualité de l'air dans les bâtiments d'élevage de volaille dépend grandement de la température de l'air, de sa vitesse, de l'humidité relative et du taux d'ammoniac. D'autres paramètres influent aussi sur la qualité de l'air comme les poussières (charge et taille des particules) et la présence de microorganismes (virus, bactéries, champignons, archées) morts ou vivants, ainsi que leurs produits ou fragments (endotoxines). Les connaissances sur les charges et les profils microbiologiques des bioaérosols en élevage de volailles sont encore insuffisantes. A l'aide d'un collecteur de bioaérosols « cyclone », nous avons échantillonné plusieurs types d'élevages : poulets de chair standard (n=5), label (n=5), dinde standard (n=5), pintades standard (n=2) et label (n=2). Ont été collectés en deux points de chaque bâtiment les bioaérosols contenus dans un volume total de 5 m³ d'air. Les charges bactériennes et fongiques ont été évaluées par culture sur milieux gélosés. Les facteurs influençant les charges bactériennes ont aussi été étudiés. En culture, les moyennes des charges bactériennes s'étendent de 6,6x10⁴ UFC/m³ (pintade label) à 1,3x10⁷ UFC/m³ (pintade standard), et de 6,4x10¹ (dinde) à 3,3x10⁴ UFC/m³ (pintade standard) pour la charge fongique. Cette étude fournit un premier aperçu de la qualité microbienne de l'air dans les bâtiments de volaille, ce qui a des implications directes pour la santé respiratoire des volailles et des professionnels de la filière.

ABSTRACT

Microbiological study of bioaerosols in poultry farms: a comparison of different poultry species and production systems

Air quality in poultry houses is related to air temperature, air speed, relative humidity and ammonia concentration. Other parameters can also be associated with air quality: dust (quantity and relative size of particles), live or dead microorganisms (viruses, bacteria, fungi, archaea bacteria) and their by-products or parts (endotoxins). Knowledge on loads of microorganisms and microbiological profiles in bioaerosols from poultry houses is still lacking.

Using a "cyclone" air sampler, different types of farms were sampled: broilers (n = 5), free-range chicken (n = 5), turkeys (n = 5), indoor (n = 2) and conventional (n = 2) Guinea fowls. The bioaerosols contained in 5 m³ were collected in two different spots in each house.

Bacterial and fungal loads were assessed using classical culture-based techniques on agar plates. Some data related to farm management was also collected.

Cultures revealed bacterial loads ranging from 6.6x10⁴ FCU/m³ (free-range guinea fowl) to 1.3x10⁷ FCU/m³ (conventional guinea fowl), and fungal loads from 6,4x10¹ (turkey) to 3,3x10⁴ FCU/m³ (confinement guinea fowl). This study gives us an overlook on microbial quality of air in poultry houses. This data might help us understand the relative importance of air quality when dealing with respiratory issues for both animals and workers in the poultry industry.

INTRODUCTION

Dans les bâtiments de volaille, la qualité de l'air est aujourd'hui de plus en plus étudiée lorsqu'il est question de pathologie respiratoire. En effet, différents paramètres peuvent avoir un effet dans les mécanismes de l'infection du système respiratoire. L'ammoniac fragilise l'escalator mucociliaire, entraînant une accumulation de mucus dans les voies aériennes. Les températures basses mais surtout, les écarts de températures contribuent à dégrader l'état général des animaux, entraînant ainsi une diminution de leur résistance aux infections. Les particules contenues dans l'air (leur taille, leur nombre) et surtout la présence ou non de microorganismes (virus, bactéries, champignons, archées) vivants, morts ou de leurs débris et sous-produits (endotoxines), peuvent avoir un impact non négligeable sur l'apparition de problèmes de santé, notamment respiratoires (Oyetunde et al., 1978, Lai et al., 2009). Les volailles et les personnels travaillant dans les bâtiments sont également concernés.

Les modes de prélèvement de bioaérosols (par filtration, par impaction) et leur valorisation (avec ou sans culture des microorganismes) sont multiples, ce qui rend difficile la comparaison des résultats issus de différentes études. En revanche, certaines études s'attachent à comparer différentes méthodes dans un même environnement (Throne et al., 1992, Chi et al., 2006) ou différents modes de production ou périodes d'élevage avec les mêmes outils (Vucemilo et al., 2007, Shu-Ann Li et al., 2006).

La récolte en phase liquide permet de préserver la viabilité des bactéries, ce qui permet de les quantifier par culture (Chi et al., 2006). La culture sur gélose agar est simple et peu coûteuse à mettre en œuvre. Pour mettre en évidence des microorganismes morts ou difficiles à cultiver, la méthode de réaction de polymérase en chaîne (PCR) a l'avantage d'être sensible, spécifique et accessible pour de nombreux laboratoires.

En France, l'élevage de volailles est très diversifié, à la fois en termes d'espèces (avec une part importante d'espèces dites mineures comme le canard ou la pintade) mais aussi de cahiers des charges pour chaque espèce (élevage sous signe de qualité, standard, certifié, etc.).

Cette étude compare - pour un même mode de prélèvement et par comptage après culture - les bioaérosols dans différents types d'élevage rencontrés en France : poulet standard, poulet « Label »/« Bio », pintade standard ou « label » et dinde standard.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Choix des élevages et données d'élevage

Les prélèvements ont été conduits en régions Pays-de-la-Loire et Occitanie dans des exploitations de poulets standards (n=5), de poulets sous signe de qualité « Label » et « Bio » (n=5), de dindes (n=5), de pintades « Label » (n=2) et standard (n=2).

Les animaux étaient en période de croissance et de finition, provenaient de lots n'ayant pas subi d'épisodes pathologiques respiratoires.

Par ailleurs, ont été enregistrés l'âge, le taux de mortalité, la densité de chargement en kg/m², le type de ventilation, le type de litière, l'aspect de la litière (notation de 0 à 4 avec 0 = litière très sèche et 4 = litière très humide), l'humidité et la température (Sonde KIMO®).

1.2. Méthodes de prélèvements et de culture

Les bioaérosols contenus dans 5 m³ d'air ont été collectés en deux points du bâtiment, avec une prise d'essai par point (10 minutes à 250 L/min pour chaque prise), à une hauteur de 40 cm du sol, dans la zone de vie des animaux.

Un collecteur de bioaérosols de type « cyclone » (Coriolis®, Bertin tech, Fr) a été utilisé. Les matières ont été collectées dans une solution de 15 mL de tampon phosphate salin (PBS) additionné de 0,01% de Tween 20.

La mise en culture a été effectuée sur des géloses de trypticase de soja (TSA) pour la flore totale et de milieu de Sabouraud avec chloramphénicol et gentamicine (SGC2) pour le dénombrement d'espèces fongiques, avec incubation pendant respectivement 24 et 48h à 37°C.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de dénombrement bactériens et d'espèces fongiques par type et mode de production sont présentés dans le tableau 1.

2.1. Poulet de chair et poulet élevé en plein-air

Nous n'avons pas montré de différences entre les poulets élevés en plein-air et les poulets standard par comptages bactérien (respectivement 4,3 et 2,5x10⁶ UFC/m³ en moyenne) et fongiques (respectivement 1,8 et 1,4x10³ UFC/m³ en moyenne).

Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature mettant en œuvre les mêmes techniques de prélèvement : en effet, chez les poulets élevés confinés et en plein-air, par comptages bactériens on enregistre 2,33x10⁶ (Chi et al., 2006), 4x10⁶ (Seedorf et al., 1998), et 1,12x10⁵ à 6,38x10⁶ UFC/m³ même si dans cette dernière étude les prélèvements sont faits à la sortie des extracteurs d'air (Agranovski et al.,

2007); et chez les poulets élevés en plein-air on trouve $5,79 \times 10^6$ UFC/m³ (Chi et al., 2006). Les comptages fongiques référencés sont de $7,7 \times 10^3$ (Chi et al., 2006), 10^4 (Seedorf et al., 1998) et $4,40 \times 10^3$ à $6,20 \times 10^5$ UFC/m³ (Agranovski et al., 2007). Dans ces deux dernières études on obtient des valeurs qui peuvent être plus élevées.

2.2. Pintades et dindes

Une différence nette est observée quand on compare les pintades élevées en plein-air et les pintades en claustration. La charge bactérienne est plus forte en claustration (moyenne de $1,3 \times 10^7$ contre $6,6 \times 10^4$ UFC/m³) à l'instar de ce que qui est observé pour la charge fongique ($3,3 \times 10^4$ contre $6,6 \times 10^2$ UFC/m³). Les conditions de ventilation (impact de l'ouverture des trappes sur les flux d'air) et le temps de présence des animaux diminué sur la litière du bâtiment peuvent expliquer la charge plus faible en élevage de plein-air. Cette tendance chez les pintades mériterait d'être confirmée sur un nombre d'élevages plus important. En revanche cet effet n'a pas été observé chez le poulet.

En dinde, les charges bactériennes sont équivalentes aux autres espèces (de l'ordre de 10^6 UFC/m³ en moyenne), à la différence de la charge fongique qui semble très faible par rapport aux autres espèces ($6,6 \times 10^1$ UFC/m³).

On peut émettre l'hypothèse que c'est la présence de copeaux dans la litière des dindes qui a un effet sur la faible quantité d'espèces fongiques. Dans cette étude aucune des autres espèces étudiées n'utilisait de copeaux. Une étude sur des vaches laitières a pu mettre en évidence des espèces fongiques en plus grandes quantités dans des litières en paille que dans des litières en copeaux (Kotimaa et al., 1991)

2.3. Autres paramètres

Nous n'avons pas trouvé de relation, pour chaque type d'élevage, entre les charges bactériennes ou fongiques et les autres paramètres étudiés : densité d'élevage (en Kg/m²), température, humidité et taux de mortalité

cumulée. Dans une étude Suisse (Oppliger et al., 2008), les concentrations en bactéries augmentaient avec l'âge des animaux (et donc avec le chargement du bâtiment en poids au m²). En revanche, une étude croate a montré qu'en toute fin du cycle de production, les quantités fongiques et bactériennes avaient tendance à diminuer, ce qu'ils expliquaient par une diminution de l'activité des animaux et par une augmentation de l'humidité de la litière qui diminuerait l'aérosolisation de particules (Vucemilo et al., 2007).

CONCLUSION

Les résultats sont cohérents avec les connaissances actuelles en poulet (volaille la plus étudiée pour ce type d'études). En pintade label, l'ouverture sur des parcours extérieurs semble réduire les charges en microorganismes, et chez la dinde, les charges fongiques semblent relativement plus faibles que dans les bâtiments hébergeant d'autres espèces. Enfin un environnement plus sec pourrait favoriser une augmentation des quantités de bactéries et d'espèces fongiques.

Le choix de récolter les bioaérosols sur un liquide tampon nous permettra de compléter ces résultats avec des méthodes de comptage sans culture des microorganismes (réactions de polymérase en chaîne). Il est aussi envisageable de quantifier les endotoxines présentes dans l'air, ainsi que les archées, dont on pense qu'elles pourraient avoir un effet pro-inflammatoire sur les muqueuses respiratoires (décrit chez les petits mammifères) (Blais Lecours et al., 2011).

Cette étude pourra aussi être complétée par des prélèvements suivant le même protocole dans d'autres types d'élevage (canard à rôti, poule pondeuse, etc.).

A plus long terme, les références ainsi construites pourront être utilisées pour investiguer les conditions d'apparition de signes cliniques de maladies respiratoires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agranovski et al., 2007. The European Aerosol Conference 2007
 Blais Lecours et al. PLoS ONE 6(8), e23326
 Chi et al., 2006. Aerosol and Science Technology. (40), 1071-1079.
 Kotimaa et al., 1991. Scand J Work Environ Health. (17), 117-122.
 Lai et al., 2009. Poultry Science (88), 1838-1849.
 Oppliger et al., 2008. Ann. Occup. Hyg. (5), 405-412.
 Oyetunde et al., 1978. Can? Vet. J. (19), 187-193
 Seedorf et al., 1998. J. agric. Engng Res. (70), 97-109
 Shu-Ann Li et al., 2006. Journal of Occupational and Environmental Hygiene, 3, 118-130.
 Throne et al., 1992. Appl Environn microbiol (58)8, 2543.
 Vucemilo et al., 2007. Czech J. Anim. Sci. (52), 170-174

Tableau 1. Charges bactériennes et fongiques dans les différents types d'élevage.

	filère				
	dinde	poulet standard	poulet label	pintade standard	pintade plein-air
Effectif (nombre d'élevages)	5	5	5	2	2
Charge bactérienne (UFC/m³)					
Moyenne	2,2E+06	2,5E+06	4,3E+06	1,3E+07	6,6E+04
Valeur minimale	6,1E+04	8,9E+05	7,4E+05	9,1E+06	1,0E+01
Valeur maximale	4,0E+06	6,4E+06	1,0E+07	1,8E+07	1,3E+05
Charge fongique (UFC/m³)					
Moyenne	6,5E+01	1,4E+03	1,8E+03	3,3E+04	6,6E+02
Valeur minimale	1,0E+00	1,8E+00	5,2E+00	2,6E+04	9,1E+00
Valeur maximale	1,4E+02	3,5E+03	5,0E+03	3,9E+04	1,3E+03

Dans chaque élevage les prélèvements ont été réalisés en duplicat par collecteur de type « cyclone ». La mise en culture a été effectuée sur des géloses de trypticase de soja pendant 24h à 37°C (charge bactérienne) et sur des géloses de milieu de Sabouraud avec chloramphénicol et gentamicine pendant 48h à 37°C (charge fongique). Par comptage, nous avons mesuré les valeurs des charges bactériennes et fongiques de chaque élevage. Elles ont permis de calculer la moyenne des duplicats puis de déterminer les valeurs minimales, maximales et les moyennes par type d'élevage.

CARACTERISATION DU BIOFILM DANS LES CANALISATIONS D'ELEVAGE DE VOLAILLE, ET EVALUATION DE L'EFFET DE PURGES SUR LA MAITRISE DU BIOFILM ET DE LA QUALITE DE L'EAU

Dennerly Gaëlle^{1,2}, Laravoire Anaëlle¹, Chiron Geoffrey², Warin Laura² et Travel Angélique²

¹*CHAMBRE REGIONALE D'AGRICULTURE DES PAYS DE LA LOIRE - 9 rue André Brouard – CS 70510 - 49105 Angers Cedex 2,*

²*ITAVI - 7, rue du Faubourg Poissonnière- 75009 PARIS*

gaelle.dennerly@pl.chambagri.fr

RÉSUMÉ

L'eau de boisson est le premier aliment des volailles. La qualité de l'eau peut être dégradée dans les canalisations par la présence de biofilm, dont le développement est favorisé par certaines pratiques d'élevage. La maîtrise du biofilm dans les circuits d'eau de boisson constitue un enjeu majeur dans la prévention de pathologies, la réduction de l'usage des antibiotiques et de l'antibiorésistance. L'objectif de cette étude terrain est d'évaluer l'impact de la mise en œuvre de purges au cours du lot, sur l'apparition et le développement de biofilm, sur la qualité bactériologique de l'eau, la quantité d'eau utilisée et les performances/santé des volailles. Cette démarche a nécessité la mise au point préalable d'une méthodologie d'observation et de caractérisation du biofilm présent dans les canalisations. Des scores allant de 1 à 3 sont attribués grâce à une grille photographique, permettant de caractériser l'état des canalisations à un instant *t*, mais également d'observer l'évolution du biofilm au cours du lot, en fonction des pratiques mises en œuvre. Afin d'évaluer l'effet de diverses fréquences de purges, 7 lots de poulets ont été suivis dans 3 fermes, et 5 bâtiments. Les premiers résultats montrent l'importance de la qualité du nettoyage et désinfection du circuit d'eau au vide sanitaire dans la maîtrise préalable du biofilm. La réalisation de purges quotidiennes et à fréquence élevée aurait tendance à retarder le développement de biofilm sur les parois des canalisations et améliore la qualité bactériologique de l'eau distribuée en bout de ligne en comparaison de circuits qui ne sont jamais purgés..

ABSTRACT

Assessment of biofilm in pipes of breeders houses, and effect of purge on biofilm mastering and water quality

Drinking water is the first feed of poultry. Biofilm can altered water quality in pipes. Its development is favored by breeding practical and conditions. Biofilm management in drinking water pipes is a major issue to prevent pathologies and to reduce antibiotic consumption and resistance. The aim of this field study is to assess the effect of purging pipes during breeding on biofilm development, water quality, amount of water used, and breeder's health. This needed to create a methodology to characterize biofilm. A scoring method was developed, each score being definite by a picture and objective definition. The charter created was used to characterize biofilm at each observation, and also in order to estimate its evolution during the breeding. 7 flocks were followed in 3 farms, within 5 houses. First results show the pipes cleaning importance before starting the flock breeding. Daily and highly frequency purges seem to delay biofilm development inside pipes when compared to never purged pipes.

1. INTRODUCTION

L'eau est le premier intrant en élevage et le premier aliment des volailles. En effet un poulet de chair boit 1,8 fois plus d'eau qu'il ne consomme d'aliment (Dennery et al., 2012). La qualité physico-chimique de l'eau (Barton, 1996) comme la qualité bactériologique (Venne, 2009) peut impacter directement la santé, le bien-être et les performances de croissance des volailles d'élevage. Cette qualité est évaluée par un ensemble d'indicateurs (ITAVI, 2007) facilement quantifiable par analyse et dont les références préconisées se basent sur la réglementation de la potabilité de l'eau pour la consommation de l'Homme (Ministère de la santé et des solidarités, 2007).

Le démarrage des volailles est une phase critique car les animaux sont jeunes, leur système immunitaire est peu développé, et leur flore intestinale se constitue en fonction de l'environnement de vie des animaux (Guérin et al., 2011). Au cours de cette période, la température du bâtiment avoisine les 32°C (Aviagen Turkeys), ce qui réchauffe l'eau dans les canalisations, favorisant ainsi la prolifération bactérienne et le développement du biofilm. Le débit d'eau est encore faible (les animaux jeunes boivent de très petites quantités d'eau, Dennery et al., 2012), augmentant de fait les effets de la température précédemment cités.

Les moyens de maîtrise de la qualité bactériologique de l'eau sont nombreux mais utilisent généralement des intrants chimiques (produits de désinfection et/ou de nettoyage : chlore, peroxyde, acides...), voire de l'équipement relativement coûteux et/ou contraignant à utiliser (purges, flushing air/eau, hérissons...) (ITAVI, 2010). La présence de biofilm est raisonnablement associée à une dégradation de la qualité bactériologique de l'eau par les experts, mais cela n'a jamais été vérifié. L'étape préliminaire de cette étude propose ainsi d'utiliser la présence de biofilm comme un indicateur de la qualité de l'eau en mettant au point une grille d'évaluation et de caractérisation du développement du biofilm par observation à l'intérieur des canalisations à l'aide d'une caméra endoscopique.

La purge régulière à haute pression des canalisations d'abreuvement semble être un levier d'action prometteur dans la maîtrise du biofilm en cours d'élevage mais elle est encore très peu étudiée en aviculture alors qu'elle est *a priori* simple à mettre en œuvre et sans usage d'intrants (produits de traitements notamment). Cependant les bénéfices de cette technique et les modalités de mise en œuvre pour une efficacité optimale n'ont jamais été caractérisés en élevage. L'objet de cette étude est donc de générer des premières données pour évaluer l'intérêt de la purge haute pression dans la maîtrise du biofilm et de la qualité d'eau, pour à termes proposer des

préconisations techniques (fréquence X durée) permettant d'obtenir le meilleurs compromis entre l'efficacité de la purge, le coût de l'eau et le temps de travail.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Elaboration de la grille de caractérisation du biofilm

L'objectif était d'obtenir une grille avec peu de catégories discriminantes pour faciliter son utilisation par tous. Seuls des systèmes d'abreuvements de type « pipettes » ont été inclus dans l'étude pour limiter les variations.

2.2. Evaluation de l'effet des purges et de leur fréquence sur le développement du biofilm et la qualité de l'eau

Au total, 7 lots ont été suivis, dans 5 bâtiments différents appartenant à 3 exploitations. Des suivis complémentaires se poursuivent actuellement pour compléter ces essais préliminaires. Les modalités de mise en œuvre du nettoyage et désinfection des canalisations au vide sanitaire ont été recueillies, mais non imposés aux éleveurs. Les pratiques de fréquences de purges ont par contre été des critères d'inclusion des élevages dans l'étude. Les visites ont eu lieu dans la mesure du possible à J0, J4, J7, J10, J14, J20, J28, pour caractériser le biofilm en bout de ligne (scores), la qualité bactériologiques et physico-chimique de l'eau, et la santé digestive des volaille (par le marqueur « taux de fientes humides »). Les éléments recueillis en fin de lot sont la consommation quotidienne d'eau et d'aliment, la fiche d'élevage, et la fiche de résultat de lot.

2.3. Les méthodes d'enregistrement des indicateurs

Les observations ont toutes été réalisées dans les 2h suivant la purge dans les bâtiments concernés. L'eau était d'abord prélevée pour analyse avant réalisation des observations à l'endoscope. Enfin les fientes étaient observées.

Pourcentage de fientes humides avec l'Elancobox : Deux boîtes ont été disposées dans le bâtiment toute la durée du lot pour permettre aux animaux de s'y habituer. Le papier spécifique a été installé par l'éleveur entre 2 et 3 heures avant le passage de l'observateur pour le relevé. L'alvéole d'humidité a été observée pour 5 à 20 fientes individualisables par papier, à chaque passage de l'observateur. Le taux de fientes humides (%FH) est donc calculé pour les deux boîtes d'un même bâtiment à chaque passage de l'observateur (Bostvironnois C., 2003).

Observation et caractérisation du biofilm: une caméra endoscopique (DNT FINDOO Micro-caméra pour endoscope industriel avec microsonde 4,5mm) a été insérée en bout de ligne, des deux côtés d'une

même ligne d'abreuvement dans chaque bâtiment, soit en enlevant le dernier pointeau de pipette, soit en dévissant le bouchon de bout de ligne lorsque c'était possible. L'eau n'était pas coupée pour une observation à contre-courant. L'objectif de la caméra était enfoncé lentement le plus loin possible (env. 50 - 60 cm) en suivant le protocole établi lors de la création de la grille de caractérisation (cf 3.1.).

Prélèvement d'eau pour analyse : A J0, lors de la mise en place des animaux, des analyses physico-chimiques et bactériologiques ont été réalisées à l'entrée de l'exploitation (sortie forage ou réseau public), au niveau du sas d'entrée des bâtiments, ainsi qu'en bout de ligne. Puis à J7, J14, J28, seules des analyses bactériologiques d'eau ont été faites en bout de ligne. Les prélèvements ont été réalisés dans des flacons *ad hoc*, après avoir désinfecté l'embout de sortie et laissé couler l'eau 1 min. Une eau était considérée comme non satisfaisante (score 1) si au moins deux des critères bactériologiques dépassaient les préconisations habituelles. Le cas échéant le score 0 était attribué pour une analyse satisfaisante.

2.4. Les élevages

Les 5 bâtiments suivis, équipés de pipettes de deux marques différentes, appartenaient à 3 élevages équipés en partie de systèmes de purges automatiques, déclenchées automatiquement par le boîtier de régulation aux fréquences et horaires définis par les éleveurs. Ici, la purge consistait en un rinçage sous pression des canalisations qui restent en eau.

Elevage A (1 lot de poulets lourds suivi) : un bâtiment équipé d'un système de purge automatique mais qui est déclenché manuellement durant 45 sec. par ligne. La fréquence de purge appliquée varie au cours du lot : semaine 1 : 6 purges par jour, semaine 2 : 4 purges par jour, puis 2 par jour jusqu'à la fin du lot. Elevage B (4 lots de poulets standards suivis) : deux bâtiments. La purge dans le bâtiment test est réalisée une fois par jour automatiquement, 2 min par ligne durant 10 jours puis uniquement après administration de produits. Elevage C (2 lots de poulets exports suivi) : deux bâtiments. La fréquence de purge dans le bâtiment test est quotidienne à partir de J3 et d'une durée de 10 min par ligne. Dans les élevages B et C, le bâtiment témoin n'a aucune purge.

2.5. Les analyses réalisées

Cette étude préliminaire comportant trop peu de données, toutes issues d'élevages commerciaux donc avec de nombreux facteurs de variation, il n'est pas possible de réaliser des analyses statistiques. Néanmoins les relations des indicateurs de suivi ont été observées pour tenter de dégager des tendances. Les tendances qui seront ainsi identifiées devront néanmoins être confirmées par des suivis plus approfondis en cours de réalisation.

3. RESULTATS

3.1. Mise au point de la grille de caractérisation du biofilm

3 lots issus de 2 élevages (A et B) ont été suivis simultanément pour élaborer cette grille. 3 critères de description ont été retenus à partir de la diversité des situations rencontrées :

- le **degré de colonisation** du biofilm caractérisé par la surface à l'intérieur des canalisations recouverte par le biofilm et son épaisseur.
- le degré de colonisation du biofilm à l'**arrière des pointeaux de pipettes** par rapport au sens de circulation de l'eau (l'angle est une zone difficilement nettoyable car à l'abri de la pression lors des purges et rinçages).
- **présence de particules de biofilm en suspension** dans l'eau qui s'écoule.

Un protocole détaillé pour réaliser les observations correctement a donc pu être établi. : « Rentrer la fibre optique dans la canalisation en bout de ligne sans couper l'eau. Observer les éventuelles particules. Le plus loin possible (longueur du câble), observer l'angle à l'arrière du pointeau de pipette le plus proche. Retirer lentement la caméra en observant les parois et l'éventuelle trace laissée dans le biofilm par la caméra pour estimer son épaisseur ainsi que la répartition du biofilm. »

Pour chacun de ces 3 critères, des catégories (scores) ont été établies afin de caractériser le biofilm de manière objective. Elles correspondent à l'état neuf des canalisations (score 0 : niveau bas), et à un niveau d'encrassement le plus élevé observé (score 2 : niveau haut). Une situation intermédiaire a également été définie. La grille de caractérisation du biofilm (cf. figure 1) a été utilisée pour la suite des essais.

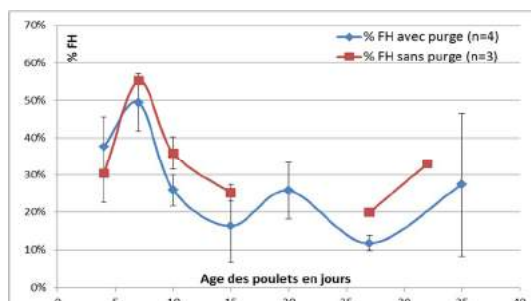
Figure 1 : Grille de caractérisation du biofilm dans les canalisations d'abreuvement type « pipettes »

	Score 0	Score 1	Score 2
Surface de canalisation couverte + épaisseur de biofilm	< 30% de la surface Faible épaisseur (<1mm) 	> 30% de la surface Faible épaisseur (<1mm) 	> 30% de la surface Épaisseur importante (> 1mm) 
Angle derrière la pipette occupé par le biofilm	< 10% de l'angle 	De 10 à 50% de l'angle 	> 50% de l'angle 
Particules de biofilm en Suspension	Pas de particules en suspension 	Petites particules : Taille < à l'écran de la caméra 	Grosses particules : Taille > à l'écran de la caméra 

3.2 Effet de la réalisation de purges sur l'évolution du taux de fientes humides

Le taux de fientes humides est représentatif de l'état de santé des animaux qui peut, entre autres, être impacté par la qualité de l'eau.

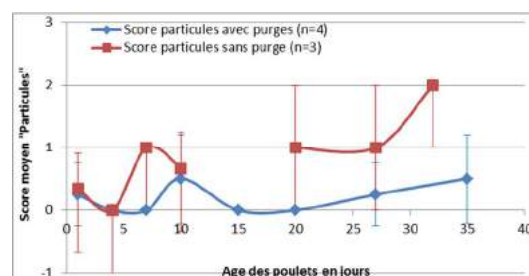
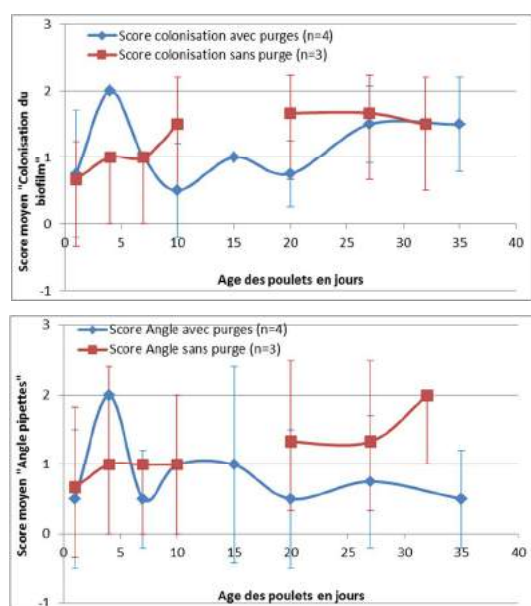
Figure 2 : Evolution moyenne du taux de fientes humides (% FH) avec ou sans purges



Les lots témoins (sans purge) ont un taux de fientes humides en moyenne plus élevé que les lots tests (avec purges). Cependant des problèmes sanitaires sont survenus sur 2 lots témoins sur 3 et 2 lots tests sur 4. L'observation du taux de mortalité est donc également importante. Le taux de mortalité moyen des lots témoins ($4,77\% \pm 5,7\%$) est en moyenne plus élevé que les lots tests ($1,81\% \pm 1,1\%$). Les écarts types ne permettent pas de conclure à une différence. La présence de problèmes pathologiques sur certains lots peut également impacter ces résultats. On ne peut donc pas conclure à une amélioration de la santé animale en lien avec la réalisation ou non de purges.

3.3. Effet de la réalisation de purges sur l'évolution du biofilm

Figure 3, 4 et 5 : Evolution de la moyenne des scores « Colonisation du biofilm », « Angle à l'arrière d'une pipette » et « Particules » avec ou sans purges.



Les scores de colonisation, d'angle et de particules des lots témoins sont systématiquement supérieurs aux lots essais, notamment à compter de 7 jours d'âge. Selon ces premiers résultats, la réalisation de purges régulières ne supprime pas complètement le biofilm, mais semble limiter son développement, notamment à l'issue de la période de démarrage.

Les enregistrements de la fiche d'élevage indiquent que les lots essais et témoins ont chacun reçu la même supplémentation prophylactique par l'eau de boisson au sein de chaque élevage. Cela ne peut donc pas jouer sur les différences observées. Néanmoins, les 2 lots témoins avec problème sanitaire ont été traités avec des antibiotiques lors du démarrage. Les antibiotiques pourraient avoir une action biocide sur le biofilm en le détruisant, et facilitant son décollement. Cela expliquerait pourquoi le niveau de colonisation du biofilm au démarrage semble proche entre les deux profils d'élevage.

Figure 6 : Evolution du score moyen de la qualité bactériologique de l'eau en bout de ligne



Les lots témoins ont globalement tendance à avoir une qualité d'eau plus détériorée que les lots essais, notamment lors de la phase du démarrage (0-10j). La présence plus importante de biofilm dans les lots témoins à partir de 10 jours pourrait donc s'expliquer par une eau de qualité non satisfaisante dès le démarrage. Ainsi il serait la conséquence de la présence de micro-organismes dans l'eau d'abreuvement dès le démarrage. Selon Venne, 2009, son développement est facilité par une température élevée et un débit faible, favorisant ainsi son adhésion à l'intérieur des canalisations.

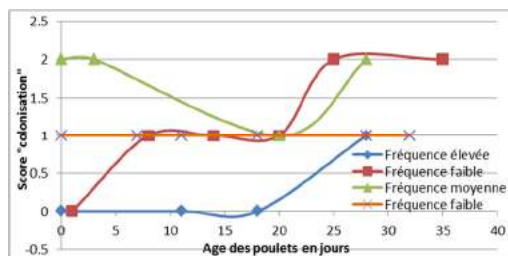
On remarque sur les figures 3, 4 et 5 que le biofilm est présent dès J0, à l'arrivée des poussins. Lors du diagnostic initial, il a été montré que les élevages A et B avaient une eau dure ($> 20^\circ\text{F}$ après traitement). L'élevage C avait une eau ferreuse ($> 0,25\text{mg/l}$ après déferriseur). Venne (2009) a montré que ces éléments jouent comme des éléments protecteurs du biofilm.

De plus, les éleveurs n'ont pas tous réalisé le même protocole de nettoyage et désinfection. L'élevage A a suivi un protocole de nettoyage et désinfection complet (base, rinçage haute pression, acide, rinçage haute pression, désinfectant jusqu'à l'arrivée des poussins, rinçage). Les scores de biofilm et de qualité d'eau sont tous à 0 dès J0, contrairement aux élevages B et C. Il semblerait donc que la qualité du nettoyage et désinfection au vide sanitaire joue un rôle primordial dans la présence de biofilm en cours de lot, et de la qualité d'eau dès le démarrage de l'eau. De plus il est raisonnable de penser que si le biofilm est déjà présent à J0, il se développera d'autant plus facilement en cours de lot. Néanmoins, aux vues des premières observations réalisées, on peut en déduire que si la purge n'élimine pas complètement un biofilm déjà présent, elle ralentit au moins son développement, comme on peut le voir sur les figures 3, 4 et 5.

3.4. Effet de la fréquence des purges sur le développement du biofilm et la qualité d'eau

Sur les 4 lots tests suivis, 3 fréquences différentes ont pu être testées.

Figure 7 : Evolution des scores de colonisation du biofilm selon la fréquence de purges.



Une fréquence élevée (A) semble permettre une meilleure maîtrise du biofilm en comparaison à une fréquence faible (B) ou une fréquence moyenne (C). On observe les mêmes conclusions avec les scores de qualité d'eau. L'éleveur A qui réalise un protocole de nettoyage et désinfection recommandé et une fréquence de purge élevée en cours de lot affiche très peu de biofilm et une qualité d'eau satisfaisante dès J0.

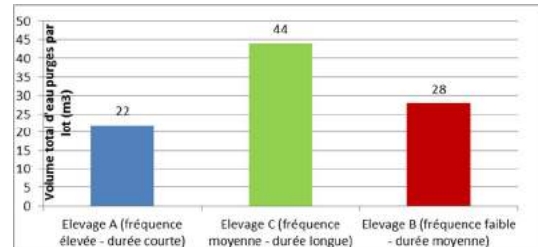
5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aviagen Turkeys, Guide d'élevage dinde de chair, BUT Nicholas, 24p
 Barton L.T., 1996, Poultry Science 75:854-856
 Bostvironnois C., 2003, Journées de la recherche Cunicoles
 Dennery G., Dezat E., Aubert C., 2012. L'eau en élevage avicole, une consommation maîtrisée.
 Guérin J.L., Balloy D., Villate D., 2011, Maladies des Volailles, Ed. France Agricole
 ITAVI, Chambre d'agriculture des Pays de la Loire, 2007, Eau de boisson en élevage avicole.
 ITAVI, Chambre d'agriculture des Pays de la Loire, 2010, Eau de boisson en élevage avicole
 MINISTÈRE DE LA SANTÉ ET DES SOLIDARITÉS, Arrêté du 11 janvier 2007, NOR : SANP0720201A.
 Venne D., 2009, Bull. Acad. Vét. France - Tome 162 - N°3

3.5. Volume d'eau utilisée

Les élevages suivis appliquant une durée de purge différente, les volumes d'eau purgés par lots sont donc différents (figure 8). Pour la comparaison, les volumes ont été ramenés à une durée d'élevage moyenne de 33 jours, pour un bâtiment de poulet standard de 1500m².

Figure 8 : Volume total d'eau utilisé par lot selon les pratiques de purges toutes choses égales par ailleurs.



Au lieu de la fréquence c'est surtout la durée qui va impacter les volumes d'eau utilisés, et donc le coût pour l'exploitant, alors que l'effet sur le biofilm des purges longues mais peu fréquentes ne semblent pas montrer d'intérêt dans ces premiers résultats.

4. CONCLUSION

La grille d'évaluation développée dans ce projet a été validée sur le terrain. Elle est désormais utilisable par tous. Dans 100% des cas, les élevages qui présentaient une qualité bactériologique de l'eau dégradée, présentaient également du biofilm dans les canalisations. La réalisation d'un bon nettoyage et désinfection au vide sanitaire semble être un pré-requis dans la maîtrise du biofilm. Aussi des purges courtes et régulières semble limiter le développement du biofilm et donc être une solution prometteuse pour réduire les intrants biocides ou médicamenteux sur les élevages, tout en restant un bon compromis économique.

D'autres essais, actuellement en cours, permettront d'évaluer si une fréquence de purges moindre associée à un bon protocole de nettoyage et désinfection pourrait être conseillée aux éleveurs. Merci aux éleveurs, à la région des Pays de la Loire et au plan EcoAntibio.

EFFET DE L'UTILISATION D'UN COMPLEXE BACTERIEN MULTISOUCHE SELECTIONNE EN ECLOSOIR SUR LA VIABILITE DES POUSSINS CHAIR (JUSQU'A ABATTAGE)

Pollet Benjamin¹, Hyronimus Bertrand²

¹ DIETAXION - 283 Rue Ampère, 44430 LE LOROUX BOTTEREAU, France

² Laboratoire COBIOTEX – 37 Avenue Albert Schweitzer, 33 405 TALENCE, FRANCE

b.pollet@dietaxion.com

RÉSUMÉ

Après des travaux internes antérieurs démontrant l'efficacité du COBIOTEX Biofilm à substituer le formol, l'objectif de ce travail complémentaire est de comparer l'efficacité de deux technologies alternatives en éclosier : un complexe bactérien multi-souches (Bacillus, Pediococcus...dont une bactérie *Bacillus Amyloliquefaciens* ISB06 est enregistrée comme Biocide Classe TP3) et un complexe d'huiles essentielles (HE).

Après nettoyage/désinfection, la salle « bactéries » reçoit une nébulisation des souches bactériennes dans les éclosiers et sur les œufs. Les éclosiers HE reçoivent quant à eux trois évaporations d'HE en cours d'éclosion. Le protocole prévoit 7 répétitions en éclosier puis le suivi de ces 2x20 lots en production.

L'étude s'intéresse à des paramètres bactériologiques (prélèvements muraux; analyse des foies vitellus illustrant la qualité des poussins de 1 jour) et à des critères zootechniques (mortalité à 10 et 57 jours (abattage), %saisie).

Partant d'un statut post désinfection identique dans les deux salles, le complexe bactérien permet une réduction significative des Entérobactéries et Coliformes fécaux (-2,6log, p<0,05) par rapport au traitement HE en fin d'éclosion. La moindre pression des pathogènes sur les poussins amène à une contamination foie vitellus inférieure en tendance avec le complexe bactérien. L'étude montre ensuite une réduction de la mortalité sur les 10 premiers jours d'élevage (-22%, p<0,05) maintenue jusqu'à abattage. Les saisies abattoir sont aussi réduites en tendance.

L'utilisation d'un noyau bactérien (dont un actif est « Biocide TP3 ») est plus efficace que le traitement huiles essentielles sur le contrôle des populations bactériennes pathogènes en éclosier. Cette nouvelle approche de prophylaxie constitue donc une alternative intéressante dans la stratégie sanitaire en couvoir chair et la stratégie qualité du poussin de un jour en élevage.

ABSTRACT

Impact of an alternative multi strain bacterial complex in hatchery on broiler viability

After previous internal works which demonstrated the efficiency of COBIOTEX Biofilm to substitute formalin, this complementary work compares the efficiency of two alternative technologies to formalin use in hatchery rooms: a nucleus including several selected strains (*Bacillus*, *Pediococcus*...containing a bacteria called ISB06 *Bacillus Amyloliquefaciens* registered as Biocide class TP3) and a complex of essential oils (EO).

After cleaning and disinfection, in the COBIOTEX room, to spray the bacterial complex in the hatchery room and on eggs. In control hatchery rooms, 3 fumigations of essential oils during hatching. The protocol follows 7 repetitions in hatchery rooms and then study of zoo technical performances of those 2x20 flocks in production.

Bacteriological parameters are followed (swabs taken from walls for monitoring the kinetics of bacterial populations between disinfection and end of hatching period; analysis of liver-yolk of chicks for studying the day 1 chick's quality). And also zoo technical criteria (mortality at 10 and 57 days (slaughter age), % culling).

Starting from the same post disinfection status in both hatchery rooms, the bacterial complex COBIOTEX allows to reduce significantly the presence of Enterobacteria and Fecal coliforms (-2,6log, p<0,05) in comparison with the EO treatment at the end of hatching period. The chick's lower pathogenic pressure leads to a lower liver-yolk contamination in tendency with the COBIOTEX. This work shows then a significant reduction of mortality on the first 10 days of production (-22%, p<0,05); difference maintained until slaughter age.

The use of a selected bacterial nucleus (One of the bacteria is "Biocide TP3" is more efficient than the treatment with essential oils (EO) on the control of pathogenic flora in hatcheries. This new prophylaxis approach represents an efficient alternative in the sanitary strategy in broiler hatcheries and in the day 1 chick's quality strategy in production.

INTRODUCTION

Depuis 2006, l'usage du formol en couvoir est largement remis en cause au niveau européen : des arrêtés le classant comme « produit chimique Cancérogène et/ou Mutagène et/ou toxique pour la Reproduction » (Schwoerer et al., 2008). Cela induit une recherche d'alternatives, notamment au niveau des structures d'accoupage. Alternatives qui doivent néanmoins aussi permettre de respecter les nouvelles normes européennes du bien-être animal (seuil de mortalité).

L'objectif de ce travail est de comparer l'efficacité de deux technologies alternatives au formol en éclosier : un complexe bactérien multi-souches (Bacillus, Pediococcus...) COBIOTEX Biofilm (dont une bactérie Bacillus Amyloliquefaciens ISB06 est enregistrée comme Biocide Classe TP3) et un complexe d'huiles essentielles (HE).

1. MATERIELS ET METHODES

Le schéma expérimental prévoit pour chaque groupe (contrôle et traité) 7 répétitions en éclosier (2 éclosions/semaine pendant 4 semaines) puis le suivi de ces 2x20 lots en production.

Les poussins sont de souche Hubbard® JA (18/m²).

Les mêmes opérations de nettoyage/désinfection (fumigation orthophénylphénol) sont réalisées dans les deux salles suivies. Pour limiter l'impact d'un possible effet éclosier et/ou salle d'éclosion, une chiffonnette est réalisée post désinfection par éclosion et par salle pour s'assurer que les microbismes de départ sont bien similaires et permettent une comparaison ultérieure entre les 2 salles.

Après ces opérations, la salle « bactéries » (4 éclosiers de 20 000 OAC) reçoit, sur parois sèches, une nébulisation (par canon mousse inox FoamMatic) des souches bactériennes dans les éclosiers et sur les chariots avec les œufs (10g / 1000OAC – 5L/éclosier+chariots).

Les éclosiers HE (6 de 20 000 OAC) reçoivent quant à eux trois applications d'HE (dilué à 10%) : versement au sol de 250 mL de solution/application/éclosier (au transfert, puis le matin de la veille d'éclosion et enfin de nouveau le soir).

L'étude s'intéresse à des paramètres bactériologiques :

D'une part, pour chaque éclosion, une 2^e chiffonnette est réalisée en fin d'éclosion : l'objectif visé étant de caractériser la cinétique bactérienne en cours d'éclosion. Méthode standardisée de chiffonnage : une unique chiffonnette est à chaque fois frottée sur

un carré de 0.5 m² du mur de gauche sec dans chacun des 2 mêmes éclosiers.

D'autre part, 10 poussins de 1 jour sont prélevés (réalisé à l'éclosion n°4) en fin d'éclosion (stade identique juste avant envoi en vaccination) : dans 4 éclosiers « bactéries » et 4 éclosiers HE. Détection sur foie et vitellus de E. Coli, Staphylocoques, Entérocoques et Pseudomonas et sur poumons d'Aspergillus fumigatus. Les prélèvements positifs subissent une évaluation de gravité de lésion selon le barème suivant : Abondant (note 4) > Moyen (3) > Faible (2) > Négligeable (1).

Elle étudie enfin les performances zootechniques des lots d'élevage recevant ces poussins en conditions terrain : mortalité à 10 et 57 jours (abattage), %saisie, GMQ, IC).

L'égalité des variances a été vérifiée avec un F-TEST. Les variables mesurées au cours de l'étude ont ensuite été soumises à un Student test.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

1.1. Qualité sanitaire de l'environnement

La comparaison des résultats bactériologiques post désinfection à chacune des 7 éclosions montre que les deux salles suivies partent d'un statut sanitaire semblable (Tableau 1) : leurs statuts fin d'éclosion peuvent donc être comparés.

Il convient ici de noter une très bonne efficacité de la phase de lavage/détergence/désinfection dans les deux salles :

Flore totale < 10⁶ (objectif : < 10⁵) ;

Absence d'Entérobactéries et Coliformes fécaux (obj < 10⁴)

Partant d'un statut sanitaire similaire après lavage/désinfection, les deux salles présentent par contre un statut sanitaire différent en fin d'éclosion (Tableau 2) :

Les flores sporulées (dont Bacillus apportés par le complexe bactérien étudié) sont significativement mieux implantées dans les éclosiers traités avec le complexe bactérien : + 1,3 log (p<0,05).

Cette implantation efficace du complexe bactérien permet de réduire de manière significative les flores pathogènes en fin d'éclosion : -2,6 log d'Entérobactéries et de Coliformes fécaux (p<0,05) par rapport au traitement HE.

Les éclosiers traités avec le complexe bactérien présentent ainsi une pression pathogène nettement plus faible que les éclosiers traités avec les huiles essentielles.

1.2. Qualité sanitaire des poussins de 1 jour

A la date de prélèvement étudiée, les poussins issus des éclosiers traités avec le complexe bactérien présentent par rapport à ceux issus des éclosiers traités avec les HE (Tableau 3) :

Moitié moins de portage *E. Coli*: en fréquence et en niveau de gravité des lésions foie/vitellus),

3 fois moins de portage *Staphylocoques*: en fréquence et en niveau de gravité des lésions foie/vitellus),

Un portage moins grave en *Entérocoques* et *Pseudomonas*,

10 fois moins de portage en *Aspergillus fumigatus* sur poumons.

1.3. Evolution spécifique de la mortalité en élevage

L'étude montre ensuite (Tableau 4) une réduction de la mortalité à 10 jours (-22%, $p < 0,05$).

Le seuil d'alerte de 1.5% (fixé par l'entreprise) est atteint dans 27% des cas avec le traitement bactérien au lieu de 47% sur le lot HE.

L'amélioration de la viabilité observée à 10 jours sur les lots traités avec le complexe bactérien semble maintenue jusqu'à l'âge d'abattage (57 jours) : - 28 %, NS.

1.4. Performances zootechniques en élevage

En comparant les lots en iso-souches (Tableau 4), les lots traités avec le complexe bactérien semblent présenter en tendance des performances zootechniques légèrement meilleure que ceux ayant reçues les HE en éclosion : réduction en tendance des saisies en abattoir (-16%), légère amélioration de l'indice de consommation en tendance.

Sans différence par contre sur les critères de poids à l'abattage et gain de poids moyen.

CONCLUSION

Suite à une procédure efficace de nettoyage/désinfection, l'utilisation en éclosier d'une association de plusieurs bactéries spécifiquement sélectionnées confirme ici à nouveau son efficacité à implanter un « biofilm positif » : + 1,3 log de *Bacillus* ($p < 0,05$).

Cette implantation permet d'inhiber le développement des flores pathogènes ; et ce de manière plus efficace que le traitement aux huiles essentielles : -2,6 log d'Entérobactéries et de Coliformes fécaux ($p < 0,05$) en fin d'éclosion. Cela aboutit donc à un environnement moins contaminé en fin d'éclosion.

Cette moindre pression pathogène sur les poussins des lots traités avec le complexe bactérien semble amener à une contamination foie vitellus inférieure en tendance sur les poussins de 1 jour testés. Ces résultats restant à interpréter avec prudence vu le faible nombre de poussins analysés.

Cette amélioration de la qualité du poussin semble se répercuter en élevage à travers une réduction de la mortalité sur les 10 premiers jours d'élevage (-22%, $p < 0,05$) maintenue jusqu'à abattage. Le seuil d'alerte de 1.5% (fixé par l'entreprise) est atteint dans 27% des cas avec le complexe bactérien au lieu de 47% sur le lot HE. Le poids à l'abattage reste quant à lui identique. Les saisies abattoir sont aussi réduites en tendance.

L'utilisation de ce complexe bactérien contenant la souche COBIOTEX ISB06 agréée « Biocide TP3 » est plus efficace que le traitement huiles essentielles sur le contrôle des populations bactériennes pathogènes en éclosier.

Ces travaux confirment des travaux précédents dans lesquels étaient comparés formol et le complexe bactérien COBIOTEX.

Cette nouvelle approche de prophylaxie constitue donc une alternative intéressante dans la stratégie sanitaire en couvoir chair et la stratégie qualité du poussin de un jour en élevage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Saisine ANSES N° 2011 SA 0234

Article R 4412-59 et suivants code du travail relatif aux risques d'exposition aux CMR.

Règlement d'exécution (UE) 2016/1085 de la commission du 05.07.2016 approuvant la substance « *Bacillus amyloliquefaciens* souche ISB06 » en tant que substance active destinée à l'utilisation dans des produits biocides du type 3

Communication Vétô pôle Dr FILLIAT tech-n-bio Utilisation huiles essentielles en couvoir 7-11-2011.

Travaux internes COBIOTEX 12-2010 ; « Couvoir chair, substitution du formol par un complexe bactérien ;

Étude comparative des populations spécifiques du couvoir ».

Tableau 1. Qualité sanitaire de l'environnement post désinfection (en Log UFC/g)

	FLORE TOTALE		ENTEROBACTERIES		COLIFORMES FECAUX	
	Salle HE	Salle Bactéries	Salle HE	Salle Bactéries	Salle HE	Salle Bactéries
ECLOSION 1	5,5	5,3	0,0	0,0	0,0	0,0
ECLOSION 2	4,9	5,4	0,0	0,0	0,0	0,0
ECLOSION 3	3,9	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ECLOSION 4	4,9	4,7	0,0	0,0	0,0	0,0
ECLOSION 5	4,0	5,7	0,0	0,0	0,0	0,0
ECLOSION 6	3,3	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ECLOSION 7	2,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Pas de différence significative		Pas de différence significative		Pas de différence significative	

Tableau 2. Qualité sanitaire de l'environnement en fin d'éclosion (en Log UFC/g)

	FLORE SPORULEE		ENTEROBACTERIES		COLIFORMES FECAUX	
	Salle HE	Salle Bactéries	Salle HE	Salle Bactéries	Salle HE	Salle Bactéries
ECLOSION 1	3,2	3,3	8,3	4,4	8,4	4,3
ECLOSION 2	3	3,7	8,4	5,1	8,3	5,1
ECLOSION 3	3,7	3,8	5,3	2,2	5,1	1,9
ECLOSION 4	3,1	3,4	5,2	2,0	5	2,0
ECLOSION 5	2	5,1	8,6	6,6	8,5	6,1
ECLOSION 6	2,3	3,9	8,4	7,0	8,3	6,6
ECLOSION 7	2,3	5,7	8,1	7,0	8,1	6,9
MOYENNE	2,8	4,1	7,5	4,9	7,4	4,7
	(p<0,05)		(p<0,05)		(p<0,05)	

Tableau 3. Qualité sanitaire des poussins de 1 jour

	HE			BACTERIES		
	% Positivité	Score Foie	Score Vitellus	% Positivité	Score Foie	Score Vitellus
E. Coli	100%	10	11	50%	4	3
Staphylocoques (aureus)	100%	8	10	25%	1	1
Entérocoques	100%	13	11	100%	9	9
Pseudomonas	25%	4	4	25%	0	3
Aspergillus fumigatus	13%	10 fragments de poumons sur 80 prélevés		1%	1 fragments de poumons sur 80 prélevés	

Barème de score: Abondant (4) > Moyen (3) > Faible (2) > Négligeable (1)

Tableau 4. Performances zootechniques en élevage

	HE	BACTERIES	Diff	
Mortalité moyenne à 10 jours	1,8 %	1,4 %	- 22 %	(p<0,05)
Lots dont la mortalité est > à 1,5 % (seuil d'alerte de l'entreprise)	47 %	27 %		
Lots dont la mortalité est > à 2%	37 %	18 %		
Lots dont la mortalité est > à 2,5 %	27 %	9 %		
Mortalité moyenne à 57 jours (incluant les 2% de gratuits)	3,71 %	2,65 %	- 28 %	
% saisie abattoir	0,51 %	0,42 %	- 16 %	
Poids moyen (en contexte avec des animaux rationnés)	2,3	2,3	=	
Gain Moyen Quotidien	41,4	41,4	=	
Indice de consommation	2,18	2,17	- 0,01	

RESUME /

Après des travaux internes antérieurs démontrant l'efficacité du COBIOTEX Biofilm à substituer le formol, l'objectif de ce travail complémentaire est de comparer l'efficacité de deux technologies alternatives en éclosoir :

- ❶ un complexe bactérien multi-souches (COBIOTEX Biofilm®): 1 nébulisation post désinfection dans les éclosoirs et sur les œufs.
- ❷ un complexe d'huiles essentielles (HE): 3 évaporations en cours d'éclosion

7 répétitions en éclosoir (20 000 OAC/ éclosoirs) puis le suivi de ces 2x20 lots en production.

Partant d'un statut post désinfection identique dans les deux salles, le complexe bactérien permet :

**Fig. 1
STATUT BACTERIOLOGIQUE DES ECLOSOIRS EN FIN
D'ECLOSION**

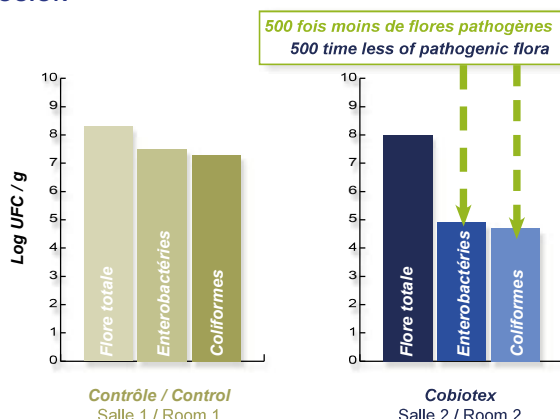


**Fig. 2
CONSEQUENCES SUR LES PERFORMANCES
ZOOTECNIQUES**

	Essential oils	COBIOTEX	Diff.
Mortalité moyenne à 10 jours Average mortality at 10 days	1.8%	1.4%	-22%
Lots dont la mortalité est > à 1.5% Batches with mortality > 1.5%	47%	27%	↓
Lots dont la mortalité est > à 2% Batches with mortality > 2%	37%	18%	↓
Lots dont la mortalité est > à 2.5% Batches with mortality > 2.5%	27%	9%	↓
Mortalité moyenne à 57 jours Average mortality at 57 days	3,71%	2.65%	-28%
% saisie abattoir % culling	0.51%	0.42%	-16%

CONCLUSIONS /

L'utilisation d'un noyau bactérien (dont un actif est « Biocide TP3 ») est plus efficace que le traitement huiles essentielles sur le contrôle des populations bactériennes pathogènes en éclosoir.

Cette nouvelle approche de prophylaxie constitue donc une alternative intéressante dans la stratégie sanitaire en couvoir chair et la stratégie qualité du poussin de un jour en élevage.

RESUME /

After previous internal works which demonstrated the efficiency of COBIOTEX Biofilm to substitute formalin, this complementary work compares the efficiency of two alternatives technologies to formalin use in setters:

- ❶ a nucleus including several selected strains (COBIOTEX Biofilm®): 1 post disinfection spraying in the setters and on the eggs.
- ❷ a complex of essential oils (EO): 3 fumigations during hatching

7 repetitions in hatchery rooms (20 000 OAC/setter) and then study of zoo technical performances of those 2x20 flocks in production.

Starting from the same post disinfection status in both hatchery rooms, the bacterial complex COBIOTEX allows :

500 fois moins d'Entérobactéries et Coliformes fécaux dans les éclosoirs en fin d'éclosion ($p < 0,05$).

Ce qui semble mener à une contamination foie vitellus inférieure en tendance (E. Coli, Staph, Enterocoques, Pseudomonas, Aspergillus).

**Fig. 1- BACTERIAL COUNTING OF THE SETTERS AT
THE END OF HATCHING**

500 times less Enterobacteria and Fecal Coliforms in the setters at the end of hatching ($p < 0,05$).

Which seems to lead to a lower liver-yolk contamination in tendency (E. Coli, Staph, Enterocoques, Pseudomonas, Aspergillus).

- -22% de mortalité sur les 10 premiers jours d'élevage ($p < 0,05$)
- Moindre mortalité maintenue jusqu'à abattage (57 jours).
- -16% de saisies en abattoir.

**Fig. 2- CONSEQUENCES ON ZOOTECHNICAL
PERFORMANCES**

- -22% of mortality on the first 10 days of production ($p < 0,05$)
- Lower mortality maintained until slaughter age (57 days),
- -16% culling rate at slaughter house.

CONCLUSIONS /

The use of a selected bacterial nucleus (One of the bacteria is "Biocide TP3") is more efficient than the treatment with essential oils (EO) on the control of pathogenic flora in hatcheries.

This new prophylaxis approach represents an efficient alternative in the sanitarian strategy in broiler hatcheries and in the day 1 chick's quality strategy in production.

**CARACTERISATION DE PLASMIDES DE *E. COLI* RESISTANTS AUX
CEPHALOSPORINES DE TROISIEME GENERATION
ISOLES DE POULETS DE CHAIR**

**Touzain Fabrice^{1,2}, Le Devendec Laetitia^{1,2}, de Boisséson Claire^{1,2}, Baron Sandrine^{1,2},
Jouy Eric^{1,2}, Perrin-Guyomard Agnès^{2,3}, Blanchard Yannick^{1,2} et Kempf Isabelle^{1,2}**

¹ANSES, Laboratoire de Ploufragan, 22440 Ploufragan, France

²Université Bretagne Loire, France

³ANSES, Laboratoire de Fougères, 35306 Fougères, France

Isabelle.kempf@anses.fr

RÉSUMÉ

La résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G) est un problème de santé publique et vétérinaire. Cette résistance est le plus souvent liée à la présence de plasmides conjugatifs porteurs de gènes codant pour la production de bêta-lactamases à large spectre. Pour mieux comprendre l'épidémiologie de cette résistance, nous avons caractérisé par séquençage une collection d'une trentaine de plasmides préparés à partir de souches de *E. coli*, pathogènes ou non pathogènes, isolées de poulets de chair de différents types de production. Les données de séquençage permettent de décrire les caractéristiques des plasmides : il s'agit le plus souvent de plasmides de grande taille (supérieure à 100 kpb), contenant les gènes de résistance aux céphalosporines *bla*_{CTX-M-1} ou *bla*_{CMY-2}, à la tétracycline (*tetA*) et aux sulfamides (*sul2*), ainsi que parfois les gènes *bla*_{TEM-1b} (résistance aux pénicillines A), *dfrA1* ou *dfrA17* (résistance au triméthoprim) ou *aadA5* (résistance aux aminosides). Ils appartiennent majoritairement au réplicon de type IncI1 et au pMLST3 ou plus rarement aux réplicons Inc B/O/K/Z ou IncF. Globalement les séquences des plasmides sont proches de celles de plasmides isolées dans d'autres productions animales ou d'autres pays.

ABSTRACT

Characterization of plasmids conferring resistance to extended-spectrum cephalosporins in *E. coli* isolated from French broilers

Resistance to extended- spectrum cephalosporins (ESC) is a public and veterinary health concern. This resistance is most often linked to the presence of conjugative plasmids coding for extended- spectrum beta-lactamases. To better understand the epidemiology of this resistance, thirty-two plasmids prepared from pathogenic and commensal *E. coli* strains isolated from broilers of different production types were studied by sequencing. Sequences showed that plasmids were usually larger than 100 kbp, contained the resistance genes *bla*_{CTX-M-1} and/or *bla*_{CMY-2}, *tetA*, *sul2* or less often *bla*_{TEM-1b}, *dfrA1* or *dfrA17* or *aadA5*. They belonged mostly to the replicon type IncI1, pMLST3 or less often to replicon types IncB/O/K/Z or IncF. Their sequences are similar to those of plasmids from other animal productions or other countries.

INTRODUCTION

La résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G) est un problème de santé publique et vétérinaire. Des souches de *E. coli* résistantes aux C3G peuvent être isolées lors de colibacilloses aviaires, ou détectées dans la flore commensale des oiseaux sains arrivant à l'abattoir. Ainsi, les bilans annuels du réseau RESAPATH montrent que le plus fort taux de souches de *E. coli* pathogènes résistantes aux C3G a été observé en 2010 et 2011 avec des niveaux dépassant 20%, mais ces taux ont diminué par la suite pour atteindre 5,1% en 2014 (1). La surveillance annuelle de la flore commensale des poulets de chair arrivant à l'abattoir a montré des pourcentages de 4% en 2010 (2) à 10,4% en 2012 (3) puis 6,2% en 2013 (4). Cette résistance aux C3G est le plus souvent liée à la présence de plasmides conjugatifs porteurs de gènes codant pour la production de bêta-lactamases à large spectre. Nous avons souhaité, dans le cadre d'un projet financé par l'Anses, pouvoir décrire plus finement les éléments génétiques hébergeant cette résistance afin de mieux comprendre l'épidémiologie de cette résistance. Pour cela une trentaine de plasmides préparés à partir de souches de *E. coli* pathogènes ou non pathogènes, isolées de poulets de chair de différents types de production ont été caractérisés.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Préparation des plasmides pour séquençage

Seize souches commensales provenant des échantillons collectés en abattoirs de poulets de chair de 2010 à 2012 dans le cadre des plans de surveillance annuels de l'antibiorésistance de différents abattoirs ont été incluses. Elles provenaient de poulets âgés de 32 à 90 jours appartenant à différents types de production. Seize souches isolées de cas de colibacilloses aviaires isolées dans la même période ont également été incluses. Les souches incluses contenaient soit le gène *bla*_{CTX-M} soit le gène *bla*_{CMY-2}, gènes de résistance aux C3G le plus souvent détectés, (tableau 1).

Les plasmides ont été préparés selon le protocole de Takahashi et Nagano (5) et utilisés pour transformer la souche *E. coli* DH5alpha. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu Mueller Hinton contenant du cefotaxime (4, 8 et 16 mg/l) et/ou de la céfoxitine (8 et 16 mg/l). La sensibilité des souches parentales et des transformants a été étudiée par détermination des concentrations minimales inhibitrices en micro-dilution (6) et les résultats ont été interprétés selon les cut-offs épidémiologiques EUCAST. Les plasmides ont ensuite été purifiés à partir des transformants comme précédemment et utilisés pour le séquençage.

1.2. Séquençage et analyses bioinformatiques

Les échantillons d'ADN plasmidique ont été fragmentés par sonication à l'aide d'un appareil Bioruptor® Plus (Diagenode). Les bibliothèques ont été construites en utilisant les kits « NEBNext Ultra DNA library Prep Kit for Illumina » et « NEBNext Multiplex Oligos for Illumina » (index primers Set 1 et Set 2) suivant les instructions du fabricant (New England Biolabs). Les étapes de purification ont été réalisées à l'aide des billes magnétiques Agencourt AMP pure XP (Beckman-Coulter).

Le séquençage a été réalisé sur un séquenceur Illumina Mi-seq (séquences paires de 2x250 nucléotides). Les séquences ont été nettoyées avec Trimmomatic 0.32 (7). Deux alignements bowtie2 (8) des lectures nettoyées ont été réalisés (options -non-deterministic -very-sensitive), l'un sur le gène *bla*_{CTX-M-1} (DQ915955) pour évaluer la profondeur de couverture du séquençage, l'autre sur *phiX174*. Ce second alignement visait à éliminer les lectures correspondant à la séquence *phiX174* qui est utilisée en séquençage Illumina dans le cas d'échantillons très redondants pour en augmenter la diversité. Les lectures non alignées ont été sous-échantillonnées pour atteindre une profondeur de couverture globale de 80. Ces lectures ont été fournies à l'assembleur *de novo* Spades 3.1.1 (9). Les contigs redondants ou peu couverts de l'assemblage obtenu ont été éliminés.

Les séquences ont ensuite été analysées à l'aide des sites ResFinder (10) pour identifier les gènes de résistance, PlasmidFinder et pMLST webtool (<https://cge.cbs.dtu.dk/services> (11)) pour les types de réplicons, ainsi qu'à l'aide de RASTA-Bacteria program version 2.12 (<http://genoweb1.irisa.fr/duals/RASTA-Bacteria/>) (12) pour identifier les systèmes toxine-anti-toxine.

Les séquences des principaux gènes de virulence des *E. coli* pathogènes pour les volailles (APEC) (*sitA-D*, *iucA-D*, *iutA*, *hlyF*, *ompT*, *etsA-C*, *iss*, *iroB-E*, *iroN*, *cvaA-C*, *cvi*, *tsh* et *eitA-D* (13)) ont également été recherchées.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Le tableau 1 présente les principales caractéristiques des transformants obtenus et des plasmides séquencés. A titre d'exemple, la figure 1 montre la carte d'un des plasmides obtenus à partir d'une souche commensale.

Pour une des seize souches commensales, il n'a pas été possible d'obtenir de transformant, malgré plusieurs tentatives, ce qui suggère que le gène *bla*_{CTX-M} de cette souche est probablement chromosomique. Pour les six souches commensales, pour lesquelles l'assemblage nettoyé permettait d'obtenir un unique contig, la taille des plasmides était comprise entre 107 834 et 115 593 pb et ils contenaient 143 à 153 ORF. Treize des seize plasmides étaient de type Inc11, pMLST3 et contenaient le gène *bla*_{CTX-M-1}. Les gènes de résistance *tetA* et *sul2* ainsi que le système toxine-

anti-toxine ParE-RelB étaient fréquemment trouvés dans ces plasmides. La présence de gènes de résistance vis-à-vis d'antibiotiques fréquemment utilisés en médecine vétérinaire (tétracyclines et sulfamides) constitue un risque de co-sélection de la résistance aux C3G.

Une des seize souches pathogènes a donné deux transformants, l'un contenant *bla*_{CTX-M-1} et l'autre contenant *bla*_{CMY-2}. Pour les huit souches pathogènes, pour lesquelles l'assemblage nettoyé a permis d'obtenir un seul contig, la taille des plasmides était comprise entre 105 870 et 110 588 pb et ils contenaient 146 à 151 ORF. Comme pour les souches commensales, un grand nombre de plasmides (quinze sur dix-sept) étaient de type IncI1, pMLST3 et contenaient le gène *bla*_{CTX-M-1}. Les gènes de résistance *tetA* et *sul2* ainsi que le système toxine-anti-toxine gène ParE-RelB étaient également fréquemment trouvés.

Tous les plasmides de souches commensales ou pathogènes de type IncI1 possédaient les gènes de transfert *PilI-T*, *pilV*, *traA-C*, *traE-F*, *traH*, *traJ-X*, une DNA primase et une endonucléase. Ils avaient également les gènes impliqués dans la maintenance et

la stabilité plasmidique. A l'exception d'un des plasmides d'une souche pathogène, les principaux gènes de virulence décrits chez les *E. coli* pathogènes pour les volailles n'ont pas été détectés, suggérant soit leur absence, soit une localisation chromosomique ou sur un autre plasmide.

CONCLUSION

Les données de séquençage montrent que la diversité des plasmides est relativement faible, puisque 28 des 32 plasmides sont de type IncI1, pMLST3 et que les gènes de résistance présents sont majoritairement *bla*_{CTX-M-1}, *tetA* et *sul2*. Un seul des plasmides contenait des gènes de virulence des APEC.

Remerciements : Les auteurs remercient les laboratoires d'analyses vétérinaires adhérent au Résapath, le Conseil Départemental des Côtes d'Armor, ainsi que Biogenouest Génomique

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Jarrige N, Jouy E, Haenni M, Gay E, Madec JY.** 2013. RESAPATH réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries animales, bilan 2012. Maisons-Alfort.
2. **EFSA-ECDC.** 2012. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010 (<http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/pub/2598>). EFSA Journal 2012;10(3):2598 **10**:2598 [2233 pp.].
3. **EFSA-ECDC.** 2014. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012. EFSA Journal **12**:3590 [3336 pp.].
4. **EFSA-ECDC.** 2015. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. EFSA Journal **13**:4036 [4178 pp.].
5. **Takahashi S, Nagano Y.** 1984. Rapid procedure for isolation of plasmid DNA and application to epidemiological analysis. J Clin Microbiol **20**:608-613.
6. **CLSI.** 2013. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, approved standard-fourth edition.
7. **Bolger AM, Lohse M, Usadel B.** 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics **30**:2114-2120.
8. **Langmead B, Salzberg SL.** 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods **9**:357-359.
9. **Yang X, Charlebois P, Gnerre S, Coole MG, Lennon NJ, Levin JZ, Qu J, Ryan EM, Zody MC, Henn MR.** 2012. De novo assembly of highly diverse viral populations. BMC genomics **13**:475.
10. **Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV.** 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. J Antimicrob Chemother **67**:2640-2644.
11. **Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Larsen MV, Lund O, Villa L, Aarestrup FM, Hasman H.** 2014. In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **58**:3895-3903.
12. **Sevin EW, Barloy-Hubler F.** 2007. RASTA-Bacteria: a web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes. Genome Biol **8**:R155.
13. **Johnson TJ, Johnson SJ, Nolan LK.** 2006. Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic Escherichia coli suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. J Bacteriol **188**:5975-5983.

Tableau 1. Principales caractéristiques des plasmides

Origine	Caractéristiques	Résistances des souches parentales ^a	Profils de résistance des transformants*	Gènes de résistance sur les transformants*	Type de réplicon	Système toxine – antitoxine
Plans de surveillance à l'abattoir : 16 souches commensales	11 Poulets standard, 4 exports, 1 bio 8 couvoirs 9 départements d'élevages 7 abattoirs Poulets âgés de 32 à 90 jours 0 à 3 traitements antibiotiques recensés	C3G : 16 ^a SMX : 13 TET : 12 TMP : 8 FQ : 7 STR : 7 GEN : 1	C3G – SMX-TET : 8 ^b C3G – SMX-TMP : 4 C3G : 2 C3G-SMX : 1	<i>bla</i> _{CTX-M-1} : 13 ^b <i>bla</i> _{CMY-2} : 2 <i>bla</i> _{TEM-1} : 1 <i>tetA</i> : 8 <i>sul2</i> : 13 <i>dfrA1</i> ou <i>dfrA17</i> : 4 <i>aadA5</i> : 3	IncI1, ST3 : 13 (tous contenant <i>bla</i> _{CTX-M-1}) Inc B/O/K/Z : 2 (tous contenant <i>bla</i> _{CMY-2})	ParE-RelB : 11 (tous dans plasmides IncI1, ST3) RelE-StbD : 1 plasmide IncB/O/K/Z ParE-RelB : 11 (tous dans plasmides IncI1, ST3)
RESAPATH : 16 souches isolées lors de colibacillose aviaire	Informations non disponibles	C3G : 16 ^a SMX : 16 TET : 16 FQ : 11 TMP : 7 STR : 5 KAN : 2	C3G – SMX-TET : 14 ^b C3G – SMX-TMP : 1 C3G-TET : 1 C3G : 1	<i>bla</i> _{CTX-M-1} : 16 ^b <i>bla</i> _{CMY-2} : 1 <i>tetA</i> : 14 <i>sul2</i> : 14 <i>dfrA1</i> ou <i>dfrA17</i> : 1 <i>aadA5</i> : 1	IncI1, ST3 : 15 (tous les plasmides contenant <i>bla</i> _{CTX-M-1} (sauf un) ^c) IncFIA/FIB/FIC/FII : 1 (contenant <i>bla</i> _{CMY-2})	CcdA-CcdB/COG5302 : 1 plasmide (contenant aussi parE-RelB) VagC / SpoVT_AbrB / MazE-VapC / PIN : 1 plasmide (IncFIA/FIB/FIC/FII)

SMX : sulfamide ; TMP : Triméthoprim ; TET : Tétracycline ; FQ : Fluoroquinolones ; STR : Streptomycine ; GEN : Gentamicine KAN : Kanamycine

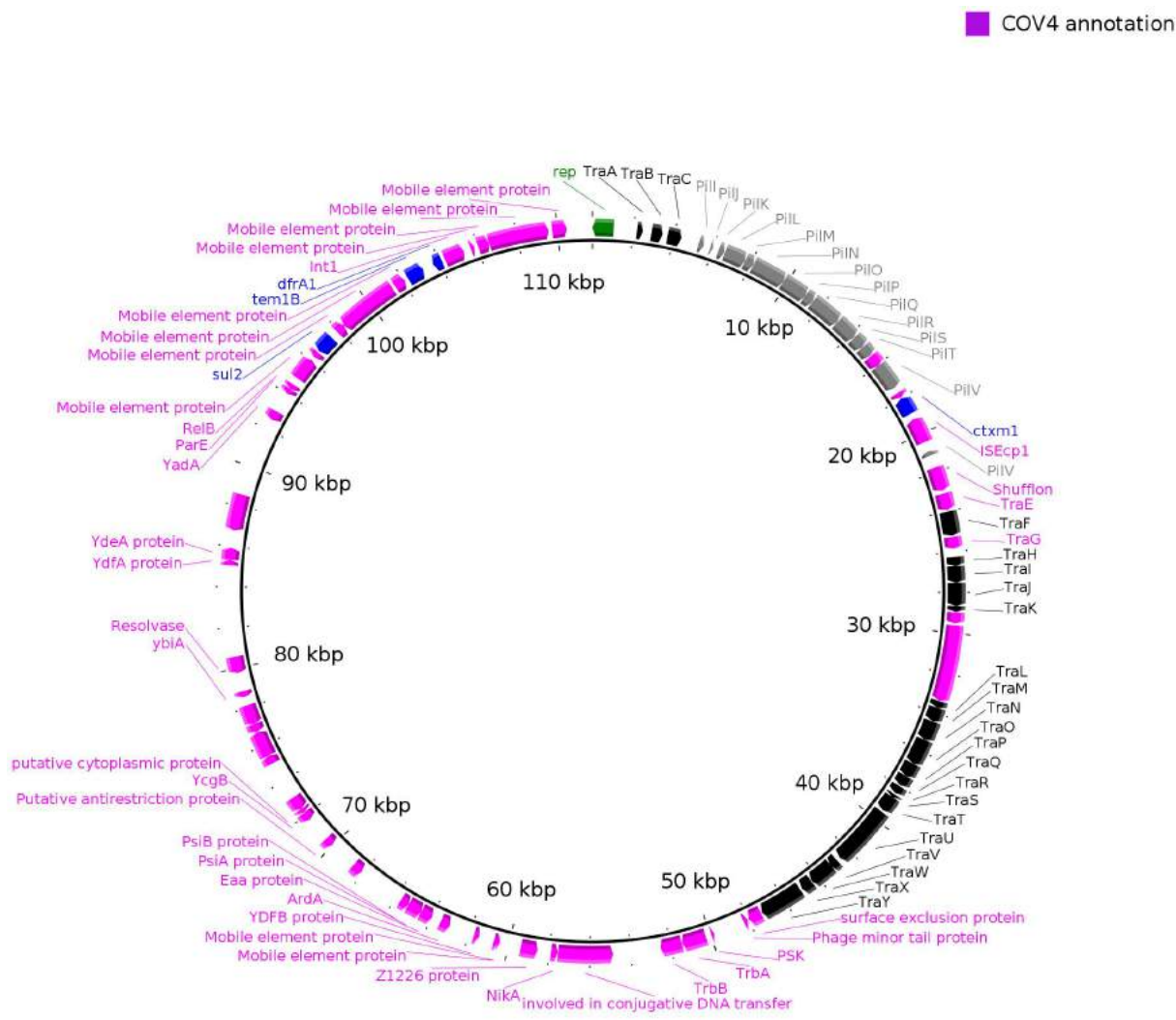
*pas de transformant obtenu pour une souche commensale ; deux transformants obtenus pour une souche pathogène (l'un contenant *bla*_{CTX-M-1} et l'autre contenant *bla*_{CMY-2})

^anombre de souches parentales présentant cette résistance

^bnombre de transformants présentant ce profil de résistance ou possédant ce gène de résistance

^cpour un plasmide, un des gènes (*ardA*) nécessaire au typage pMLST n'est pas trouvé, les autres gènes correspondent au pMLST3

Figure 1 : carte du plasmide pCOV4



**SALMONELLA MULTI-RESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES, ISOLEES
DES BATIMENTS D'ELEVAGES DE POULET DE CHAIR ET DES
TUERIES AVICOLES DANS LA WILAYA DE SIKKDA (ALGERIE)**

Djeffal.S¹ ; Mamache.B² ; Elgroud.R¹ ; Bouaziz.O¹

¹*Laboratoire de gestion et production animales , Institut des sciences vétérinaires
, Université Constantine1, BP Djeffal56 Elkhroub, 25100.*

²*Institut des Sciences Vétérinaires et des Sciences Agronomiques, Université de
Batna-1*

sam9vetot@gmail.fr

RÉSUMÉ

Cette étude a pour objectifs de déterminer la prévalence des différents sérotypes de salmonelles isolés dans 32 bâtiments d'élevage de poulet de chair et 6 tueries avicoles dans la région de Skikda (Nord-est de l'Algérie) et leur profil d'antibiorésistance. L'étude a été menée de Décembre 2011 à Mai 2013.

Sur les 32 élevages étudiés, 11 se sont révélés contaminés par des salmonelles, (34.4%), tandis que toutes les tueries étaient contaminées par *Salmonella*. Cinq sérovars à partir de 45 souches de *Salmonella*, ont pu être identifiés avec une prédominance de S. Kentucky (n = 22) suivi de S. Heidelberg (n = 13), S. Enteritidis (n = 4) et S. Virginia (n = 5) et S. Newport (n=1). Les isolats des élevages de poulet de chair et des tueries avicoles ont été résistants à la Ciprofloxacine (51.1 %); Céfotaxime (26.7 %); Aztreonam (26.7 %) et Gentamycine (22.2 %). Ces résultats démontrent que la production de poulet de chair est une source importante de la dissémination des salmonelles multi-résistantes dans notre région.

ABSTRACT

Emergence of multi drug resistant *Salmonella* isolated from broiler chicken farms and slaughterhouses in the province of Skikda(Algeria)

This study was conducted to assess the prevalence and distribution of *Salmonella* serovars and their resistance to antibiotics in thirty-two poultry farms and six poultry slaughterhouse of the province of Skikda (North-East of Algeria). The study was carried out from December 2011 to May 2013. The results showed that 11 farms (34.4%) and all slaughterhouses were contaminated. Forty-five serovars were identified, the most frequent serotypes were Kentucky (n = 22), followed by *Salmonella* Heidelberg (n = 13), Virginia (n = 5), Enteritidis (n = 4) and Newport (n = 1). The isolates exhibited resistance to Ciprofloxacin (51.1 %); Cefotaxim (26.7%); Aztreonam (26.7%) and Gentamycin (22.2%).

These results indicate that poultry products could be a potential source for *Salmonella* multi-drug resistant (MDR) spread in our region.

INTRODUCTION

L'infection à *Salmonella* est un problème majeur en santé publique. Différents animaux sont des réservoirs de salmonelles en Algérie, parmi lesquels les volailles, le pigeon, les bovins et les reptiles. Les individus s'infectent lors de la consommation d'aliments contaminés avant leur cuisson (Majowicz *et al.*, 2010). Ces infections sévères causent des gastroentérites surtout chez les patients jeunes et les immuno-déficients qui peuvent être traités dans les cas les plus graves par des fluoroquinolones tels que la ciprofloxacine (Le Hello *et al.*, 2011).

Parmi ces pathogènes, le traitement des souches de *Salmonella* multi-résistantes (MDR) chez les humains devient de plus en plus difficile. Le nombre rapporté des infections par intoxications alimentaires, dues aux souches de salmonelles multi-résistantes est en évolution constante (Molbak *et al.* 2000 ; Angulo *et al.*, 2005).

L'objectif de cette étude est d'estimer la prévalence des salmonelles chez le poulet de chair dans les poulaillers et les tueries de la région de Skikda, de déterminer la distribution des sérovars des souches isolées, et de déterminer leurs profils d'antibiorésistance.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Région d'étude et prélèvements

L'étude a été réalisée sur 32 élevages de poulet de chair, 4 tueries privées et un abattoir avicole public, dans la région de Skikda. Afin d'évaluer le statut hygiénique des élevages et des tueries étudiés et de déterminer leur statut sanitaire, vis-à-vis des salmonelles, nous avons effectué une enquête épidémiologique transversale (questionnaire d'élevage et d'abattage). Un total de 1194 prélèvements ont été réalisés au niveau des bâtiments d'élevage et 90 prélèvements au niveau des tueries. Pour des raisons techniques, les prélèvements ont été réalisés en 2 campagnes distinctes.

Les tableaux 1 et 2 illustrent l'organisation des prélèvements des élevages et des tueries.

1.2. Méthodes

Isolement et identification

Les analyses bactériologiques ont été réalisées selon le protocole de la **norme ISO6579/2002**. Après confirmation, les souches de salmonelles ont été soumises au sérotypage et à l'antibiogramme.

La lecture et la détermination du sérovars de la souche ont été réalisées selon le tableau de Kauffmann-White-LeMinor alors que l'antibiogramme a été réalisé selon la méthode de Kirby-Bauer (1966), sur gélose de Mueller-

Hinton (Bio-Rad, France). Selon les recommandations du (EUCAST), 13 antibiotiques ont été testés à savoir : Amoxicilline /Acide clavulanique, Ticarcilline, Céfotaxime, Céfotaxime, Aztréoname, Imépinème, Ertapénème, Amikacine, Ciprofloxacine, Colistine, Cotrimoxazole et Fosfomicine. La recherche de BLSE a été réalisée par le test de synergie et du double disque (DDST).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Prévalences de contamination

Sur les 32 élevages étudiés, 11 se sont révélés contaminés par les salmonelles, soit un taux de prévalence de 34.4 %. Le nombre des prélèvements contaminés par *Salmonella* varie selon la nature du prélèvement : 6,25 % (n = 64) pour les chiffonnettes, 4,2 % (n=330) pour les écouvillons ; 3,1 % (n=320) pour les fientes ; 2,2 % (n=320) pour l'eau de boisson et absence totale de toute contamination des prélèvements d'aliment. Les tueries avicoles étudiées, sont toutes contaminées par *Salmonella*. Sur 90 prélèvements, 10 étaient contaminées, soit un taux de 11,1 %, avec des taux de contamination différents : caecum 12 % (n = 25); peau du cou 8 % (n = 25); foie 4 % (n = 25); chiffonnettes 40 % (n = 5); écouvillon du couteau de saignée 20 % (n = 5); eau de rinçage des carcasses 20 % (n = 5) (tableau 3).

Distribution et antibiorésistance des sérotypes de *Salmonella*

45 souches de *Salmonella* ont été isolées à partir des prélèvements des élevages de poulet de chair et des tueries avicoles. 5 sérovars ont été identifiés avec une prédominance de 2 sérovars à savoir Kentucky (n = 22) et Heidelberg, (n = 13). Nous avons aussi noté la présence d'autres sérovars à savoir : Enteritidis (n = 4), Virginia (n = 5) et Newport (n=1). Les isolats des élevages de poulet de chair et des tueries avicoles se sont révélés résistants à la Ciprofloxacine (51.1 %); Ticarcilline (46.7 %); Céfotaxime (26.7 %); Aztreonam (26.7 %) et la Gentamycine (22.2 %).

Les analyses bactériologiques ont montré des seuils de contamination divers par le genre *Salmonella*. Cette importante prévalence est en accord avec celles rapportées dans la région de Constantine par Elgroud *et al.* (2009): 36.7 % ; Ayachi *et al.* (2010) : 60 % dans la région de Batna, Bouzidi *et al.* (2011) dans les régions d'El-Tarf et Annaba avec une prévalence de 38,3 %. A l'échelle Européenne, l'étude conduite par the European Food Safety Authority (EFSA) en 2011, dans plusieurs pays de l'Union Européenne, a rapporté une moyenne de prévalence de contamination par *Salmonella spp.* dans les élevages de poulet de chair de 3,2 %,

avec la prévalence la plus élevée pour tous les sérovars, détectée en Roumanie (36,5 %).

Le taux de prévalence de contamination par les salmonelles, relevé durant notre étude reste important avec une distribution hétérogène des sérovars.

D'après l'étude des questionnaires, cette prévalence peut être expliquée par le faible niveau hygiénique des poulaillers étudiés, leurs structures surtout que certains d'entre eux sont des serres en plastic mais aussi par l'absence de contrôle et de surveillance, car la maladie ne se déclare pas cliniquement et persiste à l'état insidieux chez les porteurs sains. Les poulets peuvent être contaminés pendant la période d'élevage. Le faible niveau hygiénique global associé à la persistance de la bactérie à l'intérieur des bâtiments d'élevage favorisent la présence de salmonelles (Lahellec et al., 1985 ; Baggesen., 1992). Dans les pratiques d'élevage des volailles, plusieurs points critiques restent non maîtrisés surtout la litière humide, le sol en terre battue, difficile à nettoyer et à désinfecter et les murs en parpaings. Le poulet peut être infecté horizontalement par le biais de la litière, l'aliment, l'eau de boisson, la poussière et les équipements contaminés (Poppe, 2000).

Des salmonelles ont été isolées dans la totalité des tueries avicoles testées (prévalence de 100 %) ; Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Elgroud et al. (2009) (73,3 %). Différentes enquêtes réalisées au cours de ces dernières années, ont montré que différents stades de la production peuvent être responsables de la contamination par *Salmonella* des volailles et des produits transformés (Salvat, 1997). Lors d'infection du poulet, la bactérie se multiplie dans les intestins et peut être excrétée dans les fientes et contaminer d'autres sujets. Le problème de la contamination croisée peut continuer lors du processus d'abattage (Van Scothorst et al., 1980). Plusieurs études ont démontré que la contamination des carcasses pouvait être associée à plusieurs facteurs tels que : la non mise à jeun des poulets avant l'expédition à l'abattoir (Corrier et al., 1999), la longueur du temps de remplissage des casiers de transport (Papa et al., 1988) et les mauvaises pratiques d'abattage, de nettoyage et de désinfection (Lillard et al., 1988 ; James et al., 1992). La plupart des sérotypes ont été isolés simultanément dans les élevages et les tueries avicoles étudiées ce qui suggère que la plupart des sérotypes de *Salmonella* se transmettent essentiellement au cours de l'élevage, avant l'abattage du poulet de chair. Le sérotype Kentucky est le plus prédominant durant cette étude. Ce sérotype a été associé au poulet depuis 1937, duquel il a été isolé pour la première fois aux Etats-Unis (Edwards et al., 1938). Le sérovar

Heidelberg a aussi été isolé à un taux de 31,1 %. Ce sérovar a déjà été mis en évidence au cours d'une étude menée dans la région du centre de l'Algérie en 2007 dans laquelle, sur les 100 souches de salmonelles isolées, le sérotype Heidelberg a représenté un taux de 24 % (Bounar-Kechih et al., 2011).

Le sérovar Enteritidis est le plus fréquemment isolé en production animale, surtout en aviculture en Europe (EFSA, 2013).

Les isolats des élevages de poulet de chair et des tueries avicoles de la wilaya de Skikda étaient majoritairement résistants aux fluoroquinolones, surtout pour le sérovar Kentucky. Ainsi, 26,7 % des souches isolées portaient des Bétalactamases à spectre étendu. Une augmentation des infections à salmonelles non typhiques causées par plusieurs sérotypes de *S. Enterica* et plus spécialement le sérovar Kentucky a été rapportée dans certains pays d'Europe durant la période 2005-2008. Les souches résistantes aux C3G (par production de beta-lactamases à spectre étendu : BLSE) ou céphalosporinases, semblent être en nette augmentation dans le genre *Salmonella* (Le Hello et al., 2011 ; Xavier et al., 2011).

D'après l'étude des questionnaires, nous avons pu constater que les antibiotiques sont trop utilisés en élevage de poulet de chair et leur administration est majoritairement assurée par les éleveurs ce qui engendre des problèmes d'usage non raisonné et entraîne l'émergence des bactéries multi résistantes. C'est pourquoi des programmes de surveillance, une utilisation rationnelle des antibiotiques et des mesures strictes de biosécurité doivent être mis en place afin de limiter la propagation des bactéries multi résistantes dans l'industrie avicole.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude révèlent un taux inquiétant de contamination par les salmonelles dans les élevages de poulet de chair et les tueries avicoles de la wilaya de Skikda. Nous avons noté une émergence de souches résistantes aux quinolones (*S. Kentucky* résistante à la ciprofloxacine) et des souches productrices de β -lactamases à spectre étendu. La contamination humaine causée par ces salmonelles multi-résistantes aux antibiotiques peut avoir de graves conséquences sur la santé publique. Pour cela, il est vivement recommandé d'appliquer les mesures de biosécurité au niveau des élevages et des tueries avicoles et de maîtriser les sources de contaminations et de dissémination de la bactérie. L'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire doit être soumis un contrôle strict et sévère sous la responsabilité directe du médecin traitant pour la protection de la santé humaine contre ces germes zoonotiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Angulo FJ.,Johnson KR.,Tauxe RV.,Cohen ML , 2000 .Microb Drug Resist .,(6),77-83.
- 2-Ayachi, A., Alloui,N., Bennoune O., & Kassah-Laouar A,2010.Journal of Infection in Developing Countries., 4(2) , 103–106.
- 3- Baggesen D.L., Olsen J.E et Bisgaard M, 1992.Avian Pathol., (21), 569-579.
- 4- Bounar-Kechih S.,Hamdi TM., Mezali L., Assaous F., Rahal K,2011.Poultry Science.,(91), 1179-1185.
- 5-Bouzidi N., Aoun L., Zeghdoudi M., Bensouilah M., Elgroud R., Oucief I., Granier S.A., Brisabois A., Desquilbet L., Millemann Y ,2012. Food Research International .,(45) , 897–904.
- 6- Corrier D.E., Byrd J.A., Hargis B.M., Hume M.E., Bailey R.H et Stanker L.H,1999. Poultry Science ., (78), 45-49.
- 7-Le Hello S., Hendriksen RS., Doublet B., Fisher I., Nilsen EM., Whichard J.M , 2011.J.Infect .Dis .,(204),675-684.
- 8- Edwards P.R,1938. J Hyg(Lond).,(38), 306-8.
- 9- EUCAST (European Comitee on Antimicrobial Suceptibility Testing),2015 Recommandations , pp
- 10- Elgroud R., Zerdoumi F., Bentchouala C., Benazzouz M ., Granier S., Brisabois A., Dufour B., Millemann Y,2009. Zoonoses and Public Health.,(56), 84-93.
- 11- European food Safety Authority(EFSA).,Scientific report of efsa and ECDC ,2013.EFSAf journal., ,11(4),3129.
- 12-Guibourdenche M., Rggentin P., Mikoleit M., Field P.I., Bockemuhl,J., Grimont P.A and Weill F.X., 2010 supplement 2003-2007 (N°47) to the white –Kauffmann Le Minor scheme. Research Microbiology.,(161),26-29.
- 13- ISO (Comité international de normalisation AW/9 2002) ISO6579 ,2002 Microbiology- General guidance on methods for the detection of *Salmonella* –Amendment 1, Annex D.
- 14- James W.O., Williams W.O., Prucha J.C., Johnston R et Christensen W, 1992 . Journal of the American Veterinary Medical Association, 57-59.
- 15- Lahellec C., Colin P, 1985. British Poultry Science.,(26),179-186.
- 16- Le Hello S., Hendriksen RS., Doublet B., Fisher I., Nilsen EM., Whichard J.M,2011. J.Infect .Dis .,(204),675-684.
- 17- Lillard H.S,1988. Journal of food Royal Protection.,(51), 405-408.
- 18- Majowicz S.E., Musto J .,Scallan E,2010. Clin Infect Dis .,(50),882-89.
- 19- Molbak K ,2005. Clin Infect Dis., (41),1613-20.
- 20- Papa C.M .,Dickens ., 1988. Poultry Science.,(68),1478-1484.
- 21-Poppe C ,2000. CAB International:Oxon ,107-132.
- 22- Standardisation de l'antibiogramme a l'échelle nationale (SAEN) sixième édition 2011. pp51-52 .
- 24- Van Scothorst M ., Notermans S,1980. Edinbugh British Poultry science Ltd .,(90),79-90.
- 25- Xavier Weill François ., Le Hello Simon , 2011, centre national de référence de Salmonella CNR 2011.

Tableau 1 : Organisation des prélèvements en élevages

Elevages	Période	Nbre d'élevages	Type de prélèvements	Nbre prélèvements/ visite à l'âge 15-30J	Nbre prélèvements/ visite à l'âge 45-60J	Bilan de prélèvements effectués par campagne
Première campagne	décembre 2011 à septembre 2012	17	Fientes Ecouvillon cloacal Aliment, Eau, Chiffonnettes.	1 pool de 5 g x 5 fientes 1 pool de 5 écouvillons 1 pool de 5gx5 d'aliment 1 pool de 5x25 mL d'eau 1 pool de chiffonnettes	1 pool de 5 g x 5 fientes 1 pool de 5 écouvillons 1 pool de 5x25 mL d'eau 1 pool de chiffonnettes	170 prélèvements fientes 170 prélèvements écouvillons 85 prélèvements d'aliments 170 prélèvements d'eau 34 chiffonnettes appliquée à la surface des murs (30cm)
Total		17		37 échantillons (9 pools)		629 échantillons
Deuxième campagne	décembre 2012 à mai 2013	15	Fientes Ecouvillon cloacal Eau, Chiffonnettes, Aliment	1 pool de 5gx5 fientes 1 pool de 5 écouvillons 1 pool de 5gx5 d'aliment 1 pool de 5x20 mL d'eau 1 pool de chiffonnettes	1 pool de 5gx5 fientes 1 pool de 5 écouvillons 1 pool de 5x20 mL d'eau 1 pool de chiffonnettes	150 prélèvements fientes 160 prélèvements d'écouvillons 75 prélèvements d'aliments 150 prélèvements d'eau 30 chiffonnettes appliquée à la surface des murs (30cm)
Total		15		37 échantillons en 9 pools sauf élevage public : 47 échantillons en 10 pools (doublement du nombre d'écouvillons cloacaux)		565

Nbre : Nombre

Tableau 2 : Organisation des prélèvements dans les tueries et l'abattoir avicoles

Période	Nombre de Tueries	Type de prélèvements	Nombre de prélèvements	Bilan de prélèvements effectués par visite
décembre 2012 à la fin Mai 2013	4 tueries et 1 Abattoir	Caecums Foie Peau du cou Eau de rinçage chiffonnettes Ecouvillon	1 pools de 5x5g caecums 1 pools de 5x5g foie 1 pools de 5x5g peau du cou 1 pool de 100 ml d'eau de rinçage 1 pool de chiffonnettes 1 pool d'écouvillons	25 prélèvements de 25g de caecums 25 prélèvements de 25g de foie 25 prélèvements de 25g de peau du cou 5 prélèvements de 100mL d'eau de rinçage de carcasse 5 chiffonnettes appliquées sur la surface des murs à 30 cm du sol sur 600m ² de surface 5 écouvillons appliqués sur la surface des couteaux de la saignée
Total	5		18 pools	90

Tableau 3 : Distribution des sérotypes de *Salmonella* dans les bâtiments d'élevage de poulet de chair et les tueries avicoles selon la nature des prélèvements.

	Prélèvements	<i>S.Kuntucky</i>	<i>S.Heidelberg</i>	<i>S.Enteritidis</i>	<i>S.Newport</i>	<i>S.Virginia</i>	Total
Bâtiment d'élevage	Chiffonettes (n=64)	2(50%)	1(25%)	1(25%)	0(0.0%)	0(0.0%)	4(6.2%)
	Ecouvillon (n=330)	5(35.7%)	6(43%)	2(14.3%)	1(7.1%)	0(0.0%)	14(4.2%)
	Fiente (n=320)	6(60%)	4(40%)	0 (0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	10(3.1)
	Eau (n=320)	4(57.1%)	2(28.6%)	0(0.00%)	0(0.0%)	1(14.3%)	7(2.2)
	Aliment (n=160)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)
Sub total	1194	17(48.6%)	13(37.1%)	3(8.5%)	1(2.9%)	1(2.8%)	35(2.9%)
Tueries	Chiffonettes (n=5)	1(50%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	1(50%)	2(40%)
	Ecouvillon (n=5)	1(100%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	1(20%)
	Eau(n=5)	0(0.0%)	0(0.0%)	1(100%)	0(0.0%)	0(0.0%)	1(20%)
	Peau du cou (n=25)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	2 (8%)	2(8%)
	Foie (n=25)	1(100%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	1(4%)
	Caecum (n=25)	2(66.7%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	1(33.3%)	3(12%)
Sub total	90	5(50%)	0(0.00%)	1(10%)	0(0.0%)	4(40%)	10(11.1%)
Total	1284	22(48.9%)	14(31.1%)	4(8,9%)	0(0.0%)	5(11.1%)	45(3.5%)

ETABLISSEMENT D'UNE COURBE DE REFERENCE POUR LE SUIVI QUOTIDIEN DE LA VIABILITE EN ELEVAGE DE POULET DE CHAIR STANDARD

S. Gall¹, C. Facon², D. Concordet³, J.L. Guérin¹, M.C. Paul¹

¹ENVT, INRA, UMR IHAP, ENVT, 23 chemin des Capelles, 31076 TOULOUSE

²Labovet Conseil, Réseau Cristal, Rue Olivier de Serres, 85500 LES HERBIERS

³Toxalim, Université de Toulouse, ENVT, 23 chemin des Capelles, 31076 TOULOUSE

m.paul@envt.fr

RÉSUMÉ

L'objectif principal de la présente étude visait à construire une courbe de mortalité instantanée de référence pour les élevages de poulets de chair, à partir d'observations faites dans un grand nombre de lots de poulets de chair. L'objectif secondaire était d'étudier l'effet de différentes variables, dont la présence d'un traitement antibiotique, sur le taux de mortalité cumulée en fin de lot.

L'analyse a porté sur les relevés quotidiens de mortalité effectués par 26 éleveurs dans 289 lots de poulet standard, mis en place au cours de l'année 2014. L'analyse statistique a consisté en trois étapes : i) analyse de la variabilité intra/inter-élevage du pourcentage de mortalité instantanée (p_i), ii) construction de la courbe de mortalité de référence sur la base des percentiles de la distribution, iii) étude de l'effet des traitements antibiotiques sur la mortalité cumulée par un modèle de régression.

Les résultats de l'analyse de variance montrent que l'effet du lot sur la mortalité varie en fonction des éleveurs (p -value de l'interaction $< 10e-10$). Sur la base du 95^e percentile de la distribution, la courbe de mortalité instantanée de référence présente un pic à J4 ($p_i = 1\%$), et diminue ensuite jusqu'à atteindre un plateau à J11 ($p_i = 0.18\%$). Les résultats du modèle de régression montrent que, bien que présentant une courbe de référence d'allure similaire, les lots ayant eu au moins un traitement antibiotique présentent un taux de mortalité cumulée en fin de lot significativement supérieur (p -value $< 10e-16$) aux lots n'ayant jamais été traités.

ABSTRACT

Baseline daily viability curve for broiler chicken flocks, France

The main objective of this study was to establish a reference curve displaying the temporal pattern of the daily mortality rate in broiler production. A secondary objective was to analyze the relationship between various variables, including antibiotic treatment, and the cumulative mortality rate.

A total of 289 broiler flocks from 26 farms raised in 2014 were analyzed. Statistical analysis was carried out in three steps: i) analysis of within-between farm variability of the daily mortality rate (p_i), ii) establishment of a reference curve based on the distribution percentiles, and iii) analysis of the effect of antibiotic treatment on cumulative mortality based on regression modelling.

Results from analysis of variance showed a significant interaction (p -value $< 10e-10$) between flock and farm effect. Based on the 95th percentile of the distribution, the mortality curve peaks at day 4 ($p_i = 1\%$), and decreases until a threshold reached at day 11 ($p_i = 0.18\%$). Results from the regression model show that, while reference curves show a similar pattern, flocks with at least one antibiotic treatment have higher cumulative mortality rates than those without any antibiotic treatment (p -value $< 10e-16$).

INTRODUCTION

De nombreuses données sont aujourd'hui collectées en routine dans les élevages de poulets de chair. Leur analyse par des outils statistiques et informatiques s'inscrit dans le cadre d'approches dites « d'élevage de précision », et apparaissent aujourd'hui comme un important levier pour le suivi et l'amélioration des systèmes d'élevage (Berckmans 2014). Parmi ces données, la mortalité est un indicateur simple et robuste permettant d'évaluer l'état sanitaire et le bien-être des lots. Bien que collectées de manière systématique en élevage, ces informations ont été peu analysées jusqu'ici en France. Des valeurs seuils ont été définies dans le cadre de la surveillance épidémiologique des maladies infectieuses réglementées, notamment influenza aviaire (DGAL 2015), et de l'établissement des normes minimales relatives à la protection des poulets de chair (DGAL 2016). La définition de seuils d'alerte pertinents est cependant compliquée par le fait que des variations journalières de mortalité, consommation d'eau et d'aliment sont attendues en situation normale dans les élevages de poulet de chair (Savill, St. Rose et al. 2008).

L'objectif principal de la présente étude visait à décrire la mortalité quotidienne en élevage, puis à construire une courbe de mortalité instantanée « de référence » à partir d'observations faites dans un grand nombre de lots de poulets de chair. L'objectif secondaire était d'explorer le lien entre différentes variables, dont la présence de traitement antibiotique, et la mortalité cumulée en fin de période d'élevage.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Collecte des données en élevage

L'étude a porté sur 289 lots de poulet standard, produits au cours de l'année 2014 par 26 élevages spécialisés (c'est-à-dire dont l'atelier poulet standard est le seul atelier avicole) appartenant à deux organisations de producteurs situés dans le Grand Ouest de la France.

Les caractéristiques générales du lot, les données de mortalité et les informations concernant d'éventuels traitements antibiotiques ont été saisies dans une base Excel à partir des informations recensées sur les fiches d'élevage.

1.2. Analyse statistique

Le pourcentage de mortalité instantanée (p_i) a été calculé en divisant, pour chaque jour i , le nombre de poulets morts le jour i par le nombre de poulets présents dans le bâtiment la veille.

L'analyse statistique a été conduite en trois étapes. Dans un premier temps, une analyse de variance a été conduite pour décomposer l'effet du lot et de l'élevage sur le pourcentage de mortalité instantanée. Les courbes de mortalité instantanée de chaque lot ont ensuite été tracées et une courbe de « référence » a été construite sur la base du 95^e percentile de la distribution quotidienne des taux observés. Enfin, les facteurs influençant la mortalité cumulée en fin de lot ont été analysés par un modèle de régression logistique multivarié en utilisant le taux de mortalité cumulée en fin de lot comme variable dépendante. Cette approche, utilisée notamment pour modéliser des prévalences (Zuur, Ieno et al. 2009), revient dans le cas présent à considérer dans la loi binomiale, le nombre de morts en fin de lot comme nombre de succès, et le nombre total d'oiseaux comme nombre d'essais. Les facteurs étudiés étaient : l'organisation de producteurs, la saison (codée en 4 catégories), la présence d'un traitement antibiotique au cours de la vie du lot (variable binaire), et le pourcentage de mortalité à J1. Le phénomène de non-indépendance entre les lots d'un même éleveur a été pris en compte en introduisant l'identifiant éleveur comme effet aléatoire dans le modèle.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les approches visant à établir des « valeurs de référence » telles que celle utilisée visent en effet à décrire la dispersion des valeurs observées dans une population d'individus considérés comme « en bonne santé » (Geffré, Friedrichs et al. 2009). Parmi les 289 lots initialement inclus, 12 ont été exclus de l'analyse car présentant une mortalité définie comme anormalement élevée selon les critères réglementaires (taux instantané de mortalité supérieur à 4% ou supérieure à 0.5% et ayant doublé le jour suivant). L'analyse a donc été conduite sur un ensemble de 277 lots.

La courbe du taux de mortalité instantanée correspondant au 95^e percentile de la distribution (Figure 1) présente un pic à J4 ($p_i = 1\%$), et diminue ensuite jusqu'à atteindre un plateau à J11, correspondant à de très faibles taux de mortalité instantanée ($p_i = 0.18\%$). Bien que le 95^e percentile soit classiquement utilisé dans la littérature portant sur les valeurs de références en biologie médicale (Geffré, Friedrichs et al. 2009), d'autres seuils sont

envisageables. Les résultats montrent que la courbe correspondant à une moyenne de la mortalité cumulée à J10 de 2% correspond au 80^e percentile de la distribution quotidienne des taux observés..

Les résultats de l'analyse de variance montrent une interaction significative ($p\text{-value}<10\text{e-}10$) entre les effets propres du lot et de l'éleveur sur le taux de mortalité instantanée. Ce résultat appelle de futurs travaux, afin d'identifier plus précisément les facteurs structurels et les pratiques d'élevage sous-tendant ces deux effets (par exemple, pour l'effet éleveur, âge et type de bâtiment comme suggéré par de précédentes études (Heier, Hogasen et al. 2002; Campe, Koesters et al. 2013) ou le climat ou le parquet d'origine (Hughes, Hermans et al. 2008) pour l'effet lot).

La moyenne du taux cumulé de mortalité au démarrage (J7) évalué dans cette étude à 1.75% (écart-type=0.19) est légèrement supérieure aux valeurs estimées aux Pays-Bas (moyenne de 1.5%, estimée sur plus de 16000 lots produits entre 2004 et 2006) (Yassin, Velthuis et al. 2009) ou en Norvège (moyenne de 1.54%, estimée à partir de 1664 lots produits entre 1996 et 1999) (Heier, Hogasen et al. 2002). La moyenne de la mortalité cumulée en fin de lot, calculée sur la base de la valeur d'âge d'abattage observée la plus faible (J29), s'élevait à 3.27% (écart-type = 1.21). Il est important de noter que la mortalité à J1 des lots ayant reçu un traitement antibiotique était significativement supérieure à celle des lots non traités (0.29 en moyenne contre 0.15, $p\text{-value}<10\text{e-}16$).

Le modèle de régression a mis en évidence plusieurs variables influençant de manière significative le taux de mortalité cumulée en fin de lot (à J29). L'effet de la saison observé dans cette étude la saison (augmentation du risque de mortalité en hiver en comparaison avec le printemps, $p<10\text{e-}16$) est cohérent avec des travaux précédents ayant noté un effet du climat sur la

mortalité en élevage de poulet de chair (Dawkins, Donnelly et al. 2004; Campe, Koesters et al. 2013). De manière attendue, le taux de mortalité à l'arrivée des poussins (J1) influence également la mortalité cumulée en fin de lot ($p<10\text{e-}16$); ce résultat confirme l'importance de la qualité des conditions du démarrage sur les performances en fin de lot (Campe, Koesters et al. 2013). Bien que n'ayant pas été exploré jusque-là, à notre connaissance, dans la littérature, l'effet de l'organisation de production sur la mortalité en fin de lot peut s'expliquer notamment par des différences dans le parc de bâtiments avicoles, ou les modalités d'encadrement technique. L'inclusion d'autres variables serait ainsi nécessaire pour décomposer les facteurs explicatifs sous-jacents. Enfin, les résultats du modèle de régression montrent que, bien que présentant une courbe de référence d'allure similaire, les lots ayant eu au moins un traitement antibiotique présentent un taux de mortalité cumulée en fin de lot significativement supérieur aux lots n'ayant jamais été traités. Différentes variables sont susceptibles d'influencer le taux de mortalité en fin de lot (Heier, Hogasen et al. 2002; Chou, Jiang et al. 2004; Campe, Koesters et al. 2013), et notamment l'âge des bâtiments, la ventilation, le climat, le type de litière, le couvoir d'origine, ou encore la densité de chargement. Ces variables devraient être intégrées au modèle de régression dans la suite de ces travaux.

CONCLUSION

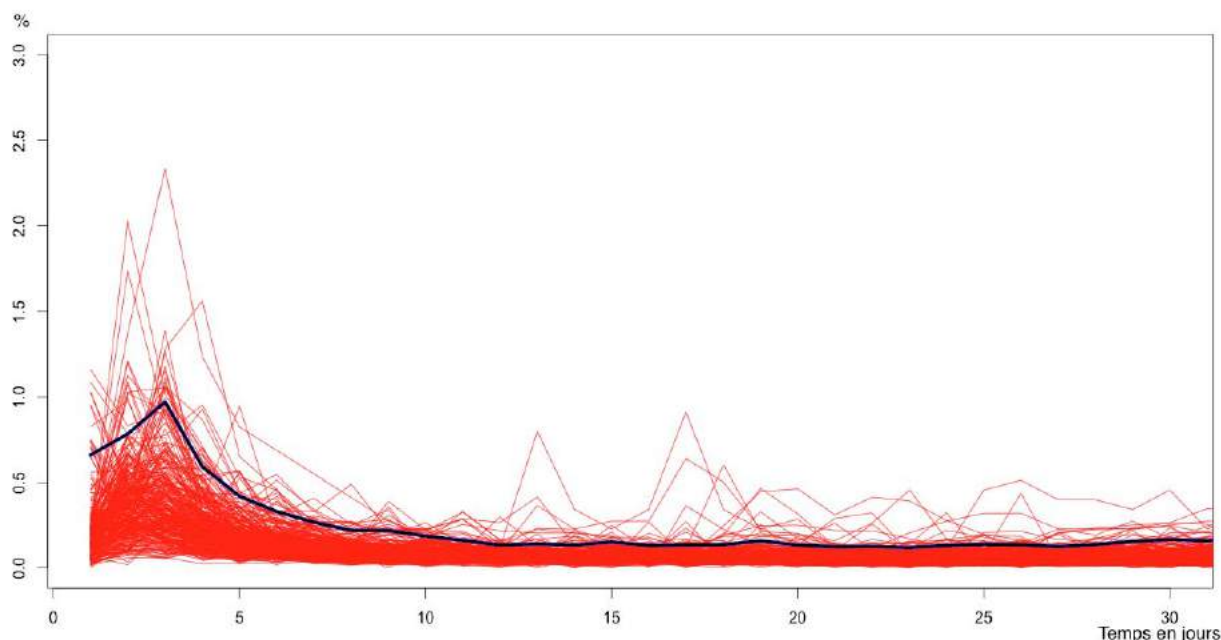
Ce travail permet de fournir, aux éleveurs, techniciens et vétérinaires, des données quantitatives permettant de resituer en temps réel les performances d'un lot par-rapport à un ensemble de lots comparables. De plus amples travaux sont toutefois nécessaires pour confirmer ces résultats préliminaires, notamment via l'inclusion de l'ensemble des variables influençant la mortalité tout au long de la vie du lot. A terme, et une fois consolidée, la courbe de référence pourrait être envisagée comme un outil d'alerte précoce des troubles de santé en élevage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Berckmans, D. (2014). "Precision livestock farming technologies for welfare management in intensive livestock systems." *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* **33**(1): 189-196.
- Campe, A., S. Koesters, et al. (2013). "Epidemiology of influences on the performance in broiler flocks—A field study in Germany." *Poultry Science* **92**(10): 2576-2587.
- Chou, C. C., D. D. Jiang, et al. (2004). "Risk factors for cumulative mortality in broiler chicken flocks in the first week of life in Taiwan." *British Poultry Science* **45**(5): 573-577.
- Dawkins, M. S., C. A. Donnelly, et al. (2004). "Chicken welfare is influenced more by housing conditions than by stocking density." *Nature* **427**(6972): 342-344.
- DGAL (2015). Note de service DGAL/SDSPA/2015-127.

- DGAL (2016). Arrêté du 28 juin 2010 établissant les normes minimales relatives à la protection des poulets destinés à la production de viande. Version consolidée au 28 novembre 2016
- Geffré, A., K. Friedrichs, et al. (2009). "Reference values: a review." *Veterinary clinical pathology* **38**(3): 288-298.
- Heier, B. T., H. R. Hogasen, et al. (2002). "Factors associated with mortality in Norwegian broiler flocks." *Preventive Veterinary Medicine* **53**: 147-158.
- Hughes, L., P. Hermans, et al. (2008). "Risk factors for the use of prescription antibiotics on UK broiler farms." *Journal of antimicrobial chemotherapy* **61**(4): 947-952.
- Savill, N. J., S. G. St. Rose, et al. (2008). "Detection of mortality clusters associated with highly pathogenic avian influenza in poultry: a theoretical analysis." *Journal of The Royal Society Interface* **5**(29): 1409-1419.
- Yassin, H., A. G. J. Velthuis, et al. (2009). "Field study on broilers' first-week mortality." *Poultry Science* **88**: 798-804.
- Zuur, A., E. Ieno, et al. (2009). "Mixed effects models and extensions in ecology with R. Gail M, Krickeberg K, Samet JM, Tsiatis A, Wong W, editors." *New York, NY: Spring Science and Business Media*.

Figure 1. Profil des courbes de mortalité instantanée dans 277 lots de poulets standard (en rouge), et 95^e percentile (en bleu)



INTERVALLES DE REFERENCE POUR LES CONCENTRATIONS PLASMATQUES DES PROTEINES TOTALES, FRACTIONS PROTEIQUES, ET RATIO ABUMINE/GLOBULINES CHEZ DES POULETS ET DES DINDES ADULTES

Arzour- Lakehal. Nedjoua^{1*}, Boudebza. Assia¹, Jaillardon. Laititia², Benlatrèche. Chérifa³

¹ *laboratoire PADESCA. ISV El khroub. Université des frères Mentouri. Constantine. Algérie.*

² *LDH vet. ONIRIS. Nantes. France.*

³ *Laboratoire de Biochimie. CHU Benbadis. Constantine. Algérie.*
arzourne@gmail.com

RÉSUMÉ

L'électrophorèse des protéines est utilisée en médecine aviaire en tant que moyen diagnostique depuis une quinzaine d'années principalement dans le diagnostic de phénomènes inflammatoires. L'objectif de ce travail est de comparer les profils protéiques de dindes et de poulets adultes, et de proposer des valeurs de référence pour toutes les fractions protéiques. L'étude a porté sur 29 dindes adultes de la souche BIG 6 en fin de cycle d'élevage, et sur 10 poulets de chair de la souche Isa 15 avant abattage. Les protéines plasmatiques ont été séparées en utilisant une électrophorèse sur gel d'agarose (Sebia, France). La lecture a été faite par densitométrie qui donne une analyse quantitative individuelle de chaque fraction. Afin de proposer des valeurs de référence, nous avons utilisé le logiciel Reference Value Advisor qui permet de calculer des limites de référence en utilisant différentes méthodes : non paramétrique, paramétrique et Robuste, avec ou sans transformation Box-Cox des valeurs. L'électrophorèse du plasma de dindes a révélé l'existence des bandes protéiques suivantes: albumine, α 1-globulines, α 2-globulines, β -globulines, et γ - globulines dans tous les échantillons. Une fraction pré-béta et deux fractions de β -globulines ont été remarquées en plus sur le plasma des poulets adultes. La méthode paramétrique pour les intervalles de référence a été utilisée quand la normalité a pu être établie utilisant le test Shapiro-Wilk. Dans tous les autres cas, c'est la méthode Robuste qui a été employée. L'électrophorèse des protéines est un test simple mais qui peut grandement aider le praticien aviaire dans le diagnostic et la prise en charge thérapeutique.

ABSTRACT

Reference intervals for total protein concentrations, plasma protein fractions, and albumin/globulins ratios in adult chickens and turkeys.

Protein electrophoresis has been used in avian medicine as a diagnostic tool for the last fifteen years, mainly in the diagnosis of inflammatory phenomena. The objective of this study was to compare protein profiles of adult turkeys and chickens and to propose reference values for all protein fractions. The study involved 29 adult turkeys BIG 6 strain at the end of the breeding cycle and 10 broilers from Isa 15 strain prior to slaughter. Plasma proteins were separated using agarose gel electrophoresis (Sebia, France). The reading was done by densitometry that gives individual quantitative analysis of each fraction. In order to propose reference values, we used Reference Value Advisor software that allows to calculating reference limits using different methods: nonparametric, parametric and Robust, with or without Box-Cox transformation of values. Turkey's plasma electrophoresis revealed the following protein bands: albumin, α 1-globulins, α 2-globulins, β -globulins, and γ -globulins in all samples. A pre-beta fraction and two fractions of β -globulins were also observed on adult chicken plasma. The parametric method for reference intervals was used when normality has been established using the Shapiro-Wilk test. In all other cases, the Robust method was used. Protein electrophoresis is a simple test that can greatly assist the avian practitioner in diagnosis and therapeutic management.

INTRODUCTION

Comme chez les mammifères, la mesure des protéines totales est souvent évaluée en plus d'autres paramètres biochimiques pour juger de l'état de santé des espèces aviaires. Cependant, une variation significative des fractions protéiques peut se produire en l'absence d'altérations dans les niveaux des protéines totales, ce qui nécessite une méthode fiable d'évaluation des fractions protéiques individuelles (Haydon 2007). L'électrophorèse des protéines plasmatiques est une procédure de diagnostic actuellement appliquée systématiquement aux espèces aviaires. Lorsqu'elle est combinée à une mesure de la teneur totale en protéines, elle permet de quantifier ces fractions (Facon et al., 2014). L'électrophorèse en gel d'agarose est actuellement la technique la plus utilisée en pathologie animale, mais elle a tendance à être supplantée chez l'homme par l'électrophorèse capillaire. Cependant, certains auteurs attirent l'attention sur les variations des résultats entre laboratoires, en particulier pour les fractions de faible amplitude (Rosenthal et al., 2005). La difficulté réside dans l'identification des différentes fractions protéiques qui ne migrent pas au même endroit chez les différentes espèces animales (Alberghina et al., 2011). En effet, il apparaît que de nombreuses publications soient contradictoires en ce qui concerne le nombre de fractions séparées, la concentration de ces fractions ou l'aspect général de la courbe d'électrophorèse. L'objectif du présent document est d'établir des intervalles de référence pour les fractions de protéines plasmatiques de dindes commerciales et de poulets de chair adultes. La Fédération internationale de chimie clinique (IFCC) a défini des directives claires pour établir ces valeurs de référence. Elle a recommandé dans un premier temps d'utiliser au moins 120 individus. Cependant, étant donné les difficultés rencontrées pour l'établissement de ces références, il est maintenant permis d'utiliser des approches statistiques alternatives telles que la méthode Robuste qui permet d'utiliser des échantillons de référence de plus petite taille (Friedrichs et al., 2012).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Matériel

Isa 15 pour le poulet de chair, et BUT Big 6 pour la dinde de chair sont les deux souches étudiées. Les échantillons ont été recueillis à l'abattoir avicole KHALED situé à EL MERIDJ (Constantine-Algérie).

1.2. Méthodes

A 8 et 22 semaines d'âge, respectivement 10 poulets et 29 dindes de chair ont été sacrifiés par décapitation. Le sang pour analyse a été recueilli à partir de la veine jugulaire et récolté dans des tubes héparinés. Le

plasma sanguin a été séparé dans les 2 heures par centrifugation à 3000 tours/min pendant 10 minutes à +4°C, puis stocké à -20°C pour les analyses ultérieures.

Analyse biochimique

La concentration totale en protéines a été déterminée pour chaque échantillon en utilisant un analyseur de chimie Randox RX Daytona (Randox Laboratories-US, Ltd. Kearneysville, Virginie-Occidentale) par la méthode du biuret (Kaplan et Pesce, 1989).

Electrophorèse des protéines

L'électrophorèse sur gel d'agarose d'échantillons de plasma non dilué congelé a été effectuée dans un tampon alcalin; Tris-barbital (pH 9,2), à l'aide de Hydragel 7 Protéine (Sebia, France), sur un système automatisé Hydrasys 2 Scan (Sebia, France).

Analyse statistique

L'analyse des données a été réalisée selon les recommandations de l'American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) sur la théorie des valeurs de référence (Friedrichs et al., 2012). L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel Reference Value Advisor version 2.1 (Geffre et al., 2011). Afin d'établir des intervalles de référence, nous avons d'abord utilisé le test de Shapiro-wilk pour évaluer la distribution des données. L'hypothèse nulle de ce test est que la population est normalement distribuée. Lorsque le nombre d'échantillons de référence est ≥ 20 et <40 , les intervalles de référence doivent être calculés selon des méthodes robustes (indépendantes de la distribution) ou paramétriques (si la normalité a pu être établie). Pour mettre en évidence l'incertitude inhérente à la petite taille des échantillons, des intervalles de confiance de 90% ont été calculées (Friedrichs et al., 2012).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Résultats

L'électrophorèse a révélé les fractions protéiques suivantes chez les dindes domestiques : albumine, α_1 , α_2 , β et γ globulines dans tous les échantillons de plasma. Le résultat est exprimé par une courbe à 5 pics (Figure 1). La normalité à l'aide du test de Shapiro-Wilk a été établie pour les protéines totales (g/L), l'albumine (%), α_1 globulines (g/L et %), α_2 globulines (g/L et %), β globulines (g/L et %) et le rapport A/G. La méthode robuste a été utilisée pour l'albumine (g/L) et les γ globulines (g/L et %), et la méthode paramétrique a été utilisée pour toutes les autres variables (Tableau 1). Sur plasma de poulet de chair, nous avons pu mettre en évidence en plus un pic en pré β et deux pics de β globulines. Le résultat est donc exprimé par une courbe à 7 pics (Figure 2). En raison du faible nombre d'échantillons analysés, nous n'avons pas pu établir de valeurs de référence pour les fractions protéiques sur plasma de

poulets de chair. La moyenne $\pm$ écart-type, la médiane, la limite inférieure et la limite supérieure sont proposées (Tableau 2).

Discussion

Les **protéines totales** aviaires sont constituées d'albumine et de globulines. Elles sont un paramètre commun utilisé pour juger de l'état de santé des animaux et ont une rôle exceptionnel dans le maintien de l'homéostasie (Filipovic et al., 2007).

La détermination des protéines plasmatiques totales est réalisée par la méthodologie du biuret. Cette méthode continue d'être la technique colorimétrique la plus utilisée en médecine aviaire. Thrall et al. (2012) ont indiqué que la concentration normale des protéines plasmatiques chez les oiseaux est inférieure à celle des mammifères, généralement comprise entre 25 et 45 g/L. Les valeurs retrouvées sur les plasmas de dindes ont nettement dépassé cet intervalle allant jusqu'à 63g/L.

L'**albumine** constitue la fraction anodique la plus intense. La finesse de ce pic est un bon indicateur de la qualité de l'électrophorèse. La fraction albumine est la seule fraction composée d'une seule protéine. Elle constitue chez la plupart des animaux domestiques de 35 à 50 % des protéines totales, contrairement à l'homme chez qui elle représente entre 60 et 67 % (Kaneko, 1997). Le pourcentage d'albumine dans les plasmas de poulets a été supérieur à celui des dindes allant jusqu'à 42.9% des protéines totales. Chez les oiseaux, comme chez l'homme, l'albumine est considérée comme une protéine négative de la phase aiguë de l'inflammation (Kaneko, 1997).

Différentes méthodes ont été utilisées pour déterminer les concentrations plasmatiques en albumine. Les techniques utilisant les colorants non spécifiques sont couramment utilisées, mais elles souffrent de variabilité lorsqu'elles sont utilisées chez les espèces aviaires (Harr, 2002). La méthode de liaison au vert de Bromocrésol (BCG) ou au pourpre de Bromocrésol (BCP) n'est pas fiable sur des prélèvements aviaires. Des divergences entre les valeurs obtenues par les techniques de liaison aux colorants et celles obtenues par électrophorèse ont été démontrées pour le poulet, le canard, la dinde et les poissons (Lumeij et al., 1990). L'albumine aviaire présente une structure nettement différente de celle des mammifères et se lie de ce fait aux colorants avec une affinité réduite (Harrison et Lightfoot, 2006). Ces méthodes n'ont donc pas été validées chez les oiseaux (Lumeij et al., 1990).

Chez certaines espèces aviaires, un autre pic correspondant à la fraction pré albumine est visualisé en amont de celui de l'albumine. La bande préalbumine est composée de transthyréline, une protéine qui lie les hormones thyroïdiennes (Haydon, 2007). Chez le poulet de chair, cette fraction pré albumine a pu être mise en évidence par électrophorèse capillaire de zone, elle se situe en

position anodique par rapport au pic d'albumine (Arzour-Lakehal, 2014).

Les **alpha-globulines** constituent la fraction la plus rapide des globulines. Elles sont pour la plupart synthétisées par le foie (Kaneko, 1997). La fraction alpha est une fraction de protéines très hétérogènes présentant des rôles biologiques variables. La plupart des ces protéines sont des protéines positives de la phase aiguë de l'inflammation (Chamanza et al., 1999).

Les **beta globulines** sont elles aussi principalement synthétisées par le foie. L'importance des protéines de la fraction beta réside dans leur rôle essentiel dans le métabolisme du fer, particulièrement la transferrine et la ferritine comme formes de transport et de stockage du fer, ainsi que l'hémopexine qui maintient l'hème sous forme soluble (Kaneko, 1997). Ces protéines sont pour la plupart des protéines positives de la phase aiguë de l'inflammation. La transferrine, protéine négative de l'inflammation chez les mammifères est une protéine positive de l'inflammation chez les oiseaux (Chamanza et al., 1999).

Le fibrinogène est un très bon indicateur de l'inflammation. C'est pourquoi la plupart des auteurs choisissent d'utiliser du plasma plutôt que du sérum pour réaliser les électrophorèses des protéines sanguines chez les oiseaux (Lumeij, 2008).

La fraction **gamma** est constituée d'immunoglobulines mais elle peut, chez certaines espèces, contenir des protéines migrant normalement dans la fraction beta. Il s'agit principalement chez les oiseaux des IgM, des IgA et des IgY (correspondant aux IgG des mammifères) synthétisées par les plasmocytes. Leur élévation est la preuve d'une stimulation antigénique (Kaneko, 1997).

Par convention, chez les oiseaux, le rapport albumine/globulines est calculé en divisant la fraction albumine (A) par la somme des globulines (G). Un tel rapport est en général supérieur à 1 (Lumeij, 2008). Dans notre travail, ce rapport a atteint 1.2 sur plasma de dindes, et seulement 0.7 sur plasma de poulets de chair. L'augmentation du niveau des α , β , et γ -globulines avec l'âge, avec en même temps une diminution du niveau d'albumine ont été observées par plusieurs auteurs chez plusieurs espèces de volailles et peuvent expliquer la diminution de ce rapport en fin de cycle d'élevage chez le poulet comme rapporté dans notre étude (Filipovic et al., 2007). Ce ratio reste cependant le paramètre le plus fiable à interpréter d'un point de vue clinique, puisque tout processus inflammatoire entraîne très rapidement une inversion caractéristique de ce rapport (Lumeij, 2008). Par conséquent, l'établissement d'intervalles de référence du rapport A/G chez les oiseaux est très important.

Conclusion

L'électrophorèse des protéines est une méthode de choix permettant chez la volaille de quantifier les niveaux plasmatiques d'albumine et de globulines.

Cependant, l'interprétation d'un électrophorégramme chez les espèces aviaires reste aujourd'hui difficile en raison principalement de la rareté des valeurs de référence proposées, mais aussi de la disparité des techniques d'électrophorèse. Cette technique reste

néanmoins le meilleur moyen de mettre en évidence la fin d'un processus inflammatoire. L'utilisation de techniques normalisées et d'un plus grand nombre d'animaux aidera le praticien à établir des modèles d'électrophorégrammes pour chaque espèce aviaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alberghina, D., Giannetto, C., Vazzana, I., Ferrantelli, V. and Piccione, G., 2011. Reference intervals for total protein concentrations, serum protein fractions, and albumin/globulin ratio in clinically healthy dairy cows. *J Vet Diag Invest*, 23: 111-114.

Arzour- Lakehal, N., 2014. Normes et interprétations des dosages des paramètres biochimiques sanguins chez le poulet de chair. Thèse de Doctorat en Sciences. Université des frères Mentouri 1. Chapitre 6, p105-113.

Chamanza, R., Van Veen, L., Tivapazi, M.T. and Toussaint M.J.M., 1999. Acute phase proteins in the domestic fowl. *World Poult Sci*, 55: 61-71.

Facon, A., Roman, Y. and Guérin J.L. 2014. Assessment of inflammatory status in poultry using plasma protein electrophoresis as a diagnostic tool. *Rev Med. Vet*, 165, 11-12, 305-312.

Filipovic, N., Stojevic, S., Milinkovic-Tur, S., Ljubic, B. and Zdelar-Tuk, M., 2007. Changes in concentration and fractions of blood serum proteins of chickens during fattening. *Veterinarski arhiv*, 77(4):319-326.

Friedrichs, K.R., Harr, K.E., Freeman, K.P., Szladovits, B., Walton, R.M., Barnhart, K.F. and Blanco-Chavez, J., 2012. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet Clin Pathol* 41/4 : 441-453.

Geffré, A., Concordet, D., Braun, J.P. and Trumel, C., 2011. Reference Value Advisor : a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with microsoft excel. *Vet Clin Pathol*. 2011 Mar; 40(1):107-12.

Harr, K.E., 2002. Clinical chemistry of companion avian species: a review. *Vet Clin Path*, 3:140-151.

Harrison, G.J. and Lightfoot, T.L., 2006. Diagnostic value of biochemistry. In *Clinical avian medicine*, volume 1, Zoological education network prod, p611-629.

Haydon, S., 2007. Comparison of albumin measurements by electrophoresis and the bromocresol green method in chicken plasma. *BVZS Zoo Med Bulletin*.

Kaneko, J.J., 1997. Serum proteins and the dysproteinemias. In Kaneko JJ, ed. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5th ed. San Diego, CA: Academic Press: 117-137.

Kaplan, L.A. and Pesce, A.J., 1989. Clinical chemistry theory, analysis, and correlation. 2nd edition. The CV Mosby Company. Saint Louis. Baltimore. Philadelphia. Toronto 1312p.

Lumeij, J.T., 2008. Avian clinical biochemistry. In Kaneko, Harvey, Bruss, editots. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6th ed. San Diego Academic press, 839- 872.

Lumeij, J.T., De Bruijne, J.J. and Kwant, M.M., 1990. Comparison of different methods of measuring protein and albumin in pigeon sera. *Avian Path*, 19:255-261.

Rosenthal, K.L., Johnston, M.S. and Shofer, F.S., 2005. Assessment of the reliability of plasma electrophoresis in birds. *Am J Vet Res*, 66: 375- 378.

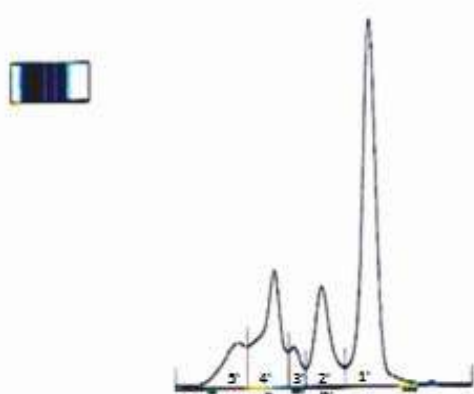
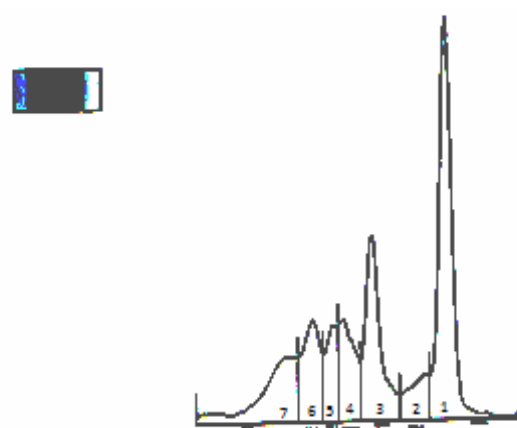
Thrall, M.A., Weiser, G., Allison, R. and Campbell, T., 2012. Clinical chemistry of common non domestic mammals, birds, reptiles, fish and amphibians. In *Veterinary Haematology and Clinical Chemistry*. Second edition: 569-614.

Tableau 1. Valeurs de référence proposées pour les protéines totales, fractions protéiques, et ratio A/G sur plasma de dindes de chair.

Variable	n	Méthode paramétrique	Méthode robuste	90% IC pour limite inférieure	90% IC pour limite supérieure
Protéines totales (g/L)	29	28-59		25-32	55-63
Albumine (g/L)	29		13-29	11-15	26-32
Albumine (%)	29	43-53		41-44	52-55
$\alpha 1$ globulines (g/L)	29	4-10		4-5	9-11
$\alpha 1$ globulines (%)	29	14-19		13-15	19-20
$\alpha 2$ globulines (g/L)	29	1-3		0.3-1	2-3
$\alpha 2$ globulines (%)	29	2-6		1-2	6-7
β globulines (g/L)	29	5-14		4-6	13-15
β globulines (%)	29	16-28		15-17	26-29
γ globulines (g/L)	29		2-6	2-3	5-6
γ globulines (%)	29		6-12	5-7	11-13
Ratio A/G	29	0.7-1		0.7-0.8	1.1-1.2

Tableau 2. Moyenne $\pm$ écart-type, médiane, limite inférieure et supérieure proposées pour les protéines totales, fractions protéiques, et ratio A/G sur plasma de poulets de chair.

Variable	n	Moyenne $\pm$ écart-type	Médiane	Limite inférieure	Limite supérieure
Protéines totales (g/L)	10	32.9 $\pm$ 5.8	33.6	23.8	38.8
Albumine (g/L)	10	11.8 $\pm$ 1.9	12.5	8.3	13.8
Albumine (%)	10	36.2 $\pm$ 3.8	35.5	31.7	42.9
$\alpha 1$ globulines (g/L)	10	1.9 $\pm$ 0.6	2.0	1.0	2.6
$\alpha 1$ globulines (%)	10	5.6 $\pm$ 1.1	5.8	4.0	6.9
$\alpha 2$ globulines (g/L)	10	5.4 $\pm$ 0.9	5.6	3.8	6.8
$\alpha 2$ globulines (%)	10	16.4 $\pm$ 1.1	16.4	15.0	17.8
Pré béta (g/L)	10	2.1 $\pm$ 0.9	1.9	1.0	3.9
Pré béta (%)	10	6.6 $\pm$ 2.7	5.5	2.7	10.2
$\beta 1$ globulines (g/L)	10	3.7 $\pm$ 1.5	3.6	1.8	5.2
$\beta 1$ globulines (%)	10	11.0 $\pm$ 3.0	11.1	7.1	16.3
$\beta 2$ globulines (g/L)	10	3.2 $\pm$ 0.9	3.3	2.0	4.4
$\beta 2$ globulines (%)	10	9.6 $\pm$ 1.3	9.7	7.2	11.4
γ globulines (g/L)	10	4.7 $\pm$ 1.1	4.6	3.3	5.9
γ globulines (%)	10	14.5 $\pm$ 2.9	14.1	10.8	19.3
Ratio A/G	10	0.6 $\pm$ 0.1	0.5	0.5	0.7

**Figure 1.** Profil d'électrophorèse sur plasma de dinde
1': albumine- 2': $\alpha 1$ globulines- 3': $\alpha 2$ globulines- 4': β globulines- 5': γ globulines.**Figure 2.** Profil d'électrophorèse sur plasma de poulet
1: albumine- 2: $\alpha 1$ globulines- 3: $\alpha 2$ globulines- 4: Pré beta globulines- 5: $\beta 1$ globulines- 6: $\beta 2$ globulines- 7: γ globulines.

MESURES EMPLOYEES SUR LE TERRAIN POUR LIMITER L'IMPACT DU SYNDROME DES ŒUFS A EXTREMITÉ DE VERRE INDUIT PAR *MYCOPLASMA SYNOVIAE* EN ELEVAGE DE POULES PONDEUSES.

Mindus Claire¹, Puterflam Julie¹, Huneau-Salaun Adeline², Cisneros-Tamayo Marco³, Gautier-Bouchardon Anne V.³, Chiron Geoffrey¹

¹ ITAVI, 7 rue du Faubourg Poissonnière, 75009 PARIS

² Anses, 22440 PLOUFRAGAN

³ Anses – Laboratoire de Ploufragan-Plouzané et Université Bretagne-Loire, BP 53, 22440 PLOUFRAGAN
chiron@itavi.asso.fr

RÉSUMÉ

Mycoplasma synoviae (*Ms*) est l'une des quatre espèces principales de mycoplasmes pathogènes en aviculture. Dans les années 2000, des souches de *Ms* à tropisme génital ont été identifiées dans des troupeaux de poules pondeuses présentant le syndrome des œufs à extrémité de verre (EAA) dans différents pays. Il s'agit d'œufs dont l'apex de la coquille est fragilisé, avec une calotte caractéristique, où la coquille est très fine, parfois molle. Les premiers cas de syndrome des œufs à extrémité de verre ont été décrits en 2009 en France. L'objectif de ce travail était de recenser les mesures mises en œuvre sur le terrain afin de minimiser l'impact d'une contamination par *Ms* dans les élevages de poules pondeuses d'œufs de consommation présentant le syndrome EAA. Divers acteurs de la filière poules pondeuses ont été rencontrés : neuf éleveurs de poules pondeuses en système cages aménagées et alternatifs, sept techniciens de groupements de production, sept vétérinaires, sept entreprises, trois chercheurs spécialisés, cinq représentants de laboratoire de recherche ou d'analyses. Les résultats montrent que diverses méthodes ont été mises en place. Le dépistage des élevages est récurrent (10/12 élevages enquêtés et largement recommandé) et estimé important pour les prises de décisions en cours de lot. Des mesures de maîtrise de la contamination peuvent être mises en place comme l'usage d'antibiotiques (7/12 élevages), jugé peu efficace puisque, s'il permet de faire disparaître momentanément le syndrome, ce dernier réapparaît après quelques jours après l'arrêt du traitement. L'adaptation des installations de l'élevage comme une diminution de la vitesse du convoyeur permet de limiter le nombre d'œufs souillés et les temps de nettoyage des tapis de récolte. Un renforcement du protocole de nettoyage et de désinfection a été décidé dans la moitié des cas enquêtés et une réforme précoce du lot peut aussi être envisagée (2 cas). Après la réforme, des mesures de prévention peuvent être réalisées : une vaccination du lot suivant a été pratiquée dans 7/12 élevages et des apports nutritionnels complémentaires sont apportés (8/12 élevages). L'impact économique pouvant être extrêmement variable d'un élevage à l'autre, il est nécessaire d'évaluer les mesures à mettre en place au cas par cas.

ABSTRACT

Methods used in the field to decrease Eggshell Apex Abnormalities syndrome impact induced by *Mycoplasma synoviae* in laying hens farms.

Mycoplasma synoviae is considered as one of the four main mycoplasma species in poultry production. In 2000, *Ms* strains with an oviduct tropism were identified in different countries in layer flocks with Eggshell Apex Abnormalities syndrome. The eggs show an altered and softened shell surface and colour, shell thinning with cracks and breaks. The first appearances of the syndrome in France were declared in 2009. The aim of this work was to identify the methods used in the field in order to minimize the Eggshell Apex Abnormalities syndrome impact induced by *Mycoplasma synoviae* in commercial layers. Therefore, actors of the layer industry were interviewed: nine poultry farmers with layer flocks in furnished cages and alternative system, seven technicians of producer's organizations, seven veterinarians, seven companies, three specialized researchers, five representatives of research or analysis laboratories. Results show that different methods were used. Screening was recurrent (10/12 investigated farms and highly recommended) and considered important for further actions in the flock. Antibiotics use were set up as a contamination control method (7/12 farms) and considered inefficient because the syndrome momentarily disappeared but reappeared a few days after the treatment was stopped. Adapt the facility (such as decrease the egg transportation belt speed) decreased the number of dirty eggs and dirtiness of the transportation belt. Half of the investigated farms reinforced their cleaning and disinfection and animals were slaughtered early in two cases. After slaughter, prevention methods were set up : seven farms applied vaccines and nutritional complements were added in the diet (8/12 farms). The economic impact being extremely variable from one farm to another, it is necessary to evaluate the methods to use case-by-case.

INTRODUCTION

La présence de *Mycoplasma synoviae* (*Ms*) a souvent été mise en évidence dans les élevages de poules pondeuses, avec une prévalence pouvant aller jusqu'à 70% (Gautier – Bouchardon et al., 2015). Les infections par *Ms* sont responsables d'infections subcliniques de l'appareil respiratoire et de la synovite infectieuse. Son pouvoir pathogène peut être exacerbé dans des cas d'associations avec d'autres bactéries ou des virus (Gautier – Bouchardon et al., 2008). Plus récemment, un syndrome « des œufs à extrémité de verre » (EAA pour Eggshell Apex Abnormalities) a été de plus en plus observé en élevages de poules pondeuses et associé à la présence de *Ms*. Il se traduit par des anomalies de la coquille, limitées au cône supérieur de l'œuf (jusqu'à environ 2 cm autour de l'apex), avec, dans la plupart des cas, une zone de démarcation claire où la coquille est très fine. La zone altérée, parfois molle, présente une translucidité accrue à la lumière avec la présence de fissures et de cassures (Figure 1) (Gautier-Bouchardon, 2012). Apparu dans différents types d'élevages (système cage ou alternatif et de 250 poules à plus d'un million d'animaux), ce syndrome a été décrit pour la première fois en France en 2009-2010. En 2011, 70% des ateliers de pondeuses étaient estimés comme contaminés par *Ms* et 2 à 13 % touchés par le syndrome des œufs à extrémité de verre (Gautier-Bouchardon, 2012). Une enquête épidémiologique de l'Anses indique une prévalence du syndrome de 7,3% en France en 2016 (Cisneros-Tamayo et al., 2016).

Même si *Ms* ne semble pas avoir d'effet significatif sur la mortalité en élevage ou sur le nombre d'œufs produits (Dufour-Gesbert et al., 2006), une augmentation du nombre d'œufs déclassés est constatée (œufs fragiles, mais également œufs souillés par les œufs cassés : jusqu'à 20% d'œufs déclassés).

Pour répondre à une demande de la filière, les mesures mises en œuvre sur le terrain pour prévenir ou limiter l'impact du syndrome EAA induit par *Ms* en élevage de poules pondeuses d'œuf de consommation en cages aménagées ou en système alternatif avec parcours ont été recensées.

1. MATERIELS ET METHODES

Un état des lieux de la gestion du syndrome a été réalisé en France entre octobre 2015 et mars 2016 avec la réalisation d'enquêtes auprès des acteurs de la filière poules pondeuses d'œufs de consommation.

Les questionnaires traitaient :

- de l'ampleur du syndrome EAA (date et contexte d'apparition, suivi et dépistage, taux d'œufs déclassés, conséquences pratiques, communication sur le sujet et logistique mise en place) ;

- des mesures de maîtrise de la contamination mises en place (type de mesure, occurrence, facilité de mise en place et retour sur l'efficacité) ;
- des surcoûts engendrés (perte en œufs, traitements, rajout au protocole de nettoyage et désinfection, temps supplémentaire passé sur l'élevage et perte sur les carcasses à l'abattoir).

Trois types de public ont été visés :

- un public d'éleveurs ou de techniciens (11 personnes) ayant rencontré au moins un cas d'EAA entre 2011 et 2015 afin de recenser des informations sur un cas précis ;
- un public de vétérinaires, de techniciens de groupement (21 personnes) ou porte-parole d'entreprises (six personnes) dans le but d'avoir une vision plus globale du phénomène et de sa gestion ;
- un public de professionnels accompagnant la filière pour mieux comprendre l'impact potentiel de la bactérie et du syndrome : des scientifiques spécialistes du sujet, ainsi que des représentants de laboratoires de recherche ou d'analyses (huit personnes).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les enquêtes ont montré qu'un plan de gestion commun aux élevages contaminés par *Ms* et présentant le syndrome EAA était mis en place :

- après une suspicion de contamination du troupeau par *Ms*, un dépistage était réalisé ;
- le troupeau était ensuite traité ou éventuellement réformé en fonction de la situation de l'élevage ;
- des mesures de prévention ont été mises en place pour les lots suivants.

Les différentes mesures sont tour à tour explicitées ci-après.

2.1. Dépistage

Une augmentation d'œufs fragiles ou déclassés n'est pas forcément une conséquence de la présence de *Ms* au sein d'un lot. Le dépistage sur le lot est donc important afin d'éviter d'engager des frais inutiles et de bien identifier la source du problème observé. Un dépistage de contrôle après traitement permet également de s'assurer de son efficacité (diminution de la charge bactérienne). Trois techniques de diagnostics sont possibles et complémentaires : Agglutination Rapide sur Lame (ARL), Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) et Polymerase Chain Reaction (PCR) (Gautier – Bouchardon et al., 2008). Les souches de *Ms* peuvent être isolées à partir d'échantillons cloacaux, trachéaux ou de l'albumen de l'œuf. L'isolement des souches à tropisme génital est plus difficile à effectuer que pour les souches trachéales car le pourcentage d'animaux infectés au niveau génital est souvent moins élevé qu'au niveau trachéal, et les contaminations des cultures sont plus fréquentes.

Sur le terrain, la plupart des élevages (10/12) atteints d'EAA ont effectué un dépistage vis-à-vis de *Ms*, pour confirmer la forte suspicion de présence de la bactérie au sein du troupeau. Les dépistages ont été réalisés par PCR (à partir d'écouvillonnages trachéaux ou cloacaux) ou par ARL (prises de sang). La totalité des acteurs interrogés recommandent un dépistage s'il y a des suspicions de présence de *Ms* au sein du lot. Les prix des différentes méthodes de diagnostic varient selon les laboratoires : de 0,6 à 1,4 € par échantillon pour l'ARL et de 23 à 47 € par analyse (pools de 3 échantillons en règle générale) pour la PCR. Les analyses ARL ont été réalisées en moyenne sur 15 à 20 prélèvements et les analyses PCR ont été réalisées sur un minimum de 12-15 prélèvements (soit 4-5 analyses) (Tableau 1).

2.1. Mesures de maîtrise

Traitements antibiotiques

Les principaux antibiotiques utilisés par les vétérinaires en France vis-à-vis de *Mycoplasma synoviae* en élevages de poules pondeuses sont la tylosine et l'oxytétracycline (pas de temps d'attente pour les œufs).

Des antibiotiques à base d'oxytétracycline ont été utilisés dans 70% des élevages (cinq élevages sur sept) en cages aménagées (entre un et sept traitements par lot) mais pas dans les élevages au sol. Des antibiotiques à base de tylosine ont été utilisés dans un élevage (sur cinq) au sol et trois élevages (sur sept) en cages aménagées (un traitement par lot). Les résultats des enquêtes sont unanimes : quelques jours après le début du traitement, le taux d'œufs déclassés baisse environ de moitié puis réatteint son niveau de départ, voire un taux plus important, une à deux semaines après l'arrêt du traitement.

Les antibiotiques à base de tylosine sont plus efficaces mais également plus chers : environ 3 cts par animal (soit jusque 10 fois plus chers que ceux à base d'oxytétracycline) (Tableau 1).

Adaptation des installations

La fragilité de l'apex des œufs n'a pas engendré de grosses salissures sur les installations des élevages enquêtés. En effet, neuf éleveurs ont adapté leurs installations en réduisant la vitesse du convoyeur à œuf et en laissant parfois l'eggsaver complètement ouvert (un éleveur) pendant le ramassage pour éviter un stockage important des œufs au nid. Toutefois, le temps de tri de œufs, et donc le temps de travail, a été augmenté (jusqu'à 6 h supplémentaires par jour pour les plus gros élevages) (Tableau 1).

La persistance de *Ms* ne dépassant pas une semaine dans le milieu extérieur (Christensen et al., 1994), le risque de transmission au lot suivant à travers les

effluents est faible, sauf pour les élevages en multi-âge. Les vétérinaires recommandent tout de même de vider les fientes du hangar.

Sur le terrain, un seul élevage a eu une gestion particulière des effluents du lot contaminé. Les fientes ont été désinfectées, stockées pendant 3 mois puis vendues pour une transformation en granulés ou en compost.

Nettoyage et désinfection

Sur le terrain, lors du vide sanitaire, la moitié des élevages enquêtés ont renforcé leur protocole de nettoyage suite à une contamination par *Ms*. Ces élevages réalisaient déjà un dépoussiérage et deux désinfections (dont une thermonébulisation en général) et quatre réalisaient en plus une troisième désinfection.

En système de cage aménagée, presque tous les élevages ayant modifié leur protocole ont rajouté un nettoyage des têtes de batteries et une désinfection supplémentaire. Au sol, aucun changement dans le protocole de nettoyage des bâtiments n'a été réalisé mais les techniciens et les éleveurs ont veillé à ce que les protocoles soient strictement suivis.

Les mycoplasmes, du fait de leur absence de paroi, sont généralement considérées comme des bactéries fragiles, avec une durée de survie réduite dans l'environnement (Gautier-Bouchardon, 2012). Les produits désinfectants du marché sont efficaces mais la bactérie peut persister au sein de biofilms, dans les fientes et les poussières, dans l'aliment et l'eau de boisson pendant plusieurs jours.

Il est recommandé d'effectuer un protocole de nettoyage humide et de désinfection identiques à ceux mis en place après une contamination de salmonelles en élevage en système cage. Ces étapes sont d'autant plus importantes pour les élevages fonctionnant en âges multiples. Certains points comme les jupes, les filtres à air des gaines de séchage et des ventilateurs sont essentiels, ainsi que le chaulage du site aux endroits de passage de camions et aux abords des bâtiments. Cependant, *Ms* étant peu résistant dans l'environnement extérieur (Christensen et al. 1994), l'allongement du vide sanitaire n'est pas recommandé mais ne devrait pas être inférieur à deux semaines. Le renforcement du nettoyage a engendré des coûts allant de 5 000 à 10 000 € (location de matériel, temps de personnel...) (Tableau 1).

Réforme précoce

La prise de décision d'une réforme précoce d'un lot a été réalisée au cas par cas. En effet, la variabilité de l'impact du syndrome et la situation de chaque élevage est à prendre en compte : impossibilité de valorisation des œufs (refus du centre de conditionnement, problème de transport...), âge du lot à partir duquel le taux d'œufs déclassés augmente, prix des traitements... Il donc est recommandé de

réaliser un bilan économique de la situation de l'élevage pour voir s'il est plus intéressant de réformer un lot précocement ou de continuer la production malgré la hausse du taux d'œufs déclassés. En effet, la majorité des œufs déclassés restent valorisables en casserie (1 à 11 points supplémentaires déclassés valorisables en casserie contre 1 à 6 points supplémentaires en perte totale). Seuls deux élevages enquêtés ont réformé leurs animaux une à deux semaines avant la date prévue. En cas de réforme précoce, il est également recommandé de penser à s'assurer de la disponibilité du lot suivant d'animaux pour limiter les charges et le manque à gagner liés à des bâtiments vides d'animaux.

2.3 Mesures de prévention

Vaccination

Deux types de vaccins existent et sont utilisés sur le terrain.

Les autovaccins (par injection d'une souche inactivée provenant de l'élevage, avec rappel) créent une immunité générale de l'animal pendant 20 à 30 semaines mais sans protection locale. Leur inconvénient réside dans la nécessité d'isoler la souche présente dans l'élevage. Un seul des vétérinaires contactés a utilisé ce type de vaccin et l'a jugé très efficace. Un éleveur travaillant en cages aménagées a également utilisé un autovaccin sur son troupeau et a observé une diminution du taux d'œufs déclassés de 50% d'un lot à l'autre. L'autovaccin coûte entre 8 et 13 cts d'euro / dose (manipulation comprise). Le coût total, rappel compris, revient donc de 16 à 26 cts / animal (Tableau 1).

Les vaccins vivants atténués (par goutte oculaire ou nébulisation) permettent de développer une immunité locale des voies respiratoires de la poule. Le vaccin vivant atténué MS-H (administré par instillation oculaire) a été utilisé par quatre des vétérinaires interrogés. Un effet immédiat et constant a été observé sur la durée, avec une baisse de 5 à 10 points d'œufs déclassés par rapport aux résultats des lots précédents. Six éleveurs de poules pondeuses en cages aménagées ont également utilisé ce type de vaccin pour immuniser leurs animaux. Le taux d'œufs déclassés de ces élevages a diminué jusque 5 points. Il s'agit cependant d'une vaccination lourde à mettre en œuvre car le vaccin est vendu congelé, conservé sous atmosphère particulière et doit être utilisé 2 à 3 heures après décongélation en manipulant chaque poule. Son prix peut également faire obstacle à son utilisation : conseillé à la vente entre 13 et 15 cts la dose, il peut atteindre 17 cts la dose sur le terrain. Il faut ajouter au minimum 5 cts par poule pour la manipulation (Tableau 1).

Apports alimentaires complémentaires

Des apports alimentaires complémentaires non dirigés spécifiquement contre l'infection par *Ms* ont également été apportés en cours de lot, sous forme de cures ou en utilisation quotidienne : produits hépato-protecteurs, produits calciques, vitamines, homéopathie, phytothérapie... Cinq élevages ont utilisé des produits à base de calcium pour renforcer la coquille des œufs et trois élevages ont fait des cures de vitamines.

Malgré l'absence d'effet notable sur le syndrome EAA, les éleveurs estiment que cette prévention permet de limiter les conséquences de la contamination en maintenant un taux d'œufs déclassés stable. Les vétérinaires jugent que des apports complémentaires en période fragile ne peuvent être que bénéfiques.

CONCLUSION

Sur le terrain, différentes méthodes sont mises en place en prévention ou pour tenter de réduire l'impact du syndrome EAA induit par *Ms*. Toutes ces méthodes ne sont pas forcément efficaces et leurs coûts sont variables. De simples mesures (dépistage, pratiques de ramassage, nettoyage humide et désinfection supplémentaire...) permettent de réduire l'impact du syndrome et de prévenir la contamination par *Ms*.

Il reste encore de nombreuses questions sans réponse au sujet du syndrome des œufs à extrémité de verre, et notamment sur les facteurs favorisant l'apparition du syndrome dans les élevages. En effet, tous les élevages infectés par *Ms* (environ 70 % des élevages) ne développent pas ce syndrome. Des travaux sur la caractérisation de différentes souches de *Ms* (isolées d'élevages avec ou sans EAA) sont aujourd'hui en cours à l'Anses.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'UMT Sanivol. Nous remercions le Comité National pour la Promotion de l'Œuf (CNPO), le Syndicat National des Accoueurs (SNA) et la Région Rhône-Alpes à travers le Pôle d'Expérimentation et de Progrès (PEP) avicole pour leur soutien financier.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Christensen N. H., Yavari C. A., McBain A. J., Bradbury J. M. Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on materials found in the poultry house environment, Avian Pathology. 1994. 23 : 127-143.
- Cisneros-Tamayo M., Kempf I., Chiron G., Mindus C., Balaine L., Coton J., Michel V., Gautier-Bouchardon A.V. Epidemiological survey to identify eggshell apex abnormalities (EAA) syndrome in commercial layers in France. LIII Symposium Científico de avicultura, Septembre 2016, Zaragoza, Espagne.
- Dufour-Gesbert F., Dheilley A., Marois C., Kempf I. Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. Veterinary Microbiology. 2006. 114 : 148–154.
- Feberwee A., Morrow C. J., Ghorashi S. A., Noormohammadi A. H., Landman W. J. M. Effect of a live *Mycoplasma synoviae* vaccine on the production of eggshell apex abnormalities induced by a *M. synoviae* infection preceded by an infection with infectious bronchitis virus D1466. Avian Pathology. 2009. 38(5) : 333-340.
- Gautier-Bouchardon A. V., Cisneros-Tamayo M., Ferré S., Kempf I. *Mycoplasma synoviae* et syndrome des œufs à extrémité de verre chez la poule pondeuse : état des lieux et perspectives de recherche au sein de l'ANSES Ploufragan. 2015. Assemblée générale de l'AVMA, Ploufragan, France.
- Gautier-Bouchardon A. V., Kempf I. Mycoplasmoses aviaires. Bull. Acad. Vét. France. 2008. 161(2) : 185-190.
- Gautier-Bouchardon A. V. Le syndrome des œufs à extrémité de verre chez la poule pondeuse – aspects cliniques, épidémiologiques et moyens de contrôle. Le Nouveau Praticien Vétérinaire – Elevage et Santé. 2012. 5(20) : 40 – 43.

Tableau 1 : Estimation de l'impact engendré par le syndrome des œufs à extrémité de verre pour les élevages de poules pondeuses d'œufs de consommation en fonction du type de mesure.

Nb : L'absence de valeur pour un système signifie que la méthode n'a pas été rencontrée sur le terrain lors des enquêtes.

Mesure de maîtrise/prévention			Coûts générés	
			Système cage	Système alternatif
Dépistage	ARL	15 -20 analyses	0,6 à 1,4 €/analyses	
	PCR	4-5 analyses	23 à 47 €/analyses	
Traitement antibiotique	Tylosine	50 - 100 mg / kg de poids vif	0,015 à 0,03 €/animal	-
	Oxytétracycline		1 à 10 fois < Tylosine	
Travail supplémentaire		9,67 €/h	2 à 30 h / semaine	0,25 à 4 h / semaine
Perte en œuf		3 à 15 % œufs déclassés / nb semaines / traitement / mortalité...	1 à 30 € / 100 kg œufs	0,75 à 1 € / 100 kg œufs
Nettoyage et désinfection		matériel / eau / produits	5 000 à 10 000 €	-
Réforme précoce		charges / perte de production / nb semaines / disponibilité du lot suivant / aliment...	1 à 2 semaines	-
Vaccination	Vaccin inactivé de type autovaccin	1 dose / animal - 1 rappel	0,16 à 0,26 €/animal	
	Vaccin vivant atténué	1 dose / animal - pas de rappel	0,18 à 0,23 €/animal	

Figure 1. Exemple d'œufs présentant le syndrome EAA

Source : Gautier-Bouchardon A. V. Le syndrome des œufs à extrémité de verre chez la poule pondeuse – aspects cliniques, épidémiologiques et moyens de contrôle. Le Nouveau Praticien Vétérinaire – Elevage et Santé. 2012. 5(20) : 40 – 43.



MINDUS Claire¹

MESURES EMPLOYEES SUR LE TERRAIN POUR LIMITER L'IMPACT DU SYNDROME DES OEUFS A EXTREMITÉ DE VERRE INDUIT PAR *MYCOPLASMA SYNOVIAE* EN ELEVAGE DE POULES PONDEUSES

Contexte

La prévalence de *Mycoplasma synoviae* (Ms) atteint 70% dans les élevages de poules pondeuses (Gautier – Bouchardon et al., 2015). Le syndrome « des œufs à extrémité de verre » (EAA pour Eggshell Apex Abnormalities) est décrit en France pour la première fois en 2009 – 2010 et atteint une prévalence de 7,3% en France en 2016 (Cisneros- Tamayo et al., 2016). Il se traduit par des anomalies de la coquille (fissure, cassure) à l'apex de l'œuf avec une zone de démarcation claire où la coquille est fine (Gautier-Bouchardon, 2012). Une augmentation du nombre d'œufs déclassés est constatée (œufs fragiles, mais également œufs souillés par les œufs cassés : jusqu'à 20% d'œufs déclassés).

Matériel et méthode

Un état des lieux de la gestion du syndrome a été réalisé en France entre octobre 2015 et mars 2016 avec la réalisation d'enquêtes auprès des acteurs de la filière poules pondeuses d'œufs de consommation (Figure 1).

Les questionnaires traitaient :

- de l'ampleur du syndrome EAA (date et contexte d'apparition, suivi et dépistage, taux d'œufs déclassés, conséquences pratiques, communication sur le sujet et logistique mise en place) ;
- des mesures de maîtrise de la contamination mises en place (type de mesure, occurrence, facilité de mise en place et retour sur l'efficacité) ;
- des surcoûts engendrés (perte en œufs, traitements, rajout au protocole de nettoyage et désinfection, temps supplémentaire passé sur l'élevage et perte sur les carcasses à l'abattoir).

Résultats

1. DEPISTAGE

3 techniques de diagnostics existent :

- Agglutination Rapide sur Lame
- Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- Polymerase Chain Reaction

L'augmentation d'œufs fragiles ou déclassés n'est pas forcément une conséquence de la présence de Ms : le dépistage est primordial

- Adaptation des installations : réduction de la vitesse du convoyeur à œuf, eggsaver complètement ouvert pendant le ramassage
↓
Evite les salissures mais augmente le temps de tri

- Traitements antibiotiques : à base d'oxytétracycline et/ou à base de tylosine
↓
Efficacité pendant le traitement et jusqu'à 1 à 2 semaines après puis retour à la situation initiale

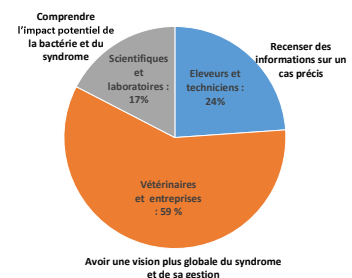
- Nettoyage et désinfection : Suivi strict ou renforcement des protocoles de nettoyage
↓
Favoriser un nettoyage humide

- Réforme précoce
↓
Au cas par cas en fonction de la situation économique de chaque élevage

Objectif de l'étude

Recenser les mesures mises en œuvre sur le terrain pour prévenir ou limiter l'impact du syndrome EAA induit par Ms en élevage de poules pondeuses d'œuf de consommation en cages aménagées ou en système alternatif.

Figure 1 : Personnes interrogées lors des enquêtes



3. MESURES DE PREVENTION

- Vaccination : autovaccins inactivés ou vivants atténués
↓
En fonction de la pression sanitaire

- Apports alimentaires complémentaires : produits hépato-protecteurs, produits calciques, vitamines, homéopathie, phytothérapie
↓
Pas d'effet notable mais permettrait de limiter les conséquences d'une contamination

Tableau 1 : Estimation de l'impact engendré par le syndrome des œufs à extrémité de verre pour les élevages de poules pondeuses d'œufs de consommation en fonction du type de mesure.

Mesure de maîtrise/prévention			Coûts générés	
			Système cage	Système alternatif
Dépistage	ARL	15-20 analyses	0,6 à 1,4 €/analyses	
	PCR	4-5 analyses	23 à 47 €/analyses	
Traitement antibiotique	Tylosine	50 - 100 mg / kg de poids vif	0,015 à 0,03 €/animal	-
	Oxytétracycline		1 à 10 fois < Tylosine	
Travail supplémentaire		0,57 €/h	2 à 30 h / semaine	0,25 à 4 h / semaine
Perte en œuf		3 à 15 % œufs déclassés / nb semaines / traitement / mortalité...	1 à 30 € / 100 kg œufs	0,75 à 1 € / 100 kg œufs
Nettoyage et désinfection		matériel / eau / produits	5 000 à 10 000 €	-
Réforme précoce		charges / perte de production / nb semaines / disponibilité du lot suivant / aliment...	1 à 2 semaines	-
Vaccination	Vaccin inactivé de type autovaccin	1 dose / animal - 1 rappel	0,16 à 0,26 €/animal	
	Vaccin vivant atténué	1 dose / animal - pas de rappel	0,18 à 0,23 €/animal	

Nb : L'absence de valeur pour un système signifie que la méthode n'a pas été rencontrée sur le terrain lors des enquêtes

Perspectives

Sur le terrain, différentes méthodes sont mises en place en prévention ou pour tenter de réduire l'impact du syndrome EAA induit par Ms. Toutes ces méthodes ne sont pas forcément efficaces et leurs coûts sont variables. De simples mesures permettent de réduire l'impact du syndrome (comme les pratiques de ramassage) et de prévenir la contamination (comme le nettoyage humide et désinfection supplémentaire) par Ms. Il reste encore de nombreuses questions sans réponse au sujet du syndrome des œufs à extrémité de verre, et notamment sur les facteurs favorisant l'apparition du syndrome dans les élevages. En effet, tous les élevages infectés par Ms ne développent pas ce syndrome. Des travaux sur la caractérisation de différentes souches de Ms (isolées d'élevages avec ou sans EAA) sont aujourd'hui en cours à l'Anses.

PUTERFLAM Julie¹

HUNEAU-SALAUN Adeline²

CISNEROS-TAMAYO Marco³

GAUTIER-BOUCHARDON Anne V.³

CHIRON Geoffrey¹

¹ ITAVI, Paris

² Anses, Ploufragan

³ Anses – Laboratoire de Ploufragan-Plouzané et Université Bretagne-Loire, Ploufragan

Financeurs



Partenaires



SITUATION SANITAIRE DES ELEVAGES DE POULETS DE CHAIR DANS L'EST ALGERIEN

Aimeur Rachida¹, Bouaziz Assia², N. Zeghilet Noureddine¹, Boussena Sabrina¹, Hireche Sana¹, Bouchoucha Brahim¹ et Bouaziz Omar¹

¹*Laboratoire GSPA, Institut des Sciences Vétérinaires, Université des frères Mentouri, Constantine 1, Algérie*

²*Institut des Sciences Vétérinaires, Université des frères Mentouri, Constantine 1, Algérie*

rachidaaimeur@yahoo.fr

RÉSUMÉ

L'objectif de cette étude est d'identifier et de déterminer les prévalences sérologiques des principales maladies rencontrées dans la wilaya de Constantine. L'étude a été menée dans 18 élevages de poulets de chair. Nous avons relevé un certain nombre de signes pathologiques d'après leur description par les éleveurs ou par nos constatations. La symptomatologie a été complétée par le diagnostic nécropsique. 98 cadavres ont été autopsiés et 15 prélèvements de sang de chaque élevage ont été réalisés, soit, au total, 270 prélèvements recueillis pour les examens sérologiques. Les diagnostics posés sur l'ensemble des cas examinés et les plus évoqués par les éleveurs dans les 18 élevages sont principalement les signes et les lésions respiratoires avec une fréquence de 63,6%. Les résultats sérologiques ont montré un taux élevé pour les infections à mycoplasmes de 33,3 % pour *Mycoplasma gallisepticum* (MG), 18,1% pour *Mycoplasma synoviae* (MS) suivi de la bronchite infectieuse avec un taux de 14,1% et de la maladie de Newcastle avec 8,2 %. L'incidence économique des principales affections rencontrées est importante, mais peut être réduite par des mesures appropriées

ABSTRACT

Health situation of broiler chicken breeds in the eastern Algeria

The aim of this study is to identify and to determinate the serological prevalence of the dominant diseases encountered in the wilaya of Constantine. The study was conducted in 18 broiler farms. We have noted a number of pathological signs according to their description by the breeders or by our findings. The symptomatology was supplemented by necropsy diagnosis. 98 carcasses were autopsied and 15 blood samples were taken from each farm, a total of 270 samples were collected for serological examinations. The diagnoses of all the cases examined and the most evoked by the breeders in the 18 farms are mainly signs and respiratory lesions with a frequency of 63,6%. The serological results showed a high rate of mycoplasma infections, with 33, 3% of *Mycoplasma gallisepticum*, 18, 1% of *Mycoplasma synoviae* followed by infectious bronchitis with a rate of 14, 1% and Newcastle disease with 8, 2%. The economic impact of affections is important and will discourage several farmers. Nevertheless these issues could be reduced by applying appropriate measures

INTRODUCTION

La consommation de la viande de volailles est en augmentation constante dans la région de l'Est Algérien pour des raisons économiques, diététiques et de festivités. Cette production a pris des proportions considérables autour des grandes agglomérations. Outre les contraintes d'ordre technique (non respect des normes d'élevage observées dans les élevages), le développement de l'élevage avicole reste assujéti à un certain nombre de contraintes sanitaires qui sont à l'origine des découragements des éleveurs. Peu de données sont disponibles, en particulier sur la situation sanitaire des volailles dans cette région. Cette étude a pour objectif de recenser les pathologies dominantes les plus rencontrées au niveau des élevages avicoles, d'identifier et de déterminer leurs prévalences sérologiques.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1 Elevages

Notre étude a porté sur 18 élevages de poulets de chair de souche Hubbard répartis sur huit communes de la wilaya de Constantine. L'effectif du cheptel des élevages variait entre 3000 et 5000 sujets. Le choix de ces élevages a été motivé par la collaboration des vétérinaires praticiens ce qui nous a permis d'effectuer de fréquentes visites. L'étude s'est déroulée du mois d'avril 2013 au mois de décembre 2013.

Sur le terrain

Les investigations ont été effectuées sur les poulets de chair. Chaque élevage a été visité une fois par semaine à partir de 20 jours d'âge (tranche d'âge où l'accès aux élevages est autorisé par les éleveurs) jusqu'à l'âge de réforme (56 jours en moyenne). Au cours des visites, les situations ont été notées. Nous avons relevé un certain nombre de signes pathologiques d'après leur description par les éleveurs en général sur l'élevage ou par nos constatations. La symptomatologie a été complétée par le diagnostic nécropsique. En effet, les poulets morts ont été acheminés au Département Vétérinaire pour un examen nécropsique. Au total, 98 carcasses ont été autopsiées (entre 3 et 7 cadavres par élevage).

Prélèvements

Pour des raisons économiques, seulement 15 prélèvements de sang de chaque élevage ont été réalisés sur les poulets dont l'âge variait de 35 jours à 49 jours. Au total 270 prélèvements ont été recueillis. Les prélèvements ont été exposés à une température ambiante, les caillots extraits et les sérums récoltés, centrifugés à 1500 tours / mn pendant 15 mn. Les sérums ont été aliquotés. 25 µl de chaque sérum ont

été dilués au 1/5 et décomplémentés à 56° C pendant 30 minutes puis conservés à 4 ° C pendant 24 à 48 heures pour réaliser le test d'agglutination rapide sur lame. Pour les tests d'inhibition d'hémagglutination et d'ELISA, les sérums ont été congelés à -20° C pour usage ultérieur.

1.2 Méthode d'analyses

- **Le test d'agglutination rapide sur lame (ARL)** a été utilisé pour la détection des anticorps sériques dirigés contre *Mycoplasma gallisepticum* (MG) et *Mycoplasma synoviae* (MS) selon la technique standardisée (Kempf, 1998) en utilisant les antigènes spécifiques du commerce : antigène MG Antigen et MS Antigen.

- **Le test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA)** pour titrer les anticorps sériques de la maladie de Newcastle selon la méthode préconisée par l'AFNOR (2000).

- **La technique immuno-enzymatique (ELISA) indirecte** a été utilisée selon le mode opératoire des kits pour la détection des anticorps contre la maladie de Gumboro, de la bronchite infectieuse et de la laryngotracheite infectieuse selon les recommandations du fabricant.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Résultats de l'autopsie

Le tableau 1 présente les symptômes et les lésions observés dans les élevages avicoles.

L'enquête effectuée au niveau des 18 élevages a montré l'importance des signes respiratoires, caractérisés par des signes de toux, jetages, éternuements associés ou non aux troubles digestifs dans 100 % des élevages avec une prédominance au niveau des élevages de la commune d'El Hamma de Beni Hamidène (vu la proximité d'un grand nombre d'élevage sous serre au niveau de ces deux communes dont le contrôle sanitaire est difficile à évaluer). Les troubles digestifs sont moins fréquents et représentés par des signes tels les diarrhées verdâtres, sanguinolentes.

La symptomatologie, souvent peu caractéristique chez les volailles, conduit donc à la compléter par le diagnostic nécropsique. Au niveau lésionnel, sur 98 cadavres autopsiés, 62 présentaient des lésions de l'appareil respiratoire, soit une fréquence de 63,3 %. Les lésions rencontrées sont représentées par des trachéites, des pneumonies évolutives, des aérosacculites allant de l'épaississement des parois à la formation de placard fibrineux des sacs aériens (figure 1), des péricardites et des hépatites à différents stades d'évolution.

Les fréquences des lésions des troubles digestifs, des troubles locomoteurs et des troubles divers observés

sont respectivement 33,6%, 6%, 3,6% et 5,1% (il est à signaler que le nombre de lésions est supérieur aux sujets autopsiés à cause des lésions associées).

Les résultats obtenus révèlent une fréquence élevée d'atteinte respiratoire. Les altérations de l'appareil respiratoire s'expriment morphologiquement par des lésions très variées. Kempf (2006) rapporte que les lésions respiratoires sont parfois plus sévères chez des oiseaux qui présentent peu de signes cliniques.

Résultats de la sérologie

Les résultats des analyses sérologiques obtenus sont rapportés dans le tableau 2. L'analyse sérologique des prélèvements réalisés dans les 18 élevages montre que toutes les maladies recherchées excepté la laryngotrachéite infectieuse, existent au niveau des élevages de la wilaya de Constantine. Les résultats sérologiques placent *Mycoplasma gallisepticum* comme l'agent étiologique le plus fréquent en matière de maladies respiratoires. En effet, la prévalence des anticorps anti - *Mycoplasma gallisepticum* varie de 23,3% à 42,3% avec une moyenne de 33,3% et confirme sa place dominante. L'infection par *Mycoplasma synoviae* occupe le second rang avec une fréquence moyenne de 18,1% avec des variations de 13,5% à 23,4% selon les élevages. La fréquence de la bronchite infectieuse varie de 0 à 23,4% avec une moyenne de 14,1 % de sérums positifs. Le taux d'anticorps de la maladie de Newcastle est de 8,1% avec des valeurs de 0 à 13,5% selon les élevages. La maladie de Gumboro est détectée dans 6,3 % des sérums avec des variations de 2,3 à 10 % selon les élevages. La laryngotrachéite infectieuse n'a été dépistée dans aucun sérum.

Le tableau 3 donne la répartition des maladies respiratoires en fonction des élevages et des communes. Les résultats sérologiques obtenus montrent que sur 18 élevages enquêtés, 16 sont positifs à la mycoplasmoses à *Mycoplasma gallisepticum*, 15 sont positifs à la bronchite infectieuse, 14 sont positifs à *Mycoplasma synoviae*, 14 sont positifs à la maladie de Gumboro et enfin 12 sont positifs à la maladie de Newcastle. Les résultats montrent que les maladies circulent dans la plupart des élevages des communes enquêtées et sont sans

doute la cause des pertes économiques dont se plaignent les aviculteurs.

La répartition des maladies révèle des associations d'infections dans les élevages, c'est pourquoi le nombre d'élevages positifs pour les maladies est supérieur au nombre d'élevages enquêtés. La présence de plusieurs anticorps différents trouvés sur un même oiseau confirme les associations des infections dans les élevages. Des observations similaires ont été rapportées par Arbelot *et al*, (1997). Les troubles respiratoires fréquemment relatés par les éleveurs ont été confirmés par l'analyse sérologique. En effet, cette étude révèle une présence dominante des infections à mycoplasmes qui constituent selon certains auteurs, des facteurs synergiques fréquents aux affections respiratoires (Villate, 2001).

Les mycoplasmes (MG, MS) interviennent dans les affections respiratoires chroniques seuls, ou le plus souvent en association avec d'autres agents bactériens ou viraux (virus de la maladie de Newcastle, virus de la bronchite infectieuse, *Escherichia coli*).

La prévalence de la bronchite infectieuse était très importante surtout à l'échelle des élevages avec un taux proche de celui de l'infection à *Mycoplasma gallisepticum*. Selon certains auteurs, elle serait aussi souvent associée à la mycoplasmoses (Levisohn et Kleven, 2000).

CONCLUSION

Cette étude nous a permis de donner une première idée de la séroprévalence des différentes maladies étudiées en élevage de poulets de chair dans la wilaya de Constantine. La mycoplasmoses est la pathologie la plus dominante suivie par la bronchite infectieuse. La mycoplasmoses est souvent incriminée en pathologie respiratoire. Dans la même lancée, nous souhaitons qu'à l'avenir, des études sérologiques associées au diagnostic microbiologique et élargies à d'autres maladies aviaires soient effectuées. Ces études devraient également permettre d'évaluer les incidences économiques de ces entités pathologiques en élevage avicole moderne afin que des moyens de lutte appropriés soient envisagés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Arbelot B., Dayon JF., Mamis D., Gueye JC., Tall F., Samb H. (1997). Enquête sur la prévalence des principales pathologies aviaires au Sénégal : mycoplasmoses, pullurose, thyphose, maladie de Newcastle, maladie de Gumboro et bronchite infectieuse. *Revue Elev. Med. Vet. Pays trop*, **50**, 197-203.
2. Kempf I. (2006). Diagnostic et contrôle des mycoplasmoses aviaires. *Le nouveau Praticien Vétérinaire Elevages et santé*, **3**, 49 -53.
3. Levisohn S., Kleven S.H. (2000). Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **19**, 425 – 442
4. Villate D. (2001). Maladies des volailles. 2^{ème} Ed., Paris: Editions France Agricole, 399 pages

Tableau 1. Description des symptômes observés et résultats d'autopsie (n=98)

Nature des troubles	Symptômes observés	Lésions observées à l'autopsie	Nombre de lésions associées ou non	Nombre d'animaux présentant des lésions	Fréquence (%)
Troubles respiratoires	Toux, Râles Eternuements Jetages	Trachéite	55	62	63,3
		Pneumonies évolutives	45		
		Aérosacculites à différents stades d'évolution	40		
Troubles digestifs	Diarrhée sanguinolente	Epaississements de la muqueuse intestinale	5	33	33,6
	Diarrhée verdâtre	Pneumonies et pleuropneumonies fibrineuses, épaissement de la muqueuse et hépatites évolutives	25		
	Diarrhée Jaune verdâtre	Distensions gazeuses intestinales et rétention biliaires	6		
	Diarrhée blanchâtre avec toux et éternuements	Trachéite	2		
Troubles locomoteurs	Amyotrophie Difficultés de déplacement	Lésions plantaires	3	3	3,6
Autres troubles		Hypertrophie de la bourse de Fabricius	3	13	5,1
		Décoloration et hypertrophie de la rate, néphrite	3		
		Conjonctivite	10		

Tableau 2. Résultats globaux de la sérologie des différentes maladies (n=270)

			Pathologies Nombre de sérums positifs (%)					
Communes	Nbre élevages visités	Nbre sérums testés	M NC	GUM	B I	Mg	Ms	LTI
Hamma Bouziane	3	45	6 (13,5)	2 (4,5)	8 (17,8)	18 (40)	9 (20)	0 (0)
Ibn Ziyad	2	30	1 (3,5)	3 (10)	5 (16,6)	7 (23,3)	5 (16,6)	0 (0)
Beni Hmidène	2	30	6 (20)	1 (3,4)	3 (10)	11 (36,6)	5 (16,7)	0 (0)
Ain Abid	3	45	3 (6,5)	1 (2,3)	4 (8,9)	19 (42,3)	7 (15,5)	0 (0)
Khroubs	2	30	3 (10)	3 (10)	7 (23,4)	8 (26,7)	6 (20)	0 (0)
Ain Nahas	2	30	0 (0)	2 (6,7)	6 (20)	10 (33,5)	7 (23,4)	0 (0)
Salah Derradji	2	30	3 (10)	3 (10)	5 (16,7)	8 (26,7)	4 (13,4)	0 (0)
Ain Smara	2	30	0 (0)	2 (2,7)	0 (0)	9 (30)	6 (20)	0 (0)
Total (%)	18	270	22 (8,1)	17 (6,3)	38 (14,1)	90 (33,3)	49 (18,1)	0 (0)

M NC: Maladie de Newcastle - GUM : Maladie de Gumboro - B I : Bronchite Infectieuse - LTI : Laryngotrachéite Infectieuse - Mg: *Mycoplasma gallisepticum* - Ms: *Mycoplasma synoviae*

Tableau 3. Répartition des maladies respiratoires en fonction des élevages et des communes

Communes	Nombre élevages visités	Pathologies Nombre élevages positifs en sérologie					
		M NC	GUM	B I	Mg	Ms	LTI
Hamma Bouziane	3	3	2	3	3	3	0
Ibn ziyad	2	1	2	2	1	2	0
Beni Hmidène	2	2	1	2	2	1	0
Ain Abid	3	2	1	2	3	2	0
Khroubs	2	2	2	2	2	2	0
Ain Nahas	2	0	2	2	2	2	0
Salah Derradji	2	2	2	2	2	1	0
Ain Smara	2	0	2	0	1	1	0
Total	18	12	14	15	16	14	0
%		66,7	77,8	83,3	88,9	77,8	0

**Figure 1.** Aérosacculite fibrinopurulente

COMPARAISON DE L'EFFET DE DIFFÉRENTS ADDITIFS ALIMENTAIRES EN PRODUCTION DE POULETS LABEL ROUGE

Pertusa Marion¹, Skiba Fabien², Godfrain Bastien¹, Guilloteau Laurence³, Cailleau-Audouin Estelle³, Chartrin Pascal³, Travel Angélique⁴, Quentin Maxime⁵

¹ITAVI -antenne de Mont-de-Marsan, 55 avenue de Cronstadt, 40000 MONT DE MARSAN

²Nutricia, 1301 Route de Haut Mauco, 40280 BENQUET

³URA, INRA, Centre INRA Centre Val de Loire, 37380 NOUZILLY

⁴ITAVI, Centre INRA Centre Val de Loire, 37380 NOUZILLY

⁵INZO°, 1, rue de la Marébaudière, 35766 SAINT GREGOIRE

pertusa@itavi.asso.fr

RÉSUMÉ

Réduire l'usage des antibiotiques en élevage est un enjeu majeur pour la filière avicole. Cet essai a pour objectif d'évaluer l'efficacité de différents additifs alimentaires à visée préventive sur les performances techniques et le statut sanitaire de poulets Label Rouge, élevés en conditions sub-optimales (18j de stockage des œufs avant incubation et un aliment démarrage subcarencé en acides aminés digestibles). Ces résultats sont comparés à ceux d'un lot témoin positif, élevé suivant des conditions optimales (3j de stockage des œufs avant incubation et distribution d'un anticoccidien) et d'un lot témoin négatif, élevé en conditions sub-optimales et sans additif alimentaire. Les effets d'un pré-starter, d'un réhydratant et la combinaison des deux produits, sont testés sur les 2 premiers jours de vie (lots D1, D2 et D3). De 7 à 12 j, les animaux de ces 3 groupes sont supplémentés avec des vitamines, oligo-éléments et acides aminés essentiels. A 15 jours, les animaux des groupes expérimentaux ont été réalotés pour constituer 4 nouveaux groupes homogènes en poids et recevant chacun un type d'additif prophylactique : huiles essentielles, symbiote prébiotiques/probiotiques, association argile/algues ou complexe acides organiques/polyphénols. Les résultats montrent qu'un stockage de 18 j des œufs avant incubation a un effet négatif sur la qualité des poussins ainsi que sur ses capacités de réponse à un stress oxydatif. En conditions sub-optimales, la distribution d'un pré-starter, au démarrage, a permis d'afficher des performances similaires au Témoin positif (effet renforcé en association avec le réhydratant). A J14, les performances des poulets ayant reçu la supplémentation en vitamines, oligo-éléments et acides aminés (J7-J12 – lots expérimentaux) étaient supérieures à celles des animaux du lot Témoin positif. Sur la phase d'élevage (de 15 à 76 jours), les résultats ne permettent pas de conclure statistiquement à un effet des additifs prophylactiques testés sur les critères de santé, de performances et d'abattage.

ABSTRACT

Comparison between several prophylactic plans of Label Rouge broiler production

Reducing the use of antibiotics is a major challenge for the poultry sector. This work aims at assessing the efficiency of several different forms of food additive on technical performances and health status of Label Rouge broilers, produced in sub-optimal conditions (eggs storage before incubation for 18 days and distribution of less digestive food with essential amino-acid deficiency). The results obtained are then compared to the ones of control groups: a positive control group reared according to optimal conditions (eggs storage before incubation for 3 days and distribution of an anticoccidial), and a negative control group reared with the same model as the test groups and without food additive. The effects of pre-starter, rehydrating, and combination of the two products are tested for the first two days of rearing. From 7 up to 12 days, animals are fed with a supplementation of vitamins, trace elements and essential amino-acid complex. On the 15th day, these same animals are mixed to form 4 new homogeneous groups. In growth period (ie. 15-76 days), 4 preventive treatments are tested: essential oil, symbiosis between prebiotic and probiotic, clay-algae association and finally an organic-acid – polyphenol complex. The (day-old) chick quality, measured according to 8 criteria, is negatively impacted by the storage duration before incubation. For the first 2 days, the pre starter effect is positive. Its usefulness is to be noticed when it is combined to the rehydrating association. The supplementation from 7 to 12 days has improved the broiler feed efficiency. For the second part of rearing (15-76 days), technical results are not significantly different regardless of prophylactic treatments.

INTRODUCTION

La lutte contre l'antibiorésistance est un enjeu de santé publique. Le plan EcoAntibio2017, lancé par le gouvernement, encourage les actions favorisant un usage raisonné des antibiotiques ainsi que la mise en place de stratégies préventives, pour réduire le risque d'affections majeures. La révision des plans de prophylaxie peut constituer une piste intéressante pour renforcer la santé des volailles et limiter l'apparition de troubles, notamment par la distribution d'additifs alimentaires.

De nombreux additifs alimentaires existent, de nature très variée, et ayant des modes d'action très différents. En effet, les réhydratants et pré starter jouent un rôle non négligeable sur le développement du poussin en palliant aux problèmes de retard dans la prise d'eau et d'aliment après l'éclosion (Ullah *et al.*, 2012 et Dibner *et al.*, 1998). Les extraits de plantes et huiles essentielles, ont des propriétés antimicrobiennes prouvées (Herdandez *et al.*, 2004). Certains auteurs ont montré un bénéfice à leurs utilisations, sur la croissance et/ou l'efficacité alimentaire chez le poulet et la dinde (Alçiçek *et al.*, 2003, Giannenas *et al.*, 2016 et Khattak *et al.*, 2014). Certains probiotiques ont également des impacts positifs sur les performances d'élevage (Xu *et al.*, 2003 et Gracia *et al.*, 2009) et sur la réduction de la flore pathogène (Xu *et al.*, 2003). Des travaux ont souligné les avantages en termes de performances techniques et de renforcement de l'immunité, à l'utilisation d'argiles dans l'aliment (Ouachem *et al.*, 2009 et Xia *et al.*, 2004) ou à la supplémentation en acides organiques, notamment chez le poulet mais aussi chez le porc (Patten et Waldrup, 1988 et Upadhaya *et al.*, 2016). Toutefois, même si de multiples bioactivités des additifs alimentaires ont été confirmées *in vitro*, la mise en évidence d'effets *in vivo* répétables, reste parfois compliquée (Hashemi *et al.*, 2012), ce qui ne permet pas toujours la comparaison entre les études (Puvaca *et al.*, 2013). L'objectif du présent essai est d'étudier l'effet de la mise en œuvre de divers additifs alimentaires sur la santé et les performances de poulets Label Rouge, élevés en conditions sub-optimales.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et élevage

1 440 poussins mâles de souche T451 N, issus du même parquet de reproducteurs (48 semaines), sont mis en essais à J0 à la station expérimentale de Nutricia. 240 d'entre eux sont issus d'œufs stockés 3 j avant la mise en incubation (lot Témoin + : T+, S3j). Les œufs restants ont subi un stockage de 18 j avant incubation (lot Témoin- : T-, S18j) afin de recréer des conditions peu favorables. Les poulets ont eu accès au parcours à 42 jours.

1.2. Prophylaxie vaccinale

Au couvoir, les animaux ont été vaccinés contre la maladie de Marek, la Bronchite infectieuse, la maladie de Gumboro et de Newcastle. Un rappel Bronchite infectieuse a été effectué en élevage à 21 j d'âge. A 4 j, tous les poussins (hormis ceux du lot T+) sont vaccinés contre la coccidiose via l'eau de boisson. Les animaux du lot T+, reçoivent un anticoccidien dans l'aliment commercial jusqu'à la fin de l'essai. Le lot T+ n'est pas vacciné, car l'anticoccidien aurait détruit les coccidies atténuées du vaccin.

1.3. Traitements expérimentaux

L'essai comprend donc 2 lots témoins :

- T+ : conditions optimales pour les œufs (stockés 3j avant incubation) et les poussins (aliment commercial équilibré et anticoccidien).

- T- : modèle sub optimal, non pratiqué sur le terrain, pour les œufs (stockés 18j avant incubation) et poussins (aliment moins concentré en acides aminés essentiels - Tableau 1).

Ces lots témoins servent de base de comparaison avec les autres lots.

Tableau 1. Composition des aliments démarrage

	Energie Métabolisable EM (Kcal/Kg)	Protéines (%)	Lysine digestible (%)	Méthionine-Cystéine digestibles (%)
Aliment T+	2 750	20	1,09	0,84
Aliment T-	2 750	20	1	0,81

1.3.1. Phase démarrage (0-14 jours)

Au démarrage, 3 programmes expérimentaux (D1, D2, D3) sont testés (8 répétitions * 320 animaux) en plus des 2 lots témoins (6 répétitions * 240 animaux, pour les lots T+ et T-). La répartition des différents lots dans la salle est réalisée de manière aléatoire afin d'éviter tout biais.

- **D1** : Aliment miette pré-starter (EM : 2750 kcal/kg ; Protéines 23% ; lysine digestible 1,3% ; 0,95% Méthionine-Cystéine digestibles) distribué pendant 2 jours,

- **D2** : Réhydratant dans l'eau de boisson : DIETAHYDRAL (association de dextrose, sel et chlorure de potassium), distribué à 3ml/L pendant 2 jours,

- **D3** : distribution conjointe de l'aliment miette pré-starter et du réhydratant pendant 2 jours.

De 7 à 12 j, l'ensemble des animaux des trois lots expérimentaux reçoivent dans l'eau de boisson à 2ml/l du PRODEVIT FORT qui est un complexe d'oligo-éléments, vitamines et d'acides aminés essentiels : association de sorbitol, mono propylène glycol, chlorure de magnésium, oligo-éléments (Zn, Cu, Mn, Fe, Se), vitamines (A, D3, E, PP, B1, B5, B6, K3) et acides aminés (lysine, méthionine) pour stimuler leur croissance.

1.3.2. Phases croissance-finition (15-77 jours)

A 15 j d'âge, les animaux des 3 lots expérimentaux (D1, D2, D3) ont été réalotés de manière à former 4 nouveaux groupes d'animaux (P1, P2, P3, P4) homogènes en poids et équilibré selon l'origine des lots démarrage. Les 2 groupes témoins restent inchangés et chacun des 4 traitements expérimentaux comportait 6 répétitions de 240 animaux en tout.

- **P1** : Association d'extraits végétaux et d'huiles essentielles, distribuée dans l'eau de boisson (AEN 350)
- **P2** : Symbiote prébiotiques – probiotiques, dans l'aliment (POULTRY STAR)
- **P3** : Association d'argile, d'algue et présence d'immuno et hépato stimulants (MFEED, distribué dans l'aliment, SEARUP STILL et DIGESTSEA, distribués dans l'eau de boisson)
- **P4** : Complexe d'acides organiques et de polyphénols distribué dans l'eau de boisson (ANTIGERM PREMIUM)

Les posologies appliquées sont celles préconisées par les fournisseurs (Tableau 2).

Tableau 2. Posologies appliquées

	Période de distribution	Concentration
P1	J14-17	Cure de 3 jours : 0,3ml/l
	J25-28	Cure de 3 jours : 0,5ml/l
	J31-77	Cure de 3 jours tous les 10 jours : 0,5ml/l
P2	J14-77	1kg/Tonne d'aliment
P3	J14-77	1kg/Tonne d'aliment
	J14-17	1ml/l
	J22-23	0,5ml/l
	J40-42	0,5ml/l
	J56-60	0,3ml/l
P4	J70-73	0,3ml/l
	J14-77	5 jours / semaine : 1ml/l

1.4. Mesures

1.4.1. La qualité du poussin

A J0, avant la répartition dans les différents parquets, une pesée individuelle ainsi qu'une notation de la qualité des poussins (Tona *et al.*, 2003) ont été effectuées sur 400 individus (200 poussins S3j et 200 poussins S18j).

1.4.2. Données zootechniques

Le poids des animaux et les consommations alimentaires ont été enregistrés chaque semaine. La mortalité a été relevée quotidiennement. Lors de l'abattage (J77), le poids moyen des carcasses par lot a été relevé.

1.4.3. Marqueurs de stress oxydatif

Des prises de sang ont été réalisées à J0 (12 échantillons/traitement) et J49 (30 échantillons/traitement) afin d'évaluer l'impact du temps de stockage des œufs avant incubation et des stratégies prophylactiques sur les capacités de l'animal à se défendre face à un stress oxydatif. Les marqueurs suivis étaient : le TAS (Total Antioxydant

Status : marqueur de capacité anti-oxydante), le TBA (ThioBarbituric Acid : marqueur d'oxydation cellulaire) et l'haptoglobine (protéine impliquée dans la réponse inflammatoire et le stress oxydatif). Les analyses ont été réalisées par l'INRA.

1.5. Analyses statistiques

L'analyse statistique des données est effectuée à l'aide du logiciel Statview®. Les différences significatives entre les groupes expérimentaux sont déterminées par une analyse de variance suivie d'un test de comparaison multiple des moyennes de Student-Newman et Keuls ($p < 0,05$). Les mortalités sont analysées par analyse de variance après transformation ArcSinus racine carré de la valeur (transformation normale).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. En phase de démarrage (0-2 jours)

A la mise en place, les poussins S18j sont légèrement plus lourds que les S3j (39,1 g vs 38,4 g - $P=0,05$). Ce léger écart pourrait être lié à une durée d'éclosion plus importante pour le S18j, réduisant ainsi leur temps de déshydratation avant l'arrivée en élevage. Concernant la notation de la qualité des poussins, 82% des individus S3j ont atteint une note maximale au test de Tona (100/100), contre seulement 54% pour les poussins S18j ($P < 0,0001$). Les poussins S3j ont obtenu une note moyenne de 98,2/100 contre 95,3/100 pour les poussins S18j. Cette différence est principalement liée une moins bonne résorption du jaune et à un ombilic moins bien cicatrisé pour les poussins S18j en comparaison aux S3j (Tableau 3). En accord avec Tona *et al.* (2003), nos résultats indiquent qu'un stockage long des œufs à couver (OAC) avant incubation altère les critères de qualité de poussin ; validant ainsi notre modèle expérimental sub-optimal.

Les Gains Moyens Quotidiens (GMQ) des lots D1, D3 et T+ sont supérieurs à celui du lot T- (moyenne de 2,97 vs 2,05g/j, $p < 0,01$). L'ajout de réhydratant seul ne permet pas de compenser les effets négatifs induits par nos conditions sub-optimales. Seule l'efficacité alimentaire du lot T- est statistiquement inférieure aux autres lots (+1,73 points, $p < 0,01$ - Tableau 4). Ces résultats restent par ailleurs en accords avec l'étude de Ullah *et al.*, 2012, qui montre l'intérêt zootechnique de nourrir les poussins avec un aliment hautement digestible, après son éclosion. Dans notre cas, l'effet est renforcé par l'addition d'un réhydratant.

Les résultats d'analyse des biomarqueurs sanguins montrent qu'à J0, les poussins S18j ont des capacités globales de réponse au stress oxydatif altérées comparés aux poussins S3j (TAS = 0,891 vs 1,547 mmol/l, respectivement pour le lot T- et T+, $p < 0,0001$). Les autres critères sont équivalents entre lots (concentration moyenne d'haptoglobine de 1,499

mg/ml). Ces résultats confortent nos observations sur la qualité de poussins et laissent percevoir les risques liés à un stockage prolongé des œufs avant incubation. L'étude de Bakst *et al.*, 2016 démontre notamment une diminution de l'expression du gène SOD2, impliqué dans le stress oxydant pour un stockage des œufs de 21 jours, mais aucun effet sur les gènes SOD3 et Gpx7.

2.2. En phase de démarrage (0-14 jours)

Entre 0-14 j, la mortalité a été faible et équivalente pour l'ensemble des lots (Tableau 4). La croissance des poulets issus des lots supplémentés (D1, D2, D3) est significativement supérieure à celle du lot T- (moyenne de 12 g/j vs 10,8 g/j ; $p < 0,01$). De même, à J14, les poids vifs des poulets de ces lots sont significativement supérieurs à ceux des 2 lots témoins (+14,3 g/animal, $p < 0,01$). Ceci s'explique par une consommation alimentaire légèrement supérieure pour les animaux supplémentés et une efficacité alimentaire équivalente entre les lots T+, D1, D2 et D3 (Tableau 4). Les poulets de ces 4 groupes affichent un indice de consommation (IC) significativement plus faible que celui du lot T- (moyenne de 1,846 vs 1,945 pour le lot T-, $p < 0,01$). Sur cette période, la supplémentation en vitamines, oligo-éléments et AAE a été favorable aux performances zootechniques, suggérant des besoins spécifiques sur cette période. Cela correspond avec des éléments repris dans l'étude de Geraert *et al.*, 2003, qui décrit un besoin plus important en AAE des volailles au démarrage.

2.3. En phase de croissance-finition (15-76 jours)

Le fait que les performances des animaux T+ et T- soient équivalentes suggère que les effets du modèle d'élevage sub-optimal ne sont plus visibles sur cette période. Quel que soit le traitement appliqué, la croissance et l'efficacité alimentaire ne sont statistiquement pas différentes entre lots. Toutefois, les poids vifs des lots P1, P3 et P4 sont très légèrement supérieurs, expliqués par une consommation journalière d'aliment plus importante (2670 g en moyenne pour les lots P1, P3 et P4 vs 2612 g en moyenne pour les lots T+, T- et P2 ; Tableau 5). Les objectifs commerciaux de croissance en poulets Labels, se situant aux alentours de 2200g à 76 j, les poids finaux de nos animaux sont nettement supérieurs ; ceci s'expliquant par les conditions favorables d'élevage en station expérimentale. A 49 j d'âge, aucune différence entre lots n'est observée sur la capacité de réponse au stress oxydatif, quel que soit le traitement et le marqueur considéré.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alçiçek A., Bozkut M., Çabuk M., 2003. South Afric. Journ. Anim. Sc., 2, 89-94.
 Bakst MR., Welch GR., Fetterer R., Miska K., 2016. Poult. Sci., 95: 1411-1417.
 Dibner JJ., Knight CD., Kitchell ML., Atwell CA., Downs AC., Ivey FJ., 1998. Applied Poult. Sci., Inc, 425-436.

2.4. Résultats d'abattage

La mesure de la couleur de la chair, révèle des niveaux classiques en poulet Label. Les animaux les plus colorés sont issus des lots T+ et P3. Les rendements carcasses sont similaires pour l'ensemble des lots, avec une moyenne globale de 66,7% (Tableau 5).

CONCLUSION

Cette étude a montré que le modèle sub-optimal testé (stockage des OAC avant incubation et aliment carencé) permet de mimer expérimentalement une situation, avec des conséquences immédiates sur la physiologie et les performances des animaux. Même si une durée de stockage uniforme des œufs sur le terrain n'est pas réaliste, le modèle de challenge testé semble pertinent pour étudier l'intérêt de stratégies prophylactiques en élevage de poulets. Notons par ailleurs, que des durées de stockage des œufs entre 15 et 18 jours peuvent éventuellement subvenir à certaines périodes de l'année.

En phase de démarrage (0-2j), la distribution d'un pré-starter, renforcée par l'association avec un réhydratant, a stimulé la croissance permettant d'afficher des performances proches des animaux élevés en conditions optimales. Entre 7 et 12 j, la supplémentation, en vitamines, acides aminés et oligo-éléments a permis aux animaux des 3 groupes expérimentaux d'afficher des performances supérieures à celles du témoin positif. Ces résultats confirment l'importance de la phase de démarrage et l'intérêt de couvrir les besoins spécifiques des animaux pendant cette période. En phase de croissance-finition, les additifs alimentaires testés n'ont pas montré d'effets significatifs sur la croissance, l'efficacité alimentaire, la mortalité et le rendement carcasse en comparaison des 2 lots Témoin. Ces résultats ne retraduisent pas de façon significative, les effets observés dans les études citées précédemment sur l'impact des additifs alimentaires en période de croissance. Néanmoins, les poids vifs les plus élevés ont été observés pour les groupes supplémentés P1, P3 et P4.

L'importance d'une bonne gestion du démarrage est ici confirmée. Le travail nécessite maintenant d'être poursuivi en conditions réelles d'élevage pour consolider ces premières données.

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été réalisés avec le soutien financier du plan Ecoantibio et de la région Aquitaine.

- Geraert PA., Mansuy E., Jakob S., Dalibard P., 2003. 5èmes Journ. Rech. Av, Tours, 26-27/03-2003.
- Giannenas I., Tzora A., Sarakatsianos I., Karamoutsios A., Skoufos S., Papaioannou N., Anastasiou I., Ioannis S., 2016. Ann. Anim. Sci., 16(3), 779-796.
- Gracia M., Esteve-Garcia E., Cachaldora P., Marubashi T., McCartney E., Medel P., Van der Aa A., 2009. Actes des 8e Journ. Rech. Av., Tours, 25-26/03/2009.
- Hashemi, S. R. et H. Davoodi. 2012. J. of Animal and Veterinary Advances 7 (2): 105-116
- Herdandez F., Madrid J., Garcia V., Orengo J., Megias MD., 2004. Poult. Sci., 83, 169-174.
- Khattak F., Ronchi A., Castelli P., Sparks N., 2014. Poultry Science, (93), 132-137.
- Ouachem D., Soltane M., Kalkil T., Mekaoussi S., Abdessemed F., Soualah Z., Berghouti F., Yakhlef I., 2009. Actes des 8e Journ. Rech. Av., Tours, 25-26/03/2009.
- Patten, J.D. & Waldroup, P.W., 1988. Poult. Sci. 67, 1178-1182.
- Puterflam J., Grontec E., Derel R., Pinsard JL., Martin D., Léorat J., 2007. Actes des 7e Journ. Rech. Av., Tours, 28-29/03/2007.
- Puvaca N., Stanacev V., Glamocic D., Levic J., Peric L., Stanacev V., Milic D., 2013. Worlds Poultry Sci. J. 69 (1): 27-34.
- Tona k., Bamelis F., De Ketelaere B., Bruggeman V., Moraes V.M.B, Buyse J., Onagbesan O., Decuypere E., 2003. Poult. Sci., 82, 736-741.
- Ullah MS., Pasha TN., Ali Z., Saima F., Khattak M., Hayat Z., 2012. Journ Animal Plant Sci., 22 (3), 1018-7081.
- Upadhaya SD., Lee KY., Kim IH., 2016. Journal of Applied Animal Resarch, 44(1), 238-242.
- Xia MS., Hu CH., Xu ZR., 2004. Poult. Sci., 83, 1868-1875.
- Xu ZR., Hu CH., Xia MS., Zhan XA., Wang MQ., 2003. Poult. Sci., 82, 1030-1036.

Tableau 3. Comparaison du score de Tona de poussins issus d'un stockage long (18J) vs un stockage court (3J) avant incubation

	Stockage 18 jours	Stockage 3 jours	p
Poids Vif	39,1 a	38,4 b	0,05
Homogénéité du poids vif	77%	75%	-
Note Moyenne (/100)	95,3 b	98,2 a	<0,0001
Poussins Note 100	54% b	82% a	<0,0001
Résorption du jaune (/12)	9,7 b	11,8 a	<0,01
Ombilic (/12)	10,3	10,9	0,06

^{a, b} Les valeurs moyennes sur la même ligne avec des lettres différentes sont statistiquement différentes entre elles ($p \leq 0,05$). NS, Non Significatif.

Tableau 4. Effets comparés des différents additifs alimentaires durant la phase de démarrage

	PV J0 (g)	PV J2 (g)	PV J14 (g)	CONSO J0-J2 (g/jour)	CONSO J0-J14 (g/jour)	GMQ J0-J2 (g/jour)	IC J0-J2	IC J0-J14	Mortalité J0-J2 (%)	Mortalité J0-J14 (%)
T+	38,4 b	44,2 b	195 b	10,1 a	21,0	2,9 a	3,554 b	1,872 b	0,52%	1,04%
D1	39,8 a	45,8 ab	206 a	8,1 bc	22,1	3,0 a	3,066 b	1,871 ab	0,78%	1,56%
D2	39,9 a	44,7 ab	207 a	8,9 b	21,6	2,4 ab	3,860 b	1,809 b	0,39%	1,56%
D3	40,2 a	46,2 a	209 a	7,8 c	22,1	3,0 a	2,594 b	1,832 b	0,00%	1,17%
T-	40,7 a	44,7 ab	191 b	10,0 a	21,0	2,05 b	4,996 a	1,945 a	0,52%	1,04%
p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,05	<0,01	<0,01	<0,01	NS	NS

^{a, b, c} Les valeurs moyennes sur la même ligne avec des lettres différentes sont statistiquement différentes entre elles ($p \leq 0,05$). NS, Non Significatif. PV, poids vif. CONSO, consommation d'aliment. GMQ, Gain Moyen Quotidien. IC, Indice de consommation

Tableau 5. Effets comparés des différents additifs alimentaires durant la phase de croissance

	PV J76 (g)	CONSO J14-J76 (g/jour)	GMQ J14-J76 (g/jour)	IC J14-J76	Mortalité J14-J76 (%)	Rendement PAC	Coloration
T+	2 604 c	110,8 ab	38,8	2,852	1,00%	67,2%	41,0 ab
P1	2 682 a	114,5 a	39,9	2,870	0,50%	66,6%	37,6 c
P2	2 619 bc	112,3 ab	38,9	2,883	2,60%	66,4%	39,5 abc
P3	2 662 ab	114,2 a	39,5	2,889	2,00%	66,6%	41,6 a
P4	2 666 abc	113,7 a	39,7	2,868	2,10%	66,8%	38,6 bc
T-	2 614 bc	109,7 b	39,1	2,807	1,60%	66,5%	37,6 c
p	<0,05	<0,01	NS	NS	NS	NS	<0,01

^{a, b, c} Les valeurs moyennes sur la même ligne avec des lettres différentes sont statistiquement différentes entre elles ($p \leq 0,05$). NS, Non Significatif. PV, poids vif. CONSO, consommation d'aliment. GMQ, Gain Moyen Quotidien. IC, Indice de consommation

BILAN D'UNE ANNEE DE VEILLE SCIENTIFIQUE SUR LES ALTERNATIVES AUX ANTIBIOTIQUES EN PRODUCTIONS AVICOLES

Dedet Vincent¹

¹ AUZALIDE SANTÉ ANIMALE – La Chouannière – Le Cannée – 35380 PAIMPONT
vDedet@invivo.edu

RÉSUMÉ

La mise en œuvre de programmes nationaux de réduction des usages antibiotiques en productions animales, en Europe et au-delà, a été suivie de l'apparition de nombreux produits dont l'allégation d'alternative partielle ou complète aux usages des antimicrobiens n'a pas toujours été évaluée scientifiquement. Les publications scientifiques rapportant des essais avec de tels produits, si elles ne sont pas aisément sélectionnées par les moteurs de recherche bibliographiques, sont pourtant nombreuses. Un outil de veille bibliographique sur les alternatives aux antimicrobiens en productions avicoles a été mis en œuvre à la mi-2015. Il réalise le criblage hebdomadaire de plus de 400 sites internet de revues scientifiques en relation avec la biologie, les productions animales et/ou la médecine vétérinaire. Il a permis d'identifier 134 articles publiés sur l'année d'observation écoulée, et de reconnaître 18 catégories de produits alternatifs. Le rythme de ces parutions est soutenu (plus de 2 par semaine en moyenne). Les produits alternatifs les plus représentés sont les probiotiques et les extraits végétaux. Les études publiées ont de une à quatre des finalités suivantes : zootechnique, sanitaire, ciblant la coccidiose/l'entérite nécrotique ou colonisation digestive. Dans tous ces cas, de 20 à 25 % des études publiées rapportent un résultat négatif (pas d'effet statistiquement significatif) vis-à-vis des marqueurs étudiés.

ABSTRACT

Overview of a bibliographic awareness service on scientific publications on alternatives to antibiotics in poultry production over a year

Since the implementation of national programmes aiming at reducing antimicrobial usage in animal production, a large number of products have been presented as partial or complete alternatives to the preventative usage of antibiotics – mostly towards enteric conditions. Some of these also claim an oxidative modulation effect, others an immune modulation effect... Scientific publications reporting on trials using such products have emerged, and reached a substantial number. A bibliographic awareness service has been implemented in July 2015. It is performed through the weekly consultation of over 400 websites of scientific journals in relation with biology, animal production and/or veterinary medicine. It allowed to identify 134 publications over the observation period (1 year) and to distinguish 18 categories of products for which trial results have been published. The frequency of such publications is sustained with more than 2 articles per week, on average. There is a dominance of publications on probiotics and plant extracts. Published studies have 1 to 3 of the following aims: zootechnical effect, sanitary effect, targeting of coccidiosis/necrotic enteritis, or gut colonisation. In all these cases, 20-25% of the published trials report on a negative result (i.e. no statistical difference was observed) towards the selected markers.

INTRODUCTION

Après l'interdiction de l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance en productions animales dans l'Union Européenne en 2006 (UE, 2006), les États membres ont progressivement mis en œuvre des politiques nationales de réduction des usages thérapeutiques (principalement préventifs) des antibiotiques. En France, le plan Eco-Antibio prévoit en particulier des objectifs qualitatifs et quantitatifs de réduction de l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire (-25 % entre 2012 et 2017, MAAF, 2012). Parmi les actions envisagées, figure l'identification et l'évaluation des « traitements alternatifs ». La fiche d'action n° 19 de ce plan, prévoit le « recensement et [une] première évaluation de la pertinence des traitements alternatifs disponibles, susceptibles de limiter le recours aux antibiotiques ». Ce travail devrait être concrétisé par un avis de l'Anses (Anses, 2012) qui sera finalisé au premier semestre 2017, et comportera un outil méthodologique d'évaluation des publications relatives à ces alternatives (Dunoyer C., comm. pers.). Un tel outil n'est actuellement pas disponible pour évaluer de la qualité scientifique d'une telle publication.

Indépendamment de cette action, une demande s'est fait jour, chez les opérateurs de productions animales, pour un suivi de cette thématique. Un outil de veille bibliographique hebdomadaire a été mis en place en ce sens.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Méthode de consultation

La requête d'articles scientifiques portant sur les alternatives aux antibiotiques en productions avicoles sur la période du 1^{er} juillet 2014 au 30 juin 2015 a été réalisée sur Pubmed, sous la forme de recherche avancée. Outre le paramétrage de la date de publication, les mots clés utilisés ont été 'alternative AND antimicrob* AND poultry'. Cette requête a fourni 18 références, dont 5 ne traitant pas d'un effet de substance alternative en élevage avicole (3 portaient sur la préservation des viandes, 1 sur l'élevage porcin et 1 sur une exploration *in vitro*). Ce qui fournit 13 publications d'intérêt sur la période considérée, et paraît faible au regard de la fréquence avec laquelle cette thématique des alternatives aux antibiotiques est évoquée dans la presse professionnelle (non scientifique). Pour obtenir un thésaurus sur cette même thématique et sur l'année suivante (1^{er} juillet 2015 au 30 juin 2016), il a été décidé de consulter, une fois par semaine, un corpus de 412 signets de sites internet de revues scientifiques ou d'organismes (Agences) d'intérêt en productions animales et santé publique vétérinaire. Chaque titre évocateur de résultats se

rapportant à une alternative aux antibiotiques en productions avicole a été sélectionné et le résumé de la publication a été analysé (les vaccins ont été délibérément exclus des catégories de produits sélectionnées en tant qu'alternatives). N'ont été retenues que les publications se rapportant à des essais réalisés *in vivo*. Il est également apparu que ces essais portent sur des espèces différentes. Enfin, selon le pays d'origine de l'essai, il est apparu que les protocoles des essais pouvaient avoir différentes finalités (non exclusives) :

- une finalité zootechnique (performances de croissance ou de ponte), pour laquelle la notion d'alternative aux antimicrobiens se rattache plus à la notion de facteur de croissance que de prévention ou de traitement ;
- une finalité immunomodulatrice (y compris vis-à-vis des capacités anti-oxydantes des sujets), pour laquelle les tests utilisés ne sont pas standardisés et varient selon les études ;
- une finalité médicale, pour laquelle une épreuve virulente a été réalisée soit avec un agent pathogène (finalité sanitaire), soit dans un modèle de coccidiose ou d'entérite nécrotique, ou encore un modèle de colonisation intestinale. Ces trois sous-catégories ont été distinguées pour plus de clarté des résultats.

Le caractère positif d'un essai était retenu lorsque le résumé de la publication correspondante faisait état d'une amélioration statistiquement significative pour la finalité considérée dans le lot recevant le(s) produit(s) testé(s).

1.2. Approche descriptive

Une catégorie a été créée pour rassembler des produits appartenant à une même famille de composés/extraits présentés comme des alternatives ; logiquement, chaque catégorie se rapporte donc à deux publications au moins. Les publications relatives à des produits ne se retrouvant que dans une publication sur la période ont été rassemblées dans la catégorie "autres".

Étant donné l'absence actuelle d'outil d'évaluation de la qualité des publications sur les alternatives aux antibiotiques, une approche descriptive a été retenue, en attendant de disposer d'un outil bibliométrique validé (au sens de Narin, 1994). Ont été distingués les articles pour lesquels le protocole visait l'une, l'autre ou plusieurs des finalités ci-dessus, et le résultat obtenu (mise en évidence d'une différence significative dans le résultat de l'essai).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Nombre d'articles

Sur la période considérée, 134 articles ont été retenus (soit 2,6 articles par semaine), dont plus du tiers (47, soit 35,0 %) étaient publiés intégralement en libre accès (voir la figure 1). Il n'a pas été noté de tendance à une augmentation de la fréquence de ces publications sur la période : la médiane (67 articles) se situant sur la seconde semaine de janvier 2016. Ce résultat confirme que la thématique des "alternatives aux antibiotiques" est particulièrement prolifique en aviculture. À titre de comparaison, la même approche sur la même période a détecté 120 publications évoquant explicitement des alternatives aux antibiotiques en production porcine, avec une tendance à l'augmentation : la médiane était atteinte en semaine 8 de 2016 (Dedet, 2017).

À titre indicatif, la requête 'alternative AND antimicrob* AND poultry' réalisée sur Pubmed pour la période allant du 1^{er} juillet 2015 au 30 juin 2016 fournit 16 références, dont 9 ne traitant pas d'un effet de substance alternative en élevage, soit 7 publications d'intérêt (contre 13 pour l'année précédente). Ce faible nombre (au regard des 134 références identifiées ici sur la même période), confirme qu'une approche scientométrique via les moteurs de recherche dédiés (Pubmed, Scopus) ne détecte qu'une proportion minime des publications sur cette thématique.

Onze des articles sélectionnés sont des revues de synthèse sur cette thématique, tout ou partiellement (par ex. méthodes non antimicrobiennes de prévention de la colonisation par *Campylobacter jejuni*, ou utilisation des phages en productions animales). Certaines de ces synthèses rapportent également des résultats d'essais.

2.2. Espèces visées

Les 134 articles sélectionnés portent majoritairement sur les poulets de chair (84,3 %). Toutefois, l'espèce *Gallus gallus* est également concernée par des publications rapportant des essais sur les poulettes (n=1) ou les pondeuses (n=14). Les canards (n=3), la dinde (n=2) et le lapin (n=1) sont également concernés.

À noter également qu'un faible nombre de publications (6/134) portent sur l'administration *in ovo* de substances dont la finalité est soit d'améliorer la croissance embryonnaire et/ou post-éclosion, soit d'induire une immunomodulation.

2.3. Catégories de produits

Dix-huit catégories de produits présentées comme des alternatives aux antibiotiques ont été distinguées (dont la catégorie 'autres'). Les probiotiques dans leur ensemble représentent la première famille objet de publications (23 % du total), toutefois, notre choix de créer une catégorie

pour les lactobacilles (12 %), une autre pour les autres bactéries (*Bacillus* sp., etc., 8 %) et les levures (3 %) ne font pas apparaître clairement ce point sur la figure 2. Les 'extraits végétaux', qui comprennent les broyats de plantes, oléorésines seuls ou en mélange, propolis, flavonoïdes, viennent ensuite (12 % des publications sélectionnées). Oligosaccharides et acides organiques sont également représentés (7 % chacun). De même, huiles essentielles et phages bénéficient d'un niveau de publication comparable (5 % chacun). La catégorie 'autres' comprend des produits tels que : oligo-éléments, phytases, LED, argiles, zéolites, flore (par transfert cloacal), poudre de moules et d'étoiles de mer, hydrolysats de protéines de saumon...

2.4. Finalité des essais publiés

Sans réelle surprise, la majorité des essais publiés portent sur une finalité zootechnique, visant à améliorer les performances des oiseaux de l'essai (voir figure 3). Dans la majorité des cas (78,2 %), l'essai a permis de mettre en évidence une différence significative sur au moins l'un des paramètres zootechniques considérés (gain moyen quotidien et/ou indice de consommation, ou nombre d'œufs pondus sur la période considérée). Le fait de présenter une visée purement zootechnique comme une alternative aux usages antibiotiques reflète clairement la localisation des essais, hors de l'UE (les antibiotiques ne sont pas autorisés comme facteurs de croissance dans l'UE). La plupart des essais ayant une autre finalité avaient un volet zootechnique ; il a alors été pris en compte dans la présente sélection. À noter toutefois que dans plus d'une publication sur cinq, le produit testé ne démontre pas d'avantage zootechnique significatif.

La finalité d'immunomodulation est mise en avant dans 27 articles, s'intéressant à une plus grande variété de stades physiologiques : les reproducteurs pour évaluation chez la descendance, l'embryon (injection *in ovo*) pour évaluation post-éclosion ou le poussin pour évaluation sur la phase de production. Il n'y a pas de modèle standard ni de marqueur éprouvé pour ces tests. L'indicateur retenu est soit l'évaluation quantitative de la transcription de cytokines, soit le dosage d'immunoglobulines post-vaccinales, soit le dosage d'IgA sécrétoires dans la muqueuse digestive, ou encore un modèle d'épreuve après injection intrapéritonéale de LPS. En lien avec la grande variété des marqueurs étudiés, il y a une plus forte proportion d'essais pour lesquels des différences significatives sont mesurées (82,0 %).

La finalité médicale, définie comme visant à démontrer que l'alternative allège d'un effet médical attendu, ne concerne que les publications pour lesquelles les animaux ont été placés en situation d'épreuve virulente, par contact ou inoculation. Douze publications rapportent de tels

essai dans le cadre de la prévention/l'atténuation de la coccidiose et/ou de l'entérite nécrotique, et 12 autres sur d'autres agents pathogènes (salmonelles, *E. coli* pathogènes aviaires), soit une finalité dite "sanitaire". Un seul essai sur les coccidioses est réalisé avec un groupe d'animaux recevant un additif anticoccidien, tandis que la moitié des essais sur les agents pathogènes Gram négatif est réalisé avec un lot témoin positif traité par un antibiotique. Dans tous les cas, un essai sur quatre ne produit pas de résultat significatif en termes de prévention ou amélioration des signes cliniques. Enfin, pour la finalité de colonisation, l'objectif des essais est soit de prévenir/retarder la colonisation des poulets par *C. jejuni*, soit de prévenir l'implantation de salmonelles chez les poussins (c'est dans ce cadre que l'implantation de flore exogène par voie cloacale a été testée). Dans ce contexte, les trois quarts des essais rapportent un succès dans le retard de colonisation par rapport à un lot témoin négatif. Le résultat (positif ou non) des essais tel que noté dans cette étude peut représenter une surestimation car seuls les résumés ont été pris en compte. D'autres biais méthodologiques ont pu être présents dans ces publications, que la lecture du texte intégral aurait pu détecter. Toutefois, une telle méthodologie, si elle est disponible pour les essais cliniques de médecine humaine

(<https://gradeopro.org/>) n'a pas encore été développée pour les essais terrain en productions animales.

CONCLUSION

La thématique des alternatives aux antibiotiques en productions avicoles est prolifique. Dix-sept catégories de produits ont été identifiées (outre ceux représentés par une seule publication). La catégorie la plus représentée est celle des probiotiques, devant les extraits végétaux. Quatre finalités sont observées parmi les essais publiés, parfois dans la même étude : effet zootechnique, sanitaire, de colonisation et de prévention/traitement de la coccidiose/entérite nécrotique. Il est intéressant de relever que dans 20 à 25 % des cas selon les finalités, des résultats négatifs sont rapportés. La prochaine publication d'un outil d'évaluation de la qualité scientifique des publications sur les alternatives aux antimicrobiens permettra d'affiner cette analyse descriptive, et de comparer les produits testés selon la fiabilité du résultat. Ces éléments constituent une base pour une revue systématique des publications sur les alternatives aux antibiotiques en aviculture.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Anses, 2012. Fiche action 19 (axe

2). http://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/documents/pdf/fiche_action_19_ANSES_cle4ecef.pdf

Dedet V. 9th Europ. Symp. Porc. Health Managem., Prague, Czech Republic, 2017. Soumis.

UE, règlement (CE) n° 1831/2003, *JOUE* L. 268 du 18/10/2003, p. 29-44. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:268:0029:0043:FR:PDF>

Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt, 2012. Plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire. <http://agriculture.gouv.fr/plan-ecoantibio-2012-2017-lutte-contre-lantibioresistance>

Narin F., Patent Bibliometrics, *Scientometrics* 30, 1, 1994

Figure 1. Évolution hebdomadaire du nombre d'articles scientifiques sur les alternatives aux antibiotiques en productions avicoles publiés du 1/07/2015 au 30/06/2016.

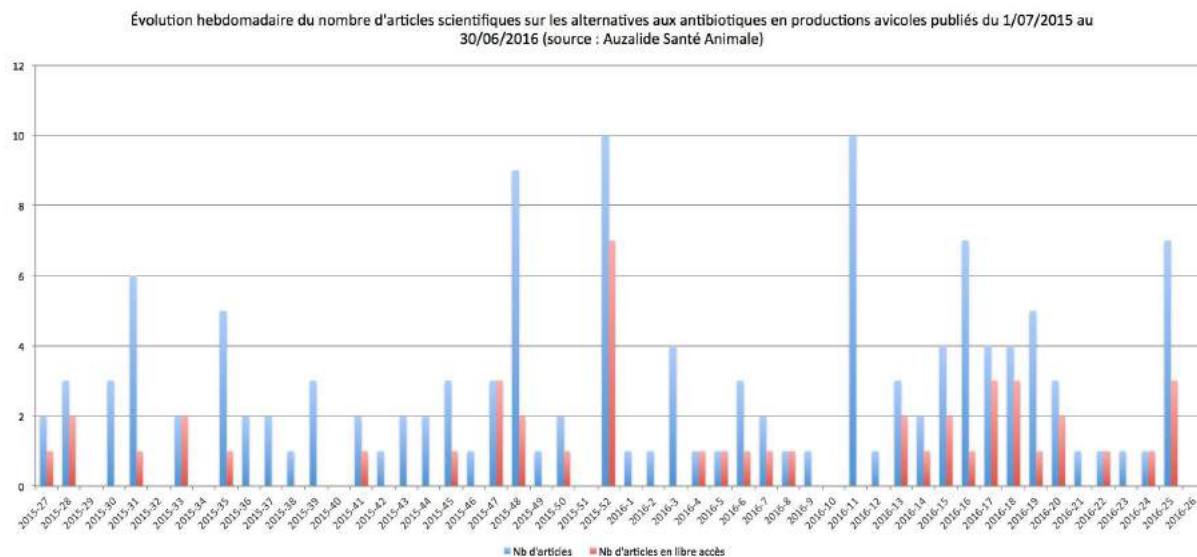


Figure 2. Répartition des articles scientifiques publiés du 1/07/2015 au 30/06/2016, par catégorie de produits présentés comme des alternatives aux antibiotiques en productions avicoles

Répartition des articles scientifiques publiés du 1/07/2015 au 30/06/2016, par catégorie de produits présentés comme des alternatives aux antibiotiques en productions avicoles (source : Auzalide Santé Animale).

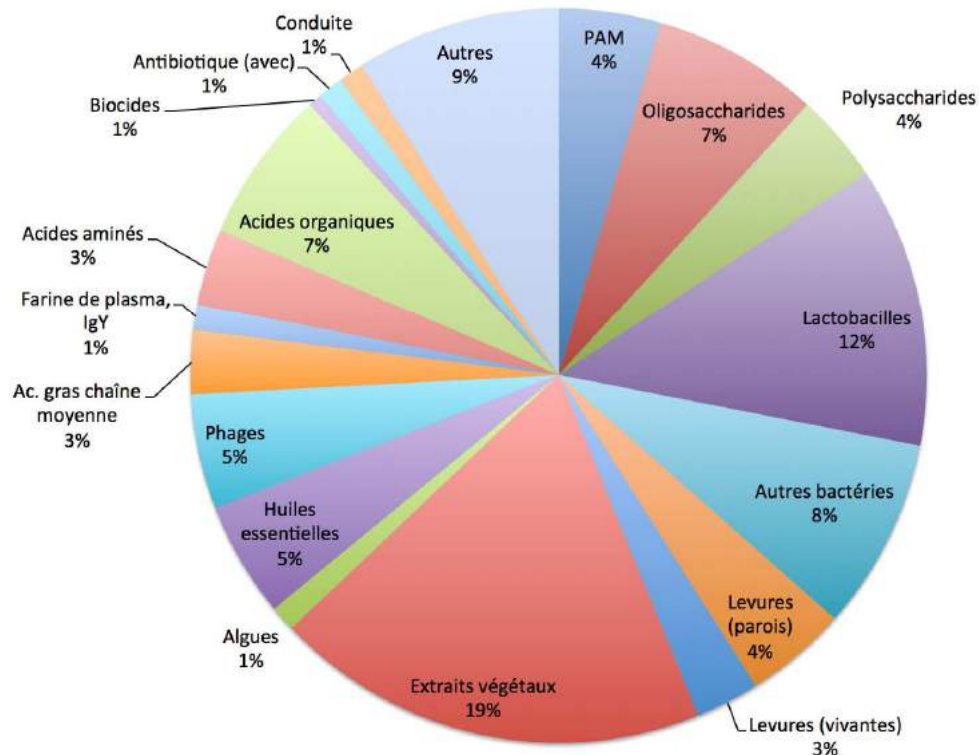
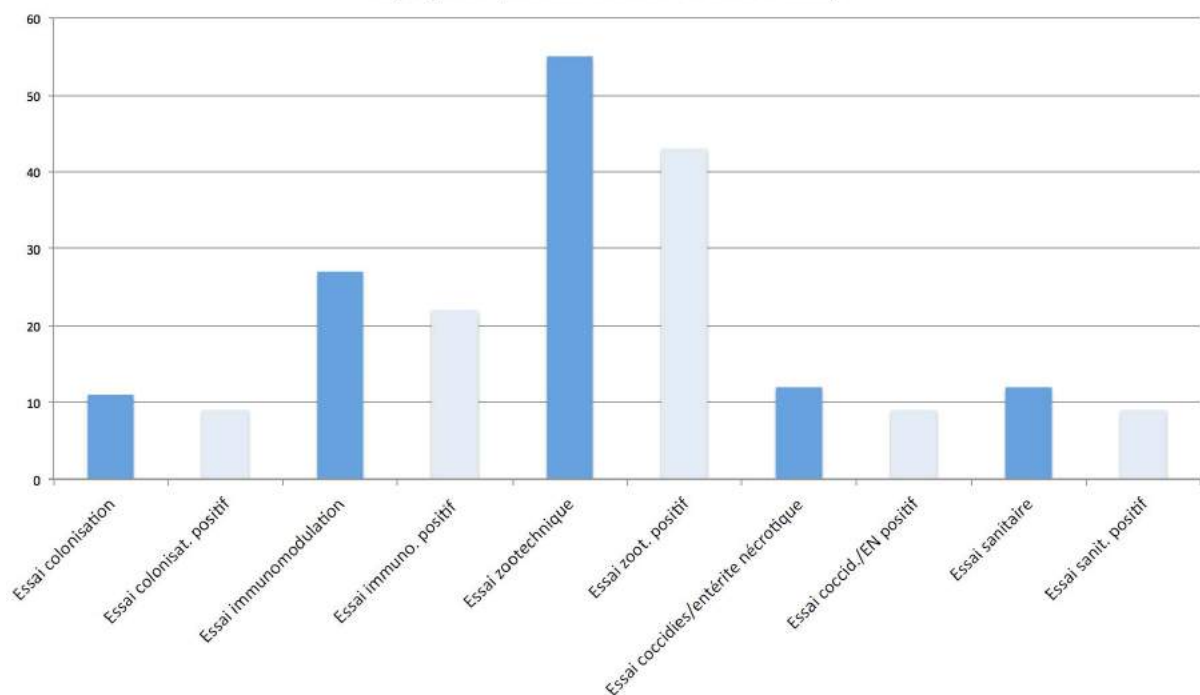


Figure 3. Finalité des essais sur les alternatives aux antibiotiques en productions avicoles publiés du 1/07/2015 au 30/06/2016 (la finalité médicale a été scindée en trois catégories : finalité sanitaire, entérite nécrotique/coccidiose et colonisation).

Finalité des essais sur les alternatives aux antibiotiques publiés entre le 1/7/2015 et le 30/06/2016 (source : Auzalide Santé Animale).



UN ETAT DES LIEUX DES METHODES DE TRAITEMENTS ALTERNATIFS UTILISES EN PRODUCTION DE POULETS DE CHAIR BIOLOGIQUES EN FRANCE

Le Bouquin Sophie¹, Guegou Victorine¹, Experton Catherine², Coton Jenna¹, Roinsard Antoine²,
Boudergue Caroline³, Filliat Christine⁴, Souillard Rozenn¹

¹ Anses Laboratoire de Ploufragan Plouzané Unité EBEAC - BP 53 - 22440 Ploufragan

² Institut Technique Agriculture Biologique - 149, rue de Bercy - 75595 Paris

³ Anses DER UERSABA – 14 rue Pierre et Marie Curie 94701 Maisons-Alfort Cedex

⁴ Cabinet vétérinaire Vétropole 26 - 320, rue du Plateau d'Ambel - 26300 Chateauneuf sur Isère

Sophie.lebouquin-leneveu@anses.fr

RÉSUMÉ

En production biologique, la gestion de la santé repose essentiellement sur une approche éco-pathologique faisant appel à des pratiques préventives et des méthodes alternatives à l'utilisation des traitements allopathiques. Dans le cadre du projet CASDAR SYNERGIES, une étude épidémiologique a été conduite en 2014/2015 sur 85 lots de poulet de chair biologiques. Cette étude a permis de réaliser un état des lieux sanitaire des élevages et des pratiques associées. Pour chaque lot enquêté, l'ensemble des produits administrés a été relevé avec le nom du produit, le motif d'utilisation par l'éleveur, l'âge des animaux et la durée du traitement. Le projet TRAIT'BIO initié à sa suite avait pour objectifs de recenser les produits utilisés, de décrire les usages et les motifs d'utilisation et de les comparer aux allégations des fabricants. Un travail de recherche systématique a été réalisé (bibliographie, web, contacts téléphoniques avec les fabricants et fournisseurs...) afin de recueillir la composition des produits à partir de leurs notices.

Les résultats de cette étude montrent qu'il existe une grande diversité de produits utilisés dans les élevages de poulets de chair biologiques avec 62 produits et 203 utilisations recensés. Quinze lots n'ont reçu aucun produit. La part de l'utilisation préventive est essentielle, avec 78.9% des usages contre seulement 21.2% pour le curatif. Peu de produits conventionnels ont été utilisés, avec seulement 6 lots ayant eu recours à ces produits pour des problèmes sanitaires. Concernant la composition des produits, si la moitié d'entre eux sont constitués d'une seule famille (huiles essentielles, extraits de plantes, médicaments homéopathiques...), les autres peuvent associer 2, 3 voire 4 familles. Les essences et huiles essentielles de plantes suivies des oligo-éléments et des minéraux en sont les composants majoritaires. Ces produits sont principalement utilisés pour éviter les problèmes digestifs, mais aussi favoriser l'ossification et la croissance.

ABSTRACT: Overview of the alternative treatment methods used in organic broiler production in France

In organic production systems, health management is based on an ecopathological approach using preventive practices and alternative methods to the use of allopathic treatments. An epidemiological study involving 85 organic broiler flocks was conducted in 2014/2015 within the project SYNERGIES. This study assessed the farms' health status and investigated associated husbandry practices. For each investigated flock, all the administered products were recorded with the name of the product, the reason for the use, the age of the chickens and the duration of the treatment. TRAIT'BIO project aims to identify the products used, to describe the uses and the reasons for use and to compare them with the manufacturer's claims. A systematic research was carried out (bibliography, web, phone contacts with manufacturers and suppliers ...) in order to collect the composition of the products from their instruction for use. The results of this study showed that there was a wide variety of products used in organic chicken production with 62 different products and 203 identified uses. Fifteen flocks did not receive any product. The share of preventive use was essential, with 78.9% of the uses compared with only 21.2% for curative treatments. Few conventional products were used, with only 6 flocks using these products for health problems. Concerning the composition, though half of them consisted of a single family (essential oils, plant extracts, homeopathic medicines ...), the others could associate 2, 3 or even 4 families. Essential oils and plant extracts followed by oligo elements and minerals were the major components. These products were mainly used to avoid digestive problems, but also to promote ossification and growth.

INTRODUCTION

En agriculture biologique, la prévention des maladies apparaît comme une règle prioritaire dans un contexte de restriction de recours aux médicaments. Cette prévention repose sur des actions sur le milieu extérieur (sol, logement), l'alimentation, l'animal lui-même (génétique...) et les pratiques d'élevage (durée d'élevage, densité de peuplement...). La gestion de la santé s'accompagne de méthodes alternatives à l'utilisation des traitements allopathiques dans laquelle le recours aux médecines alternatives est privilégié aussi bien à titre préventif que curatif. Ainsi, les élevages de volailles de chair soumis au cahier des charges de l'agriculture biologique sont incités à utiliser en priorité des thérapies dites non conventionnelles (phytothérapie, homéopathie, oligoéléments) (règlement n°834/2007). Toutefois, si ces thérapies se révèlent inefficaces pour combattre la maladie, ou si des soins sont indispensables pour épargner des souffrances aux animaux, il est possible de recourir à des médicaments vétérinaires allopathiques chimiques de synthèse, délivrés sous la responsabilité d'un vétérinaire.

Bien que la production de volailles de chair biologiques connaisse une bonne progression avec 744 élevages de poulets de chair biologiques en France en 2014 (+8% sur un an) (Agence Bio, 2016), il existe peu de données sur la gestion de la santé et du bien-être dans ces élevages et sur les méthodes de traitements alternatifs utilisés. Le projet SYNERGIE pour la santé des élevages biologiques, coordonné par l'ITAB, avait pour objectif d'acquérir des références à destination des éleveurs, des conseillers et des vétérinaires de la filière, et de fournir des leviers d'action adaptés à cette production (Experton et al, 2016). Dans le cadre de ce projet, une enquête épidémiologique conduite dans 85 élevages de poulets de chair biologiques a permis de mieux comprendre comment les éleveurs appréhendent et gèrent les problèmes de santé dans leur élevage, de manière préventive et curative (Souillard et al, 2017). A cette occasion, une base de données des produits utilisés par les éleveurs a pu être constituée. Les objectifs du projet TRAIT'BIO ont été de décrire (1) les usages des produits alternatifs par les 85 éleveurs, (2) les compositions et familles des produits utilisés et (3) les motifs d'utilisation et allégations des fabricants.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Recrutement des élevages

L'échantillon a été constitué en prenant en compte le mode de commercialisation (circuit long ou court) et la répartition régionale des élevages en France. Le

recrutement s'est basé sur le volontariat des éleveurs contactés via les organisations de production qui ont accepté de participer à l'étude, et pour les éleveurs indépendants, via les chambres d'agriculture (Bretagne, Pays de Loire, Sarthe et Drôme) et des associations de producteurs biologiques (Agrobio 35, CAB Pays de Loire). La présence de moins de 250 animaux a été un critère d'exclusion des élevages.

1.2. Données collectées

Pour chaque élevage, un questionnaire a été rempli avec l'éleveur permettant de décrire les exploitations et les pratiques d'élevage ainsi que de récolter les données sanitaires sur le lot suivi. Un seul lot a été enquêté par élevage. Pour chaque produit utilisé au cours du lot, son nom, sa nature et le type d'utilisation (visée préventive ou curative) ont été récoltés. Le motif d'utilisation de l'éleveur, l'âge des animaux et la durée du traitement ont aussi été relevés à partir des dires d'éleveurs et des documents présents sur l'élevage (registre d'élevage, fiches de bandes, notices des produits...).

1.3. La classification des produits

A partir du nom de chaque produit, un travail de recherche systématique a été réalisé afin d'obtenir la notice du produit et de connaître la composition du produit et l'allégation du fabricant. Cette recherche a été réalisée en contactant les éleveurs utilisateurs et les fabricants et en les combinant à partir des informations trouvées sur internet et dans la presse spécialisée. A partir de cette recherche systématique, un classement des produits en 9 familles a été réalisé: extrait de plantes, aromathérapie, homéopathie, oligo-éléments et minéraux, vitamines de synthèse, probiotiques, acides organiques, traitements conventionnels et biocides. Chaque produit n'étant pas toujours composé d'une seule famille, des catégories selon le nombre de familles ont été créées: catégorie « simple » pour les produits composés d'une seule famille, catégorie « complexe 2 » pour les produits composés de 2 familles et ainsi de suite.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Description des élevages visités

Un échantillon représentatif de 85 élevages de poulets de chair biologiques a été recruté et visité entre janvier 2014 et avril 2015. La moitié est localisée dans le Nord-Ouest de la France, 36% dans le Centre et le Sud Est et 16% dans le Sud-Ouest. Cette répartition est conforme à la répartition de la production nationale (Agence bio, 2014). Par ailleurs 70 éleveurs font partie d'une organisation de production et 15 éleveurs sont indépendants, ce qui est comparable aux 20%

d'éleveurs indépendants présents au niveau national. L'âge de sortie des poulets sur parcours a été en moyenne de 42 jours (25j à 53j) et la durée d'élevage de 86 jours en moyenne (81j à 100j).

2.2. Les produits utilisés

Soixante-deux produits ont été recensés et utilisés sur 70 lots, à titre préventif et/ou curatif (graphique 1). Pour 15 lots, aucun produit n'a été utilisé. Des produits ont été utilisés à titre préventif, en dehors de tout problème sanitaire, dans 60 lots, ce qui représente 160 utilisations de produits. Pour environ la moitié de ces lots (55%), un ou deux usages de produits préventifs ont été réalisés en cours d'élevage.

Des produits curatifs ont été utilisés sur 29 lots correspondant à 43 utilisations de produits. Dans la grande majorité des cas, un seul produit curatif a été administré (69% des lots traités).

Aucune différence de fréquence d'utilisation n'a été constatée entre les éleveurs indépendants et les éleveurs de groupement. L'usage préventif, qui représente 78.9% des usages est donc largement répandu chez les éleveurs et s'inscrit parmi les bonnes pratiques d'élevage, au même titre que les mesures de gestion habituelles du lot.

Parmi les 32 éleveurs confrontés à un problème sanitaire, essentiellement d'ordre digestif, six d'entre eux ont utilisé des produits conventionnels (5 antibiotiques et 1 anticoccidien). Le cahier des charges des élevages biologiques autorise en effet, « en dehors des vaccinations et des traitements antiparasitaires, un traitement à base de médicaments vétérinaires allopathiques chimiques de synthèse à des fins curatives si le cycle de vie productive est inférieur à un an », ce qui est le cas des volailles de chair (règlement n°889/2008). Peu d'éléments de comparaison sont disponibles dans la littérature. Rousset et al (2017), sur une étude conduite en élevage de poulets de chair standard fait état de 47% (22 lots sur 47) de lots traités avec un antibiotique à 10 jours contre 6% ici sur des animaux à durée de vie longue.

Enfin, il est à signaler que le recours à la vaccination est largement répandu avec 87% des lots vaccinés contre les coccidioses.

2.3. Quelle composition ?

Près de la moitié des 62 produits utilisés sont des produits simples, constitués d'une seule famille. Les autres sont constitués de plusieurs familles, et associent majoritairement 2 ou 3 familles (Graphique 2). L'aromathérapie, qui regroupe les huiles essentielles végétales et les extraits aromatiques, constitue la principale famille utilisée et se retrouve dans 48,4% des produits. Les extraits de plantes se retrouvent quant à eux dans 27,4% des produits. Les oligo-éléments et minéraux sont aussi largement utilisés et sont présents dans 41,2% des produits

(Graphique 3). Leur administration permet de fournir aux animaux un apport complémentaire à celui fourni par l'alimentation.

Que ce soit en préventif ou en curatif, les 2 familles aromathérapie et oligo-éléments-minéraux sont les plus utilisées. En préventif, l'aromathérapie et les oligo-éléments-minéraux sont présents respectivement dans 26.7% et 27.2% des usages de produits. En curatif, l'aromathérapie et les oligo-éléments-minéraux sont présents dans 30% et 29% des usages de produits.

Bien que l'usage des produits de phytothérapie soit majoritaire en filière biologique, seuls quelques médicaments vétérinaires à base de plantes sont aujourd'hui autorisés. Une autorisation de mise sur le marché (AMM) préalable à leur utilisation est en effet nécessaire (AMM en tant que médicament ou AMM allégée des médicaments à base de plantes). Les conditions nécessaires pour fournir un dossier allégé pour les demandes d'autorisation de mise sur le marché de médicaments vétérinaires à base de plantes ont été récemment évaluées par l'Anses (Anses, 2016). Trois points majeurs potentiellement bloquants ont été identifiés, maintenant un niveau d'exigence élevé. Il s'agit de l'évaluation des limites maximales de résidus des substances, de la stricte identification des substances et de la documentation des aspects innocuité et efficacité.

2.3. Quels motifs d'utilisation et allégations des fabricants ?

Les principaux motifs d'utilisation listés par les éleveurs étaient par ordre d'importance pour favoriser la croissance et l'ossification (24.6% des motifs), pour lutter contre les vers (23.6% des motifs) et contre les entérites (16.2%). Des vermifuges conventionnels ont été utilisés par 5 éleveurs. En curatif, 5 antibiotiques ont été utilisés pour traiter 2 entérites nécrotiques, 2 arthrites à staphylococcus, et une mortalité avec virus Gumboro BI, ainsi qu'un anticoccidien pour traiter une coccidiose.

Si l'on s'intéresse aux allégations des fabricants spécifiées sur les notices des produits utilisés, l'allégation la plus fréquente est de favoriser la croissance, le démarrage et l'ossification pour 63% des utilisations de produits. Les autres allégations représentent moins de 6% des utilisations de produits, comme l'atténuation des réactions au stress et les produits à visée digestive.

CONCLUSION

L'axe 2 du plan écoantibio prévoit le développement d'alternatives permettant de limiter le recours aux antibiotiques. Cette démarche est depuis longtemps ancrée en filière biologique, filière dans laquelle la gestion de la santé des cheptels repose essentiellement sur une approche éco-pathologique qui fait appel à des pratiques préventives et des méthodes alternatives à

l'utilisation des traitements allopathiques. Cette étude a permis de décrire les pratiques et les méthodes utilisées dans 85 élevages de poulets biologiques. Une grande majorité (82%) d'éleveurs utilisent des produits, essentiellement à titre préventif, en complément des mesures de gestion sanitaire de leurs lots. Une très large gamme de produits différents est utilisée dans ces élevages, essentiellement pour favoriser la croissance, le démarrage et l'ossification. En termes de composition, la part de la phytothérapie (aromathérapie et extraits de plantes) qui se retrouve dans 75.8% des produits est largement prédominante. Ces premières données justifient la nécessité de créer un observatoire des pratiques d'usage des plantes. Il permettrait de faire remonter les informations des utilisateurs de produits à base de plantes pour la

gestion de la santé animale qui ne sont pas commercialisés en tant que médicaments vétérinaires.

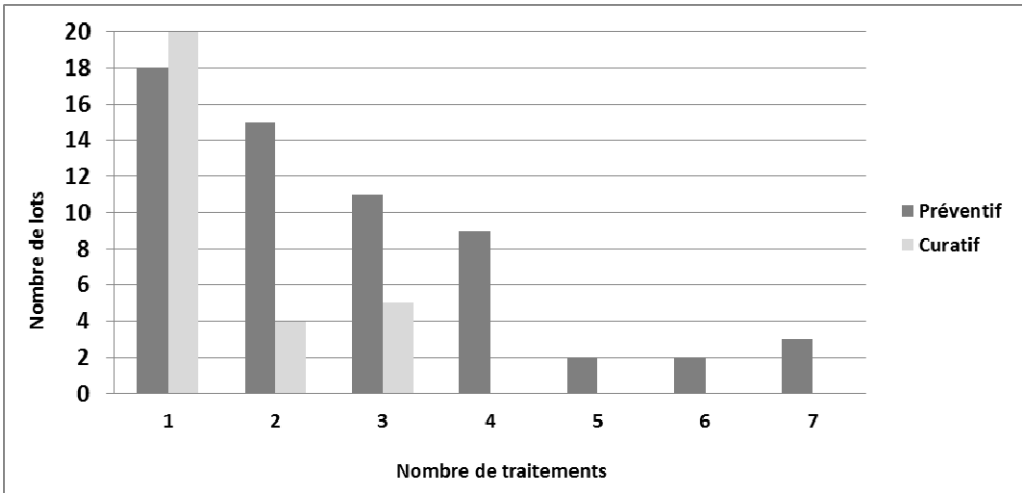
REMERCIEMENTS

Ce projet a été financé par le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt dans le cadre de la mesure 19 du Plan Ecoantibio 2017 qui vise à développer des méthodes alternatives permettant de limiter le recours aux traitements antibiotiques dans les élevages. Nous remercions les éleveurs et les organisations de production pour leur participation à l'étude.

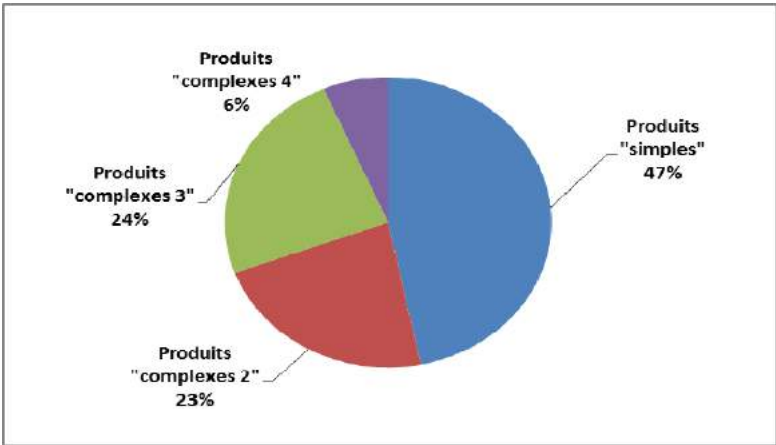
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agence bio. 2014 et 2016. Les filières avicoles biologiques. Site internet agencebio
 Experton C., et al, 2016. Tema 39 (8pages)
 Souillard R. et al, 2017, douzièmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Tours.
 Rousset N. et al, 2017, douzièmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Tours.
 Règlement CE n°834/2007 de la commission du 28 juin 2007
 Règlement CE n°889/2008 de la commission du 5 septembre 2008.
 Anses, 2016. Avis Saisine n° 2014-SA-0081

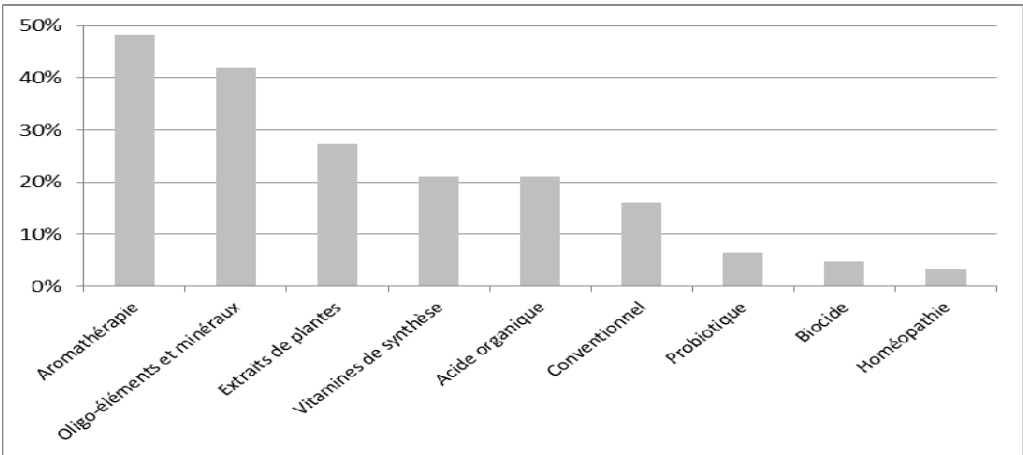
Graphique 1. Répartition des usages de produits préventifs et/ou curatifs par les 70 éleveurs utilisateurs



Graphique 2. Répartition des 62 produits selon leur catégorie



Graphique 3. Répartition des familles présentes dans les 62 produits



Le Bouquin Sophie¹, Guegou Victorine¹, Experton Catherine², Coton Jenna¹, Roinsard Antoine², Boudergue Caroline³,
Filliat Christine⁴, Souillard Rozenn¹

¹ Anses Laboratoire de Ploufragan Plouzané Unité EBEAC - BP 53 - 22440 Ploufragan

² Institut Technique Agriculture Biologique - 149, rue de Bercy - 75595 Paris

³ Anses DER UERSABA - 14 rue Pierre et Marie Curie 94701 Maisons-Alfort Cedex

⁴ Cabinet vétérinaire Vétropole 26 - 320, rue du Plateau d'Ambel - 26300 Chateaufort sur Isère



CONTEXTE ET OBJECTIFS

En agriculture biologique, la prévention des maladies apparaît comme une règle prioritaire dans un contexte de restriction de recours aux médicaments. Cette prévention repose sur des actions sur le milieu extérieur, l'animal lui-même et les pratiques d'élevage. La gestion de la santé s'accompagne de méthodes alternatives à l'utilisation des traitements allopathiques dans laquelle le recours aux médecines alternatives est privilégié. Ainsi, les élevages de volailles de chair soumis au cahier des charges de l'agriculture biologique sont incités à utiliser en priorité des thérapies dites non conventionnelles (phytothérapie, homéopathie, oligoéléments) (règlement n°834/2007).

Les objectifs du projet TRAIT'BIO sont de décrire (1) les usages des produits alternatifs en production de volailles de chair AB, (2) les compositions et familles des produits utilisés et (3) les motifs d'utilisation et les allégations des fabricants.

COLLECTE ET ANALYSE DES DONNÉES

RECRUTEMENT DES ÉLEVAGES

- ✓ 85 élevages de poulets AB répartis au niveau national
- ✓ 80% circuit long (n=70 élevages) et 20 % circuit court (n=15)
- ✓ 250 animaux minimum
- ✓ Éleveurs volontaires

RÉCOLTE DES DONNÉES

- ✓ Questionnaire sur les pratiques d'élevage et les préoccupations sanitaires
- ✓ 1 lot par élevage
- ✓ Description des produits et de leurs modalités d'utilisation
- ✓ Recherche systématique complémentaire sur la notice du produit, sa composition et les allégations du fabricant

CLASSIFICATION DES PRODUITS SELON LEUR COMPOSITION

Famille
Extraits de plantes
Aromathérapie
Homéopathie
Oligoéléments
Vitamines de synthèse
Probiotiques
Acides organiques
Traitements conventionnels
Biocides

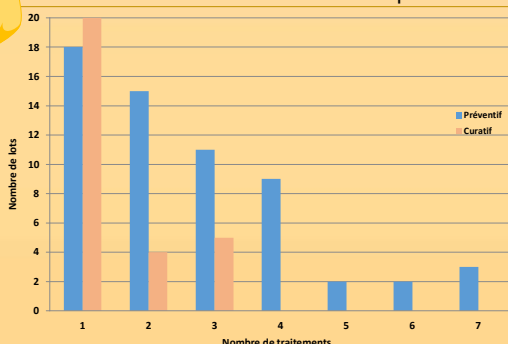
- ✓ 9 familles identifiées
- ✓ 4 catégories de produits

catégorie	
Simple une seule famille de produits	Complexe 3 3 familles de produits
Complexe 2 2 familles de produits	Complexe 4 4 familles de produits

RÉSULTATS

Quels usages?

- ✓ 62 produits différents recensés
- ✓ 15 lots sans aucune utilisation de produits



Répartition des 203 usages de produits dans les 70 lots utilisateurs

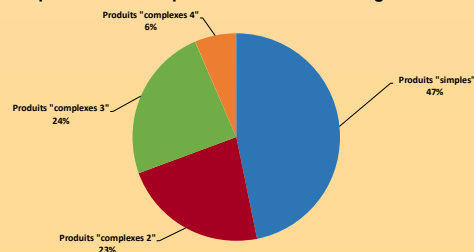
- ✓ Utilisation préventive largement majoritaire (160 utilisations soit 79% des usages)
- ✓ Produits curatifs utilisés sur 29 lots (43 utilisations)
- ✓ Recours à la vaccination contre la coccidiose largement répandu (87% des lots)

Quels motifs d'utilisation?

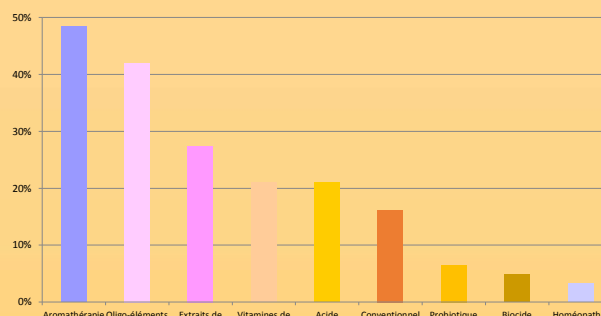
- ✓ Favoriser le démarrage, la croissance et l'ossification
- ✓ Agir contre les vers
- ✓ Lutter contre les entérites

Quelle composition?

Répartition des 62 produits selon leur catégorie



- ✓ Essentiellement des produits simples composés d'une seule famille



Répartition des familles présentes dans les 62 produits

- ✓ L'aromathérapie est la principale famille utilisée
- ✓ Part importante des oligo-éléments et minéraux

CONCLUSION

En filière biologique le recours aux traitements alternatifs à l'utilisation d'antibiotiques est largement répandu. Leur usage préventif est majoritaire chez les éleveurs de poulets de chair et s'inscrit parmi les bonnes pratiques d'élevage, au même titre que les mesures de gestion habituelles du lot. Une très large gamme de produits différents est utilisée dans ces élevages, essentiellement pour favoriser la croissance, le démarrage et l'ossification. La part de la phytothérapie (aromathérapie et extraits de plantes) est essentielle, alors que peu de produits vétérinaires à base de plantes disposent à l'heure actuelle d'une AMM.

EFFET D'UN PROBIOTIQUE SUR LES PERFORMANCES ET LA COCCIDIOSE DU POULET DE CHAIR MALE

A. Faouën¹, C. Tenier¹, G.F. Matthis², and D. Petri³

¹ *Biomin France, 5 rue Jean Rostand 22440 Ploufragan*

² *Southern Poultry Research, 96 Roquemore Road, Athens, GE, USA*

³ *Biomin Holding GmbH, Erber Campus 1, 1313 Getzersdorf, Austria*
anaelle.faouen@biomin.net

RÉSUMÉ

L'objectif de cet essai était d'évaluer et de comparer les effets d'un probiotique et de la salinomycine sur les performances et la coccidiose de 360 poulets mâles Cobb500 élevés jusqu'à 42 jours. Les oiseaux ont été aléatoirement répartis dans 4 groupes de 90 individus logés dans 3 cases et recevant un aliment standard du commerce. Le groupe témoin négatif (TN) n'a pas été contaminé par *Eimeria*. Le groupe témoin positif (TP) et les groupes expérimentaux ont été contaminés au jour 15 avec respectivement 75 000, 25 000 et 75 000 oocystes d'*Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* et *Eimeria tenella*. Le groupe SAL a reçu de la salinomycine sodique (Sacox®, Huevepharma Inc., Peachtree City, GA, USA) avec une dose de Salinomycine de 66 mg/kg d'aliment. Le groupe PS a reçu un probiotique multi-souches spécifique à la volaille (PoultryStar®, Biomin Holding GmbH, Getzersdorf, Austria) à 1 g/kg d'aliment. Aux jours 21 et 42, trois oiseaux par case ont été sélectionnés et euthanasiés afin de noter les lésions de coccidies au début et milieu de l'intestin et au niveau des caecums. La note 0 correspond à l'absence de lésion et 4 à la présence de lésions sévères. Au jour 21, la qualité de la litière est notée dans chaque case. La note 0 correspond à une litière sèche et friable et 5 indique une litière de mauvaise qualité. Dans chaque case, des échantillons fécaux ont été prélevés hebdomadairement afin d'évaluer le nombre d'oocystes. Les données ont été analysées par ANOVA en utilisant la GLM de SPSS (IBM SPSS 19, IBM Corp., Armonk, NY). Au jour 42, le gain de poids de TN était supérieur ($p < 0,05$) à celui de TP, les autres traitements étant intermédiaires. L'indice de consommation de TP était supérieur ($p < 0,05$) à ceux des autres traitements. Celui de PS était similaire à celui de SAL, mais seul SAL avait un indice de consommation statistiquement équivalent à TN. Les lésions au début et au milieu de l'intestin, la qualité de la litière et le nombre cumulé d'oocystes fécaux étaient plus faibles ($p < 0,05$) pour TN que pour TP, les autres traitements étant intermédiaires. Comme PS avait des performances similaires à SAL, il semble possible d'utiliser des probiotiques pour réduire l'incidence et la sévérité des coccidioses.

ABSTRACT

Effect of a probiotic on performance and coccidiosis in male broiler chickens.

The objective of the trial was to evaluate and compare the effects of PoultryStar® and Salinomycin as feed additives on performance and coccidiosis control in male broilers raised to 42 days of age. The study consisted of 360 day-old Cobb500 male broiler chicks randomly allocated to four groups, 90 birds per group, each housed in three replicate pens receiving standard commercial diet. Control groups were not supplemented with feed additive, with negative control (NC) not challenged with *Eimeria*, versus positive control (PC) challenged on day 15 with approximately 75.000, 25.000 and 75.000 of *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* and *Eimeria tenella* oocytes, respectively. Treatment groups supplemented with coccidiostat (SAL) and probiotic (PS) were equally challenged as PC, but received either Salinomycin sodium (Sacox®, Huevepharma Inc., Peachtree City, GA, USA) with an effective Salinomycin dose of 66 mg/kg of feed, or a multi-species host specific probiotic (PoultryStar®, Biomin Holding GmbH, Getzersdorf, Austria) at 1 g/kg of feed, respectively. On days 21 and 42, three birds per pen were selected, euthanized and examined for the evaluation of coccidiosis lesion scores in upper intestine (IT), central IT and ceca between 1 and 4, with 0 being no visible lesions and 4 indicating severe lesions visible. On day 21, pen litter scores were assessed, with 0 being dry, friable litter and 5 indicating poorest litter quality. Oocyst shedding was assessed in weekly collected fecal samples per pen. Data were analyzed by ANOVA using the GLM procedure of SPSS (IBM SPSS 19, IBM Corp., Armonk, NY). Day 42 body weight gain was highest ($P < 0,05$) in NC compared with PC, other treatments being intermediate. Feed conversion was least efficient ($P < 0,05$) in PC treatment comparing with all other treatments, with PS birds performing similar to SAL, but only SAL performing equal to NC. In upper and central IT as well as litter score and cumulative fecal oocyst count, NC was significantly lower ($P < 0,05$) compared to PC, with other treatments being intermediate. As PS supplemented birds performed similar to SAL supplemented animals, it appears possible to utilize probiotics to reduce incidence and severity of coccidiosis.

INTRODUCTION

La coccidiose est une maladie entérique causée par le développement et la reproduction de plusieurs espèces de protozoaires *Eimeria*. Le poulet est l'hôte de 7 espèces dont les trois principales sont *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* et *Eimeria tenella* (Dalloul & Ritz, 2016). Chaque espèce a la capacité d'infecter une partie différente de l'intestin. En effet, *Eimeria acervulina* se développe principalement dans le duodénum, *Eimeria maxima* dans la partie médiane de l'intestin et *Eimeria tenella* dans les caecums (Chapman, 2014). Ce parasite se développe dans l'intestin et impacte négativement l'intégrité de l'intestin. Chez le poulet, *Eimeria* dégrade l'intestin augmentant sa sensibilité à d'autres maladies telles que les entérites non spécifiques ou nécrotiques et réduit la capacité de cet organe à absorber les nutriments (Gino Lorenzoni, 2010). Actuellement, les méthodes de lutte utilisées sont principalement l'utilisation d'anticoccidiens et la vaccination anticoccidienne des lots. Le coût des traitements et les effets de la maladie sur la santé des animaux coûtent chaque année 3 milliard \$US à l'industrie mondiale avicole (Dalloul and Lillehoj, 2006). Malgré l'efficacité avérée des anticoccidiens, la mise en évidence d'une résistance des espèces *Eimeria* aux anticoccidiens (Chapman, 1997) et les discussions actuelles au niveau européen concernant la disparition éventuelle des additifs coccidiostatiques obligent la filière à se tourner vers la vaccination ou vers des solutions alternatives.

L'objectif de cette étude est d'évaluer et de comparer les effets d'un probiotique et d'un anticoccidien sur les performances et la coccidiose de poulets mâles élevés jusqu'à 42 jours.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Animaux et traitements

Un total de 360 poulets mâles Cobb500, d'un jour d'âge, ont été aléatoirement répartis dans 4 groupes de 90 individus logés dans 3 cases de 30 sujets. Tous les animaux ont reçu un aliment standard du commerce et de l'eau *ad libitum*. Le groupe témoin négatif (TN) a reçu l'aliment sans additif, sans traitement et sans contamination. Le groupe témoin positif (TP) a été contaminé avec un mélange de plusieurs espèces d'*Eimeria* et a reçu l'aliment sans additif ni traitement. Le groupe salinomycine (SAL) a été contaminé et a reçu 66 mg de salinomycine/kg d'aliment. Enfin le groupe probiotique (PS) a été contaminé et a reçu 1 kg/t de probiotique.

Au jour 15, tous les animaux à l'exception de ceux du groupe TN ont été contaminés avec respectivement environ 75 000, 25 000 et 75 000 oocystes d'*Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* et

Eimeria tenella mélangés à l'aliment. Toutes les souches utilisées dans cet essai ont été isolées d'exploitations commerciales américaines en 2012. Pour chaque espèce, la dose a été sélectionnée afin d'induire une coccidiose modérée. Les oocystes ont été regroupés pour former un volume total de 550 ml. Chaque inoculum de 30 ml a été introduit sous forme liquide à l'aliment des cases contaminées. Ainsi, l'aliment contenant les oocystes a été immédiatement consommé après l'application, évitant la dessiccation et donc l'inactivation des oocystes.

Le probiotique utilisé est un probiotique multi-souches, spécifique à la volaille (PoultryStar – BIOMIN GmbH, Herzogenburg, Autriche). Il est constitué de $5,00 \times 10^{11}$ UFC/kg de souches de *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus salivarius* et d'*Enterococcus faecium*.

1.2. Paramètres mesurés et analyses statistiques

Tous les oiseaux sont restés sous observation pendant 42 jours au cours desquels ils ont été inspectés deux fois par jour. Au cours de ces inspections, l'état sanitaire général des animaux a été vérifié et enregistré. Le nombre d'oiseaux retrouvés morts au cours de l'étude a été noté quotidiennement. Les oiseaux ont été autopsiés et n'ont pas été remplacés. Le numéro de la case, la date de la mort, le sexe, le poids et le diagnostic ont été enregistrés. L'ingestion, le poids vif et l'indice de consommation (IC) ont été déterminés par case toutes les semaines. Le poids des animaux a été mesuré par case au jour 0 et hebdomadairement.

Au 21^{ème} jour, trois animaux de chaque case ont été sélectionnés de manière aléatoire et euthanasiés. La présence et la sévérité des lésions de coccidioses ont été évaluées dans la région haute, médiane et caecale de l'intestin. Pour cela, la grille de notation de Johnson and Reid (1970) allant de 0 à 4 a été utilisée avec 0 correspondant à un état normal et 4 indiquant une sévère infection. Les animaux retrouvés morts n'ont pas été pris en compte dans le score de lésions.

Au 21^{ème} jour, la qualité de la litière a été évaluée à l'aide d'une grille de notation allant de 0 à 5 avec 0 correspondant à une litière sèche et friable dans toute la case; 1 à une litière majoritairement sèche avec quelques croûtes autour des pipettes et des mangeoires; 2 à une litière globalement acceptable mais avec certaines zones de copeaux humides; 3 à une litière de mauvaise qualité avec une proportion importante de zones humides ou pâteuses; 4 à une litière de qualité non acceptable – litière humide ou pâteuse avec peu de zones sèches restantes et 5 correspondant à une litière humide et détrempée sans aucune zone sèche restante.

Aux jours 21, 28, 35 et 42, dix échantillons de fèces frais ont été prélevés dans chaque case afin d'évaluer la quantité d'oocystes dans les fientes. Il n'y a pas eu de distinction faite entre les fientes intestinales et les vidanges caecales. Les échantillons de chaque case ont été rassemblés pour former un pool qui a ensuite été placé dans un sac plastique hermétique. Les échantillons ont été homogénéisés et stockés à 4°C jusqu'au comptage. Après dilution, le nombre d'oocystes par gramme de fèces a été évalué grâce à un microscope avec une cellule de numération MacMaster.

Les données à distribution normale ont été analysées par ANOVA en utilisant la procédure GLM de SPSS. La case est l'unité expérimentale pour l'ingestion et l'IC, tandis que pour le poids vif chaque animal est l'unité expérimentale. Les moyennes des traitements montrant des différences significatives à l'ANOVA ont été comparées grâce à la méthode de Tukey. Pour les données n'ayant pas de distribution normalisée ou si les valeurs n'étaient pas continues, un test non paramétrique tel que Kruskal Wallis a été utilisé.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Résultats

Les résultats obtenus (Tableau 1) montrent que le poids vif à J42 du groupe TP est significativement inférieur au poids vif du groupe TN ($P \leq 0,05$). Les poids vifs des groupes Sal et PS sont similaires et ne diffèrent pas significativement du poids vif du groupe TP ni du groupe TN ($P \geq 0,05$). Les indices de consommation des groupes Sal et PS sont similaires ($P \geq 0,05$) et sont tous deux significativement inférieurs à l'IC du groupe TP ($P \geq 0,05$).

La mortalité ne diffère pas significativement entre tous les groupes expérimentaux ($P \geq 0,05$). Une légère augmentation de la mortalité a été observée deux semaines après la contamination et la dernière semaine de l'étude. Dans certains cas, la mortalité était associée à la coccidiose mais pas uniquement ; en effet dans d'autres cas elle pouvait être associée à la présence de *Clostridia*.

Sur le Tableau 2, on observe que la concentration cumulative et la concentration à J21 en oocystes du groupe TP sont significativement supérieures aux concentrations du groupe TN ($P \leq 0,05$). Ces concentrations sont équivalentes entre les groupes SAL et PS et ne diffèrent pas significativement des groupes TP et TN ($P \geq 0,05$). Au jour 28, la concentration du groupe SAL est significativement inférieure à celle du TP ($P \geq 0,05$).

Aux jours 35 et 42, les concentrations entre tous les groupes sont similaires ($P \geq 0,05$).

Les notes des lésions intestinales dans la région haute et la région médiane de l'intestin du groupe TN sont significativement inférieures aux notes du groupe TP ($P \leq 0,05$). Celles des groupes TP, SAL et PS ne sont pas significativement différentes ($P \geq 0,05$). De même, les scores des groupes TN, SAL et PS ne diffèrent pas significativement ($P \geq 0,05$). Au niveau des caecums, les notes de lésions sont en moyenne de 2,22 pour le groupe TP et PS et de respectivement 0,22 et 0,89 dans le groupe TN et SAL. Cependant, les différences observées entre les moyennes ne sont pas significatives ($P \geq 0,05$).

Sur la Figure 1, on observe que la note de litière à J21 du groupe TP est significativement supérieure à la note du groupe TN ($P \leq 0,05$). Entre les groupes TP, PS et SAL et entre les groupes TN, PS et SAL, les notes ne sont pas significativement différentes ($P \geq 0,05$).

2.2. Discussion

L'IC des oiseaux traités avec le probiotique était significativement plus faible que celui des animaux contaminés qui n'ont pas reçu de probiotique ou de salinomycine mais équivalent à celui des animaux contaminés recevant de la salinomycine. De même, la quantité globale d'oocystes dans les fèces des animaux traités avec le probiotique est similaire à celle des animaux traités avec la salinomycine. De plus, les scores de lésions intestinales au jour 21 des animaux contaminés recevant le probiotique ne sont pas significativement différents de ceux des animaux contaminés recevant la salinomycine notamment dans la partie supérieure de l'intestin et au milieu de l'intestin.

Concernant les lésions intestinales, seulement trois oiseaux par case ont été analysés ce qui explique l'importante variation individuelle entre les animaux. Le protocole expérimental de cette étude n'a pas permis d'observer des différences significatives au niveau des caecums. Une étude avec davantage de répliques permettrait de vérifier si les lésions intestinales au niveau des caecums sont statistiquement différentes entre les groupes expérimentaux.

Une des limites de cette étude est la présence d'oocystes dans les fèces du témoin négatif. Toutes les mesures possibles ont été prises en compte pour éviter la contamination et pour maintenir le groupe témoin négatif indemne de coccidies. Cependant, ceci fut difficile à cause de la nature omniprésente des souches d'*Eimeria*, ce qui confirme l'importance d'utiliser une méthode efficace de contrôle de la maladie. De plus, la méthode de contamination utilisée visant à infecter les animaux au travers de

l'aliment est une méthode qui demande moins de temps de travail et qui est moins stressante pour les animaux qu'une infection par gavage oral. Cependant, avec cette méthode, il est moins probable que tous les animaux reçoivent la même quantité d'oocystes. Ceci peut donc expliquer la forte variation d'excrétion d'oocystes observée entre les cases. Malgré tout la différence évidente entre les groupes contaminés et non contaminés confirme la validité du modèle.

Cette étude confirme les résultats obtenus au cours d'études précédentes. Par exemple, Giannenas et al. (2014) ont comparé l'effet d'un probiotique appliqué dans l'eau ou dans l'aliment et l'effet du lasalocide sur les performances, la morphologie de l'intestin et la microflore de poulets infectés par 3 souches d'*Eimeria*: *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* et *Eimeria tenella*. Le probiotique utilisé était le même que celui utilisé dans notre étude. L'évaluation des lésions intestinales, du nombre d'oocystes et de la taille des villosités a mis en évidence la capacité du probiotique à améliorer les performances et la santé de l'intestin. Les améliorations observées sont quasiment similaires aux améliorations des animaux recevant l'anticoccidien.

Ces études permettent de mettre en avant la possibilité de contrôler la coccidiose avec des additifs alimentaires ayant des modes d'action différents des anticoccidiens. En effet, on sait que l'un des modes d'action des probiotiques est le maintien d'une

microflore intestinale normale par exclusion compétitive (Kabir, 2009). On peut donc émettre l'hypothèse que le probiotique aurait un effet sur la coccidiose via les bactéries qui se fixent sur les sites de liaison des cellules épithéliales. En effet, *Eimeria* est un parasite intracellulaire, il a besoin de la cellule pour se reproduire. Ainsi le probiotique en occupant des récepteurs communs pourrait empêcher l'infiltration et la réplication du parasite. Un autre mode d'action des probiotiques est leur capacité à stimuler le système immunitaire (Dalloul et al., 2003a,b, 2005) ce qui améliore la réponse immunitaire des oiseaux contre *Eimeria* conduisant à un effet protecteur contre la coccidiose.

CONCLUSION

Pour conclure, les résultats de cette étude montrent que les poulets recevant un probiotique multi-souches spécifiques à la volaille dans leur aliment ont des performances similaires aux animaux recevant la salinomycine en terme d'IC et de nombre d'oocystes. Les probiotiques pourraient donc être utilisés comme une approche complémentaire dans les programmes de lutte contre les coccidies pour réduire l'incidence et la sévérité de la coccidiose et pour réduire le développement de la résistance aux coccidiostatiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chapman, H. D., 1997. Avian Pathol., 26(2), 221-244.
- Chapman, H. D., 2014. Poult. Sci., 93(3), 501-511.
- Dalloul, R. A., Lillehoj, H. S., Shellem, T. A., & Doerr, J. A., 2003a. Poult. Sci., 82(1), 62-66.
- Dalloul, R.A., Lillehoj, H.S., Shellem, T.A. and Doerr, J.A., 2003b. Avian diseases, 47(4), pp.1313-1320.
- Dalloul, R.A., Lillehoj, H.S., Tamim, N.M., Shellem, T.A. and Doerr, J.A., 2005. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 28(5), pp.351-361.
- Dalloul, R. A., & Lillehoj, H. S., 2006. Expert Rev. Vaccines, 5(1), 143-163.
- Dalloul R.A., Ritzi M.M., 2016. Probiotics: a modern solution to coccidiosis and necrotic enteritis. In: World nutrition forum: driving the protein economy, Vienna, October 12-15, 2016. E.M. Binder (Ed.). BIOMIN Edition.
- Giannenas, I., Tsalie, E., Triantafyllou, E., Hessenberger, S., Teichmann, K., Mohnl, M., & Tontis, D., 2014. Avian Pathol., 43(3), 209-216.
- Johnson, J., & Reid, W. M., 1970. Exp. Parasitol. 28(1), 30-36.
- Kabir, S. M., 2009. Int. J. Mol. Sci., 10(8), 3531-3546.
- Lorenzoni G., 2010. In: Poultry Diseases Influenced by Gastrointestinal Health: Traditional Treatments and Innovative Solutions, Nottingham University Press, pp62.

Tableau 1. Performances zootechniques globales

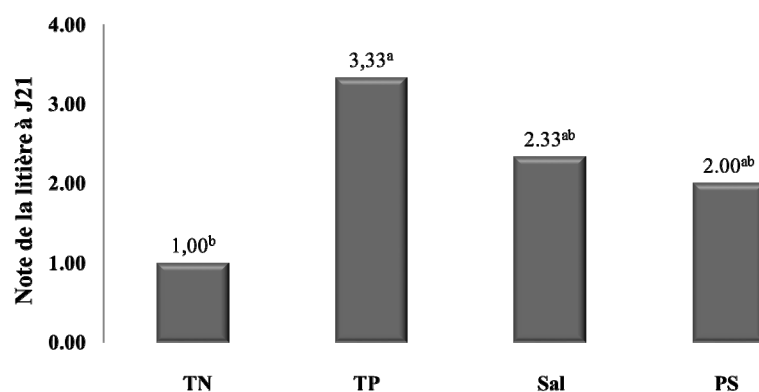
Groupes	TN	TP	Sal	PS
Poids vif à J42	2,31 ^a	1,91 ^b	2,19 ^{ab}	2,10 ^{ab}
IC à J42	1,77 ^c	2,10 ^a	1,83 ^{bc}	1,86 ^b
Mortalité (oiseaux/groupe)	0 ^a	7 ^a	9 ^a	9 ^a

^{a,b,c} Des exposants différents sur une même ligne indiquent que les moyennes sont significativement différentes ($P \leq 0,003$)

Tableau 2. Nombre d'oocystes par gramme de matière fécale et notes de lésions à J21

Groupes	TN	TP	Sal	PS
Nombre d'oocystes				
J21	1 340±1 674 ^b	153 832±38 603 ^a	30 150±3 481 ^{ab}	32 160±13 381 ^{ab}
J28	9 380±5 092 ^{ab}	203 680±139 610 ^a	3 082±879 ^b	15 276±5 428 ^{ab}
J35	6 164±3 091 ^a	1 608±1 608 ^a	1 608±1 608 ^a	0±0 ^a
J42	8 844±4 254 ^a	2 814±2 214 ^a	5 896±4 294 ^a	402±232 ^a
Cumulatif	25 728±6 034 ^b	361 934±164 358 ^a	40 736±1 360 ^{ab}	47 838±15 079 ^{ab}
Note de lésion à J21				
Partie supérieure de l'intestin	0 ^b	2,11 ^a	0,78 ^{ab}	1,33 ^{ab}
Milieu de l'intestin	0 ^b	2,11 ^a	1,67 ^{ab}	1,56 ^{ab}
Caecum	0,22 ^a	2,22 ^a	0,89 ^a	2,22 ^a

^{a,b} Des exposants différents sur une même ligne indiquent que les moyennes sont significativement différentes ($P \leq 0,05$)

Figure 1. Notation de la litière à J21 à l'aide d'une grille allant de 0 à 5

^{a,b} Des exposants différents sur une même ligne indiquent que les moyennes sont significativement différentes ($P \leq 0,05$)

**MESURE DE LA SENSIBILITE D'ESCHERICHIA COLI ISOLES SUR DES
VOLAILLES VIS-A-VIS D'UN MELANGE D'HUILES ESSENTIELLES REPUTEES
ANTIBACTERIENNES ET D'EXTRAITS DE PLANTES A L'AIDE DE LA
TECHNIQUE DU PHYTOGRAMME®.**

Mauvisseau Thierry

*LABOVET CONSEIL (Réseau Cristal), 40 rue Arsène Mignen, Les Essarts, 85140 ESSARTS
EN BOCAGE*

t.mauvisseau@reseaucristal.fr

RESUME :

La réduction de l'antibiothérapie est désormais une obligation en médecine vétérinaire, le maintien des performances et la santé des animaux en est une autre également. Le recours aux solutions alternatives telles que l'aromathérapie est une des voies permettant d'assurer la santé des animaux.

A partir du Phytogramme®, développé par RESALAB, technique de diffusion d'une solution à base d'huiles essentielles sur une géloseensemencée avec une souche bactérienne, nous avons réalisé une étude sur 67 souches d'*Escherichia coli* isolés sur volailles malades. Cela a permis d'établir que chacun des mélanges d'huiles essentielles ne génère pas toujours les mêmes diamètres d'inhibition et même que certaines souches ne semblent pas sensibles au mélange comportant des huiles essentielles réputées antibactériennes. Le Phytogramme® est donc un examen permettant d'appréhender avec moins d'empirisme le recours aux huiles essentielles dans le traitement des pathologies bactériennes à partir d'un résultat in vitro.

ABSTRACT :

Measurement of the susceptibility of *Escherichia coli* isolated from poultry to a mixture of essential oils known as antibacterial and plant extracts using the Phytogramme® technique

The reduction of antibiotic therapy is now a requirement in veterinary medicine, maintaining performance and animal health is another. The use of alternative solutions such as aromatherapy is one way of ensuring animal health.

From the Phytogramme®, developed by RESALAB, a technique for diffusing a solution based on essential oils on an agar seeded with a bacterial strain, we carried out a study on 67 strains of *Escherichia coli* isolated from diseased poultry. This made it possible to establish that each of mixture of essentials oils does not always generate the same inhibition diameters and even that some strains do not appear to be sensitive to the mixture comprising essential oils that are known to be antibacterial. The Phytogramme® is therefore a test allowing to apprehend with less empiricism the use of essential oils in the treatment of the bacterial pathologies based on an in vitro result.

INTRODUCTION :

La diminution de l'utilisation des antibiotiques en médecine aviaire et plus particulièrement de certains antibiotiques critiques dont les Fluoroquinolones a contribué à rechercher des solutions alternatives pour maîtriser avec succès les mortalités en élevage de grande taille.

L'aromathérapie ou le recours aux huiles essentielles a fait ses preuves de façon empirique depuis de nombreuses années en médecine humaine mais elle peut être utilisée également en médecine vétérinaire avec succès (May, 7).

Certaines plantes, comportant des huiles essentielles, possèdent des propriétés antibactériennes reconnues (Cannelle, Girofle, Thym, Arbre à thé..) qui peuvent être mesurées à l'aide d'un examen de laboratoire le Phytogramme®. Il permet de mesurer un diamètre d'inhibition d'un mélange d'huiles essentielles vis-à-vis d'une souche bactérienne donnée, technique dérivée de l'aromatogramme de Belaiche (Belaiche, 1979). Cet examen est un outil précieux dans le choix de la spécialité qui possède le plus grand diamètre d'inhibition mesuré in vitro. (CIVAM, 2014)

En se fondant sur les travaux réalisés en 1948 par le Dr Girault, qui traitait avec succès des patients avec plusieurs huiles essentielles associées, mais testées individuellement auparavant par un aromatogramme, à partir de bactéries isolées sur le patient, nous avons sélectionné 67 souches de colibacilles isolés sur des volailles à la suite d'un examen bactériologique et les avons testées avec différents mélanges d'huiles essentielles et mesuré les différents diamètres d'inhibition.

L'objectif est d'apprécier si un même mélange génère des diamètres sensiblement identiques vis à vis d'un taxon et s'il peut être utilisé systématiquement sur une problématique colibacillaire identifiée en élevage ou si les souches d'un même taxon peuvent présenter des diamètres d'inhibition très variables, comme c'est le cas pour les antibiotiques et nécessitant de ce fait le recours à cet examen en routine, pour le choix de la thérapeutique.

1. MATERIEL ET METHODE.

1.1 Matériel

Le produit utilisé est constitué d'une part d'un mélange de plusieurs huiles essentielles dont : la cannelle de Ceylan, le Niaouli et le Thym et d'autre part d'extraits de plantes à propriétés immunostimulantes et drainantes.

Certaines HE (Huiles essentielles) ont des propriétés antibactériennes, mais également antivirales, antiparasitaires, expectorantes, anti-diarrhéiques, immunostimulantes suivant les différents composants chimiques contenus dans l'HE.

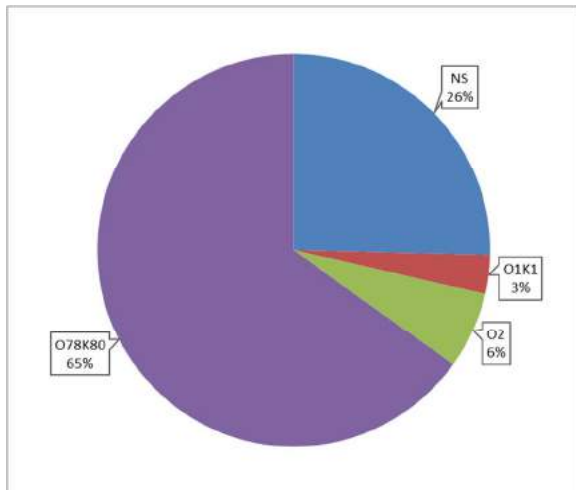
Une chromatographie en phase gazeuse a permis de mesurer les différents composants de chaque huile essentielle et d'identifier le chémotype (constituant singularisant l'HE retenue). En effet, la richesse en chémotype majeur a un impact sur l'activité antibactérienne. Certains constituants tels que le cinnamaldéhyde (Cannelle), le 1-8 cinéol (Niaouli) et le thymol (Thym), ont de réelles activités antibactériennes. En fonction de la richesse en constituants chimiques, l'activité peut être différente. Par exemple un thym riche en paracymène aura plus une activité antalgique ou anti inflammatoire qu'un thym riche en thymol. La composition en chémotype varie selon les conditions climatiques, le terroir, la saison ou l'organe récolté. Un thym cultivé en Tunisie ou en Italie, ou récolté à différentes période de l'année peut contenir des chémotypes complètement différents et avoir des activités totalement différentes. (Franchomme, 4)

Il est donc très important de connaître précisément le chémotype de chaque plante pour avoir une idée précise de l'effet attendu. Un certificat d'analyse avec la constitution des différents chémotypes a été demandé au fabricant de façon à avoir une répétabilité des effets antibactériens.

Les HE sont issues du métabolisme secondaire de la plante à partir d'un noyau isopentényl pyrophosphate (Franchomme, 4) La différenciation de chaque composant des HE se fait ensuite par différentes réactions de carboxylation et/ou d'oxygénation. Des recombinaisons de constituants issus de l'association de plusieurs HE dans un mélange, peuvent donner naissance à un nouveau constituant chimique ou augmenter la quantité d'un constituant présent dans une HE à très faible quantité (Franchomme, 4). Dans la pratique, les spécialités utilisées sont constituées de plusieurs HE de façon à optimiser les effets bénéfiques au travers des différentes actions de chaque HE. Par exemple, dans le cas d'une infection respiratoire d'origine bactérienne qui génère une production importante de mucus et de pus, l'association d'une HE antibactérienne avec une autre HE à propriété

anti-inflammatoire et expectorante sera plus bénéfique qu'une HE à activité antibactérienne uniquement. C'est l'une des grandes différences fondamentales entre un antibiotique qui n'a en général qu'une activité antibactérienne. (May, 2014) L'essai a été conduit sur des souches de colibacilles isolées sur organes de volailles présentant des troubles cliniques avec mortalité (péricardite, périhépatite, pneumonie), pour lesquels un traitement antibiotique n'était pas toujours possible pour des questions de délai d'attente trop long par rapport à l'abattage ou bien pour des productions ne voulant pas avoir recours aux antibiotiques (production biologique ou volaille élevée sans antibiotiques). Les colibacilles testés appartenaient soit aux sérotypes classiques réputés pathogènes en volailles 65 % (*E. coli* O78K80, *E. coli* O2K1, *E. coli* O1K1) soit à des sérovars non identifiés (26%) mais responsables de lésions infectieuses avec mortalité associée.

Figure 1. Répartition des différents sérovars de 67 *Escherichia coli* isolés de volailles testés dans l'étude.



1.2 Méthode

La méthode du Phytogramme a été mise au point par RESALAB en 2014. (Mauvisseau, 2016)

C'est une technique issue de l'aromatogramme réalisé sur une HE pure décrite par Belaiche en 1948 à partir de buvard imbibé d'HE. (Lequeux, 2013)

Elle repose, en revanche, sur une méthode de diffusion en milieu gélifié à partir d'un puits de 6mm de diamètre contenant 50 µl de la solution pure d'un mélange donné d'HE, de dispersant et de solvant et un autre puits contenant le même volume d'une solution diluée dans de l'eau physiologique à 50%.

La souche bactérienne isolée sur organe est ensuite mise en suspension afin de réaliser un bouillon titré à partir du système de Mac Farland.

Les géloses sont ensemencées par écouvillonnage croisé à partir du bouillon bactérien.

Les géloses sont mises en incubation à 37 °C pendant 24 heures pour la lecture des résultats.

Les diamètres d'inhibition de la solution pure et de la solution diluée à 50% sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse, permettant d'avoir des mesures au centième de millimètre

Plus le diamètre d'inhibition est important plus l'activité antibactérienne *in vitro*, est élevée.

Les HE sont déposées dans un puits de 6 mm de diamètre.

Une valeur donnée à 6 mm, correspond au diamètre du puits, donc une absence de diamètre d'inhibition. A partir d'une valeur (supérieure à 6 mm), nous pouvons conclure à une inhibition de la pousse de la bactérie et parler de diamètre d'inhibition. A partir d'un diamètre de 15mm l'activité inhibitrice *in vitro* peut être qualifiée d'assez élevée (3 mm pour Belaiche en HE pure) Afin de mesurer l'effet reproductible de cette technique, des essais interlaboratoires réalisés dans 10 laboratoires, ont permis de reproduire des valeurs similaires à partir de souches identifiées. (RESALAB)

1.2 Analyse statistique

Les 67 mesures ont été compilées dans un tableau avec le diamètre en solution pure et le diamètre en solution diluée.

Une analyse statistique sur les moyennes, l'écart type, les diamètres minimum, maximum et la répartition des mesures sous forme d'histogramme a été pratiquée afin d'apprécier une éventuelle homogénéité des résultats.

Chaque analyse a été pratiquée sur le diamètre en pur et sur le diamètre en dilué.

2. RESULTAT ET DISCUSSION :

L'analyse des moyennes (tableau 1) indique que les diamètres moyens pour le mélange donné d'HE sont assez proches en solution pure et en solution diluée à 50 %, avec seulement 4 mm d'écart. En diminuant la concentration en HE dans la spécialité de 50%, le diamètre d'inhibition diminue mais l'activité inhibitrice existe toujours. (Diamètre mesuré supérieur à 6 mm)

Le diamètre maximal est relativement important (12,23 mm en pur et 9,12 mm en dilué 50 %), en

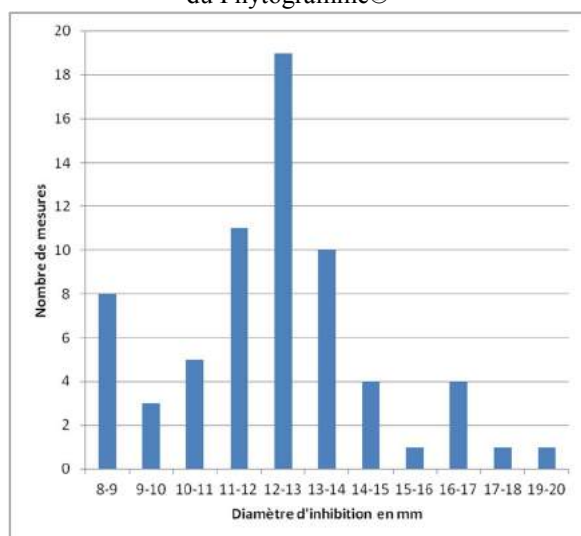
revanche pour le diamètre minimal, en dilution à 50 % la spécialité testée n'a pas généré de diamètre d'inhibition (6 mm) pour certaines souches, donc une absence d'activité antibactérienne directe sur le colibacille.

L'analyse des écarts-types indique une faible variation au sein des 67 souches testées. (2,03 et 2,32) à comparer avec les moyennes respectives de 9,12 et 12,23.

L'analyse de l'histogramme (figure 1) montre que tous les colibacilles sont inhibés par la spécialité utilisée en pur (diamètre d'inhibition supérieur à 6 mm pour les 67 souches). 8 souches de colibacilles présentent un très faible diamètre d'inhibition compris entre 8 et 9 mm et à l'inverse 2 souches présentent des diamètres très importants soit supérieurs à 17 mm.

En dehors des 8 souches faiblement sensibles, la répartition est homogène avec un diamètre médiant entre 11 et 14 mm, pour 60 % des souches.

Figure 1. Répartition des différents diamètres d'inhibition pour une solution pure pour les 67 souches de colibacilles isolés suivant la technique du Phytogramme®

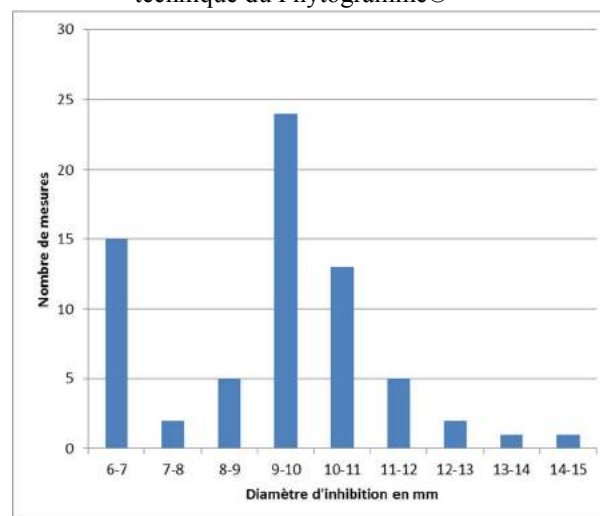


L'analyse de la répartition des diamètres d'inhibition avec une solution diluée à 50 % (figure 2) montre que 15 souches de colibacilles sur 67 ne sont pratiquement pas inhibées par la solution à base d'huiles essentielles. (diamètre de 6-7 mm)

50 % des colibacilles ont des diamètres compris en 9 et 11 mm et 2 souches présentent des diamètres importants.

Figure 2. Répartition des différents diamètres d'inhibition pour une solution diluée à 50 % pour

les 67 souches de colibacilles isolés suivant la technique du Phytogramme®



En dehors des souches non inhibées par le mélange d'HE, la répartition des diamètres est bien homogène.

Les diamètres mesurés au sein de la population de colibacilles testés sont moins importants que pour les mesures réalisées avec la solution pure.

La répartition des différentes classes présente le même profil que pour la solution pure, en revanche, l'inhibition est plus marquée avec une concentration en HE plus importante, quelque soit le sérotype identifié des colibacilles testés.

CONCLUSION :

Les mesures des diamètres d'inhibition pour les 67 souches testées ne sont donc pas homogènes, certaines souches sont bien inhibées par le mélange d'HE testées et d'autres très peu.

Plus la concentration en HE est importante dans la spécialité, plus l'activité antibactérienne est importante.

La sensibilité est variable en fonction de la souche d'*Escherichia coli* isolée. Le Phytogramme® est donc une technique qui permet de bien valider la sensibilité bactérienne *in vitro* vis-à-vis d'un mélange donné d'HE qui ont, au départ, potentiellement une activité antibactérienne reconnue. (Boucher et Mauvisseau, 2015)

Les spécialités à base d'HE ne peuvent donc se prévaloir d'une activité antibactérienne, quel que soit le germe isolé, au même titre qu'un antibiotique n'a pas toujours une activité antibactérienne vis-à-vis d'un taxon de bactéries. Seul un examen de laboratoire peut permettre d'appréhender son activité antibactérienne : antibiogramme pour l'antibiothérapie ou Phytogramme® pour l'aromathérapie.

Toutefois, les autres activités des HE: Immunostimulante, expectorante, antispasmodique, ou anti-diarrhéique, ne doivent pas être écartées et peuvent contribuer par ailleurs à la guérison clinique de l'animal, même pour des activités antibactériennes *in vitro* assez faibles se traduisant par des diamètres d'inhibition peu importants, ce qui est également un gros avantage par rapport aux antibiotiques.

L'étude pourrait être plus affinée en comparant des *Escherichia coli* ayant un profil de résistance aux

antibiotiques marqué et le diamètre d'inhibition vis-à-vis du mélange d'huiles essentielles grâce au Phytogramme®. Ces solutions alternatives peuvent représenter une médecine reconnue pour le traitement de germes très résistants en médecine vétérinaire comme cela est déjà pratiqué avec succès pour certaines affections en médecine humaine.

Le Phytogramme® est un examen de laboratoire permettant d'aborder le choix d'une thérapie alternative avec moins d'empirisme.

Tableau 1. Diamètres d'inhibition en millimètres des moyennes, diamètre maximal et minimal et écart type pour 67 souches d'*E.coli* isolés sur des volailles par la technique du Phytogramme®

Valeurs	1/2	pur
Moyenne de SPECIALITE	9,12	12,23
Max de SPECIALITE	14,22	19,98
Min de SPECIALITE	6	8,17
Écart type de SPECIALITE	2,03	2,32

BIBLIOGRAPHIE

1. Belaiche P.,1979. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie .Paris. Editions Masson. 1979
2. Boucher S.,Mauvisseau T.,2015. Sensibilité de *Pasteurella multocida* et de *Staphylococcus aureus* isolés sur des lapins de chair (*Oryctolagus cuniculus*) à des solutions phytoaromathérapiques à l'aide de la technique du Phytogramme®. Journée de la recherche Cunicole 2015. ITAVI
3. CIVAM ADAGE,2014. Acte du colloque 24 mars 2014 Agrocampus Ouest-Rennes Retour de 6 années d'expérimentation avec les huiles essentielles sur les bovins. 2014.
4. Franchomme P.,et al.,2001. L'aromathérapie exactement. Ed Jolloy. 2001
5. Lequeux G.,Boutin M., 2013. Aromatogramme : mise en place d'une méthodologie. Résultats préliminaires sur des souches de mammites bovines. Journées Nationales GTV. Nantes 2013
6. Mauvisseau T.,2016. Le Phytogramme® : un nouvel outil utilisable en élevage. : Soigner autrement : trouver l'équilibre pour produire mieux. Ed Le Point vétérinaire. 2016
7. May P.,2014. Guide pratique de Phyto-Aromathérapie pour les animaux de compagnie. Ed Med'com. 2014



Mesure de la sensibilité d'*Escherichia coli* isolés sur des volailles vis-à-vis d'un mélange d'huiles essentielles réputées antibactériennes et d'extraits de plantes à l'aide de la technique du Phytogramme®

Mauvisseau T

LABOVET CONSEIL (Réseau Cristal), ZAC de la Buzenière 85505, Les Herbiers Cedex, France.

INTRODUCTION

Le recours à l'aromathérapie en médecine vétérinaire peut permettre de diminuer l'utilisation des antibiotiques. L'activité antibactérienne de certaines huiles essentielles vis-à-vis d'une bactérie peut être mesurée en laboratoire. L'étude a consisté à vérifier si un mélange donné d'huiles essentielles et d'extraits de plantes a toujours la même activité sur le taxon *Escherichia coli* isolé sur des volailles.

MATERIEL ET METHODE

67 souches d'*Escherichia coli* (O78K80, O1K1, O2 ou non sérotypés) isolées sur organe de volaille malade ont été mises en culture avec une quantité déterminée d'un mélange d'huiles essentielles chémotypées de Cannelle de Ceylan, Niaouli et thym (Figure 1) avec la technique du Phytogramme® (diffusion en milieu gélosé à partir de puits comportant une quantité définie de solution aromatique.) (Figure 4) Les diamètres d'inhibition de la pousse bactérienne ont été mesurés pour la solution aromatique pure et diluée à 50 % pour chaque souche de façon à apprécier la diminution du diamètre d'inhibition en fonction de la concentration en huiles essentielles dans la solution initiale.



Figure 1:
Cannelle
Ceylan, Niaouli,
Thym

RESULTATS

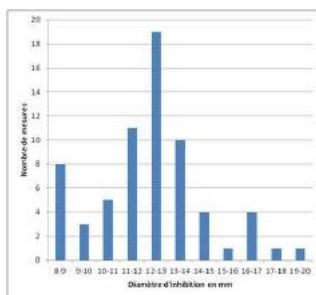


Figure 3. Répartition des différents diamètres d'inhibition pour une solution diluée à 50 % pour les 67 souches de colibacilles isolés suivant la technique du Phytogramme®

Figure 2: Répartition des différents diamètres d'inhibition pour une solution pure pour les 67 souches de colibacilles isolés suivant la technique du Phytogramme®

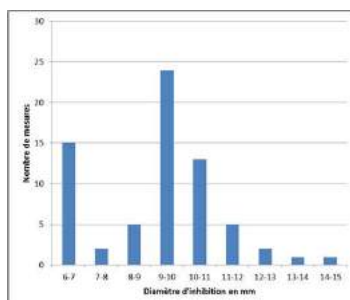
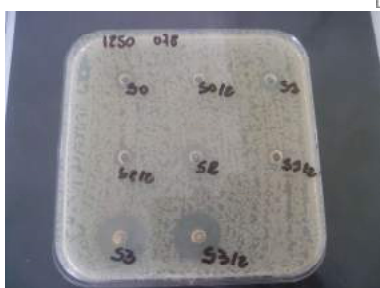


Figure 4: Phytogramme (RESALAB) sur *E. coli* O78 K80 avec 4 solutions testées en pure et en diluée 50 %.



La sensibilité au mélange d'huiles essentielles est assez homogène pour les 67 souches testées et ce quelque soit la concentration de l'huile essentielle. En pur: moyenne de 12, et $\sigma = 2,32$ et en dilué: moyenne de 9, et $\sigma = 2,03$. (Figure 5). Les diamètres moyens d'inhibition avec une solution pure (Figure 2) sont toujours plus élevés qu'avec une solution diluée à 50 % (Figure 3). La diminution de la concentration en Huiles essentielles réduit le diamètre d'inhibition. 12% de souches sont très faiblement inhibées en pure, alors que 32 % le sont plus en diluée 50 % (diamètre <9).

Valeurs	1/2	pur
Moyenne de SPECIALITE	9,12	12,23
Max de SPECIALITE	14,22	19,98
Min de SPECIALITE	6	8,17
Écart type de SPECIALITE	2,03	2,32

Figure 5: Moyennes et Ecart types des 67 souches d' *E. coli* en pure et en diluée 50 %

DISCUSSION

Un mélange identifié comportant des huiles essentielles réputées antibactériennes ne semble donc pas toujours inhiber toutes les souches d'*Escherichia coli* de volaille.

Certaines souches semblent donc plus sensibles que d'autres au mélange d'huiles essentielles.

Le diamètre d'inhibition semble concentration dépendante.

A la différence, d'un antibiotique, une huile essentielle possède par ailleurs de multiples effets bénéfiques : mucolytique, immunostimulant, antiviral, antispasmodique qui peuvent se cumuler avec l'effet antibactérien initial pour augmenter le potentiel thérapeutique. Pour chaque spécialité utilisée il est également important de bien connaître la composition et le chémotype pour mettre à profit des propriétés secondaires.

CONCLUSION

Un mélange d'huiles essentielles réputées antibactériennes, ne peut donc être utilisé quelque soit le germe suspecté, au même titre qu'un antibiotique. Un examen de laboratoire tel que le Phytogramme permet en ce sens, d'orienter le choix de la spécialité retenue en quantifiant l'activité antibactérienne de la solution aromatique.

REFERENCES

- Belaiche P., 1979. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Paris. Editions Masson. 1979
- Boucher S., Mauvisseau T., 2015. Sensibilité de *Pasteurella multocida* et de *Staphylococcus aureus* isolés sur des lapins de chair (*Oryctolagus cuniculus*) à des solutions phytoaromathérapiques à l'aide de la technique du Phytogramme®. Journée de la recherche Cunicole 2015. ITAVI
- CIVAM ADAGE, 2014. Acte du colloque 24 mars 2014 Agrocampus Ouest-Rennes Retour de 6 années d'expérimentation avec les huiles essentielles sur les bovins. 2014.
- Franchomme P., et al., 2001. L'aromathérapie exactement. Ed Jollos. 2001
- Lequeux G., Boutin M., 2013. Aromatogramme : mise en place d'une méthodologie. Résultats préliminaires sur des souches de mammites bovines. Journées Nationales GTV. Nantes 2013
- Mauvisseau T., 2016. Le Phytogramme® : un nouvel outil utilisable en élevage. : Soigner autrement : trouver l'équilibre pour produire mieux. Ed Le Point vétérinaire. 2016
- May P., 2014. Guide pratique de Phyto-Aromathérapie pour les animaux de compagnie. Ed Med'com. 2014

**ETUDE DE LA CAPACITE D'INHIBITION DE LA CROISSANCE D'*E. COLI*
EXPOSEE A UN MELANGE D'HUILES ESSENTIELLES, PUIS DE LA CAPACITE
DE RECUPERATION D'*E. COLI*, EN COMPARAISON DE LA COLISTINE.**

**Girard Claire¹, Chabrilat Thibaut¹, Araujo Coralie¹, Leguay Clara¹, Johansen Bianca²,
Sergere Jean-Christophe², Kerros Sylvain¹**

¹ PHYTOSYNTHESE, 57 avenue Jean-Jaurès, 63200 MOZAC

² SETUBIO S.A., Parc Naturopôle Nutrition Santé, 03800 SAINT BONNET DE ROCHEFORT

claire.girard@phytosynthese.com

RESUME

Les additifs phytogéniques constituent des solutions alternatives aux antibiotiques en nutrition animale. Le but de cette étude est de comparer la capacité d'inhibition de croissance d'*E. coli* exposée à un mélange commercial d'huiles essentielles (mélange HE) puis à la colistine. La capacité de récupération de la bactérie est également comparée après exposition à ces deux substances antibactériennes. Premièrement, un suivi de croissance d'une souche *E. coli* a été réalisé par dénombrement à 0H, 1H, 2H, 4H et 6H en présence du mélange HE ou de la colistine à concentrations CMI, CMI/2 et CMI/4. Puis, le même suivi de croissance a été mesuré mais cette fois après 90 min de contact, les deux agents antibactériens ont été éliminés du milieu par centrifugation. En effet, il s'agit de mesurer la capacité de récupération bactérienne. C'est l'écart de population bactérienne mesuré à partir du temps initial correspondant à l'élimination des substances antibactériennes, jusqu'à 24H. Le mélange HE montre une capacité d'inhibition de la croissance bactérienne à doses inférieures sub-CMI (à CMI/2 à t=4H, réduction d'1 log₁₀ par rapport au contrôle). Cette activité bactériostatique est dépendante de la concentration, tout comme pour la colistine. L'antibiotique présente une activité plutôt bactéricide (à CMI/2 à t=4H, réduction de 4,5 log₁₀ par rapport au contrôle). La capacité de récupération d'*E. coli* est nulle après exposition à une dose CMI de colistine et identique au contrôle après exposition au mélange HE. Après exposition à une dose sub-CMI d'antibiotique, la capacité de récupération bactérienne est cette fois 1,83 fois supérieure à celle du contrôle alors qu'elle reste identique au contrôle après exposition au mélange HE. Ceci pourrait s'expliquer par une adaptation métabolique de la part de la bactérie. Cette étude doit être complétée par des travaux sur le mode d'action comparé des huiles essentielles et de l'antibiotique, dont les modes d'acquisition de résistance.

ABSTRACT

Study of the growth inhibition capacity et the recovery capacity of *E. coli*, exposed to an essential oils blend in comparison with colistin antibiotic.

Phytogenic additives are new alternatives identified to reduce the use of antibiotics in feed. The aim of this study is to investigate the growth inhibition capacity et the recovery capacity *E. coli* exposed at inhibitory et sub-inhibitory concentrations (MIC et sub-MIC) to an essential oil mixture (EO mix). Bacteria growths are compared with a positive antibiotic control: colistin. First, an *E. coli* growth monitoring (log₁₀) is performed from 0 to 6 hours in the presence of both antibacterial substances at different concentrations (MIC, MIC/2 et MIC/4). Then, a second *E. coli* growth monitoring is performed after elimination by centrifugation of antimicrobial agents previously in contact with the bacteria during 90 minutes. The recovery capacity is the difference of *E. coli* population (log₁₀) between initial time corresponding to the elimination, et 24 hours. Both antibacterial substances demonstrate a concentration-dependent growth inhibition capacity at sub-MIC concentrations. Unlike the EO mix which have a bacteriostatic action (at CMI/2 at t=4H, reduction of 1 log₁₀ compared to the control), colistin has a bactericidal trend (at CMI/2 at t=4H, reduction of 4.5 log₁₀ compared to the control); the *E. coli* recovery capacity is non-existing after exposure to colistin at MIC et equal to the negative control when using EO mix at MIC. An exposure to colistin at MIC/4 results in a 1,83 times higher population compared to an exposure to EO mix at MIC/4 et negative control. A hypothesis is the modification of the bacteria metabolism due to an adaptation. This study should be completed by further investigations on mode of action, including resistance patterns.

INTRODUCTION

L'augmentation de l'antibio-résistance nécessite une utilisation raisonnée des antibiotiques. Après l'interdiction de l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance dans l'alimentation animale, et à défaut de trouver de nouvelles molécules, dont la difficulté principale est de pouvoir pénétrer la paroi bactérienne (Payne et al., 2007), des alternatives telles que les huiles essentielles (HE) et extraits de plantes sont utilisées en prévention dans l'alimentation des volailles.

Les HE sont des liquides volatiles issus du métabolisme secondaire des plantes aromatiques. Elles sont constituées d'une multitude de composés terpènes, aldéhydes et phénols (Padalia et al., 2015). Elles possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales connues depuis l'antiquité et largement étudiées *in vitro* sur de nombreuses bactéries Gram – et Gram + (Dorman et Deans, 2000; Liu et al., 2013; Mickiene et al., 2011).

Cependant, si l'action antibactérienne combinée de deux HE ou de leurs principaux composants a été étudiée (de Azeredo et al., 2011; Bassolé et Juliani, 2012), l'action bactériostatique d'un mélange complexe d'HE sur une souche bactérienne n'a été que peu exploré.

Le but de ce travail est de comparer l'action d'un mélange commercial complexe d'HE (mélange HE) à celle d'un antibiotique, la colistine, sur une souche d'*Escherichia coli* (*E. coli*), en déterminant la capacité d'inhibition et la capacité de récupération de la bactérie après exposition aux actifs.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Détermination de la composition du mélange HE

L'analyse du mélange HE (fourni par Phytosynthese) est effectuée en utilisant un chromatographe en phase gazeuse (ThermoFisher Trace GC) couplé à un spectromètre de masse (ThermoFisher DSQ I). La colonne chromatographique est de type TG-5MS (longueur : 30m ; diamètre interne : 0,25mm ; épaisseur du film : 0,25 µm) et le passeur automatique est Triplus. Le gaz vecteur est l'hélium et le débit est de 0,7ml/min. La température de la colonne est initialement réglée à 60°C et augmente

progressivement de 5°C/min jusqu'à 300°C. Les échantillons sont dilués (1/10) puis 0,5 µl est injecté. Les composants sont identifiés grâce à la banque de données NIST 5. Ces analyses ont été réalisées en triplicatas dans le laboratoire de Phytosynthese.

1.2. Préparation des échantillons des actifs testés

Le sulfate de colistine (Sigma-Aldrich, 1264-72-8) est préparé en solution aqueuse à 1 mg/ml dans de l'eau stérile et conservé à -80°C et décongelé deux fois maximum. La solution de travail est préparée à 50µg/ml. Le mélange HE est préparé à 50% dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), puis dilué dans de l'eau stérile aux concentrations à tester. La solution de travail du mélange HE est de 4%. La préparation des échantillons des actifs et les tests microbiologiques ont été réalisés dans le laboratoire de Setubio.

1.3. Exposition des bactéries au mélange HE et à la colistine

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus petite concentration d'actif inhibant toute croissance bactérienne visible à l'œil nu à 37°C pendant 18H. La CMI est déterminée pour la colistine et le mélange HE sur une souche *E. coli* (CIP 53.126) selon la méthode de micro dilution en bouillon décrite dans la norme ISO 20776-1 :2006. Une série de dilutions de raison 2 est réalisée à partir de concentrations maximales testées de 12,5 µg/ml de colistine et 1% de mélange HE. Un témoin solvant est utilisé en parallèle aux mêmes concentrations que le mélange d'HE.

Le suivi de croissance bactérienne est réalisé en milieu liquide (bouillon Mueller Hinton) par la méthode du time-kill, adaptée des protocoles décrits par May J *et al* [2000] et Peterson PJ *et al* [2007]. Un dénombrement sur gélose riche est effectué à T0 (avant la mise en contact des bactéries avec l'échantillon), à T1H, T2H, T4H, T6H, et T24H. Les concentrations testées sont CMI, CMI/2 et CMI/4 pour le mélange HE et la colistine avec une concentration de colonies testées calibrée à 5.10^5 - 10^6 UFC/ml. Un témoin solvant est réalisé aux mêmes concentrations que le mélange HE. Les expériences sont répétées en double et de manière indépendante. Les résultats sont représentés en nombre de microorganismes ($\log_{10}$ UFC/mL) en fonction du temps. Enfin, un second suivi de croissance après

mise en contact avec les agents antibactériens est réalisé selon les protocoles de Lee SI et Choe SJ [2004] et Pankuch GA *et al* [2003]. Il est adapté de la méthode du time-kill. Mais cette fois après 90 min de contact, les deux agents antibactériens sont éliminés du milieu par centrifugation à 2 100 g, 10 minutes, et le culot bactérien est repris dans du milieu frais. En effet, il s'agit de mesurer la capacité de récupération bactérienne. Elle est définie comme l'écart de population de microorganismes mesuré à partir du temps initial correspondant à l'élimination des substances antibactériennes, jusqu'à 24H. Les résultats sont représentés graphiquement par le nombre de microorganismes (Log_{10} UFC/mL) en fonction du temps.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le mélange HE est un mélange complexe de 16 molécules identifiées (phénols, aldéhydes et terpènes) dont les composés principaux sont le cinnamaldéhyde (42,73 %), suivi du thymol (15,00%) et enfin du carvacrol.

La CMI du mélange HE est 186 fois supérieure à celle de la colistine (tableau 2), ce qui suggère une plus grande susceptibilité d'*E. coli* à l'antibiotique.

L'étude de la cinétique de croissance d'*E. coli* (figure 1) prouve une activité inhibitrice même à concentrations sub-CMI de mélange HE, comme précédemment décrit (Liu et al., 2013). Cette action est dépendante de la concentration, comme pour l'antibiotique. Le témoin solvant ne présente aucune activité antibactérienne (données non présentées). La colistine, quant à elle, présente une activité bactéricide. En effet, après 2H à la dose CMI, la diminution de la charge bactérienne par rapport au contrôle est de 0.5 Log_{10} avec le mélange HE contre 4,5 Log_{10} avec la colistine. Ce résultat est en accord avec des études précédentes rapportant l'activité à la fois bactéricide et dépendante de la concentration de la colistine (Bergen et al., 2012; Owen et al., 2007). L'activité inhibitrice du mélange HE peut s'expliquer par la présence de composés phénols et aldéhydes dont l'activité antibactérienne est connue pour être

plus efficace que celle des composés terpéniques (Bajpai et al., 2012; Bassolé et Juliani, 2012).

La capacité de récupération d'*E. coli* est définie comme la différence (en Log_{10} UFC/ml) entre le dénombrement bactérien à T24H et le dénombrement après élimination des substances antibactériennes. Elle est nulle après exposition pendant 90 minutes à une dose CMI de colistine (figure 2), comme précédemment rapporté (Michalopoulos et Falagas, 2011). Elle est identique au contrôle après exposition au mélange HE. Cependant, après exposition à une dose sub-CMI d'antibiotique, la capacité de récupération bactérienne est cette fois 1,83 fois supérieure à celle du contrôle alors qu'elle reste identique au contrôle après exposition au mélange HE. Une recroissance plus rapide de souches de bactéries à Gram négatif (*Acinetobacter baumannii*) après exposition à des concentrations sub-CMI de colistine (CMI/2) a déjà été constatée (Owen et al., 2007). Ce phénomène a lui aussi pu être observé sur *E. coli* après exposition au méropénème (Hanberger et al., 1995). Le mécanisme sous-jacent est aujourd'hui inconnu (Bergen et al., 2012) mais il est possible que des doses sub-CMI d'antibiotique puissent modifier le métabolisme bactérien, contrairement au mélange HE. D'autres changements métaboliques ont déjà pu être observés notamment, dans le cas de la persistance bactérienne (Keren et al., 2004; Levin et Rozen, 2006; Martínez et Rojo, 2011).

CONCLUSION

Les résultats de cette étude montrent que le mélange HE peut inhiber la croissance bactérienne même à des doses sub-CMI et possède une action, bactériostatique. Cette action est dépendante de la concentration, comme pour l'antibiotique. Il est également prouvé ici que le mélange HE n'augmente pas la capacité de récupération d'*E. coli*, contrairement à la colistine. Il serait intéressant de poursuivre cette étude par des investigations sur le mode d'action comparé du mélange HE et de l'antibiotique, en incluant les modes d'acquisition de résistance.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- de Azeredo G.A., Stamford T.L.M., Nunes P.C., Gomes Neto N.J., de Oliveira M.E.G., de Souza E.L., 2011. Food Res. Int., (44), 1541–1548.
- Bajpai V.K., Baek K.-H., Kang, S.C., 2012. Food Res. Int., (45), 722–734.
- Bassolé I.H.N., Juliani H.R., 2012. Molecules, (17), 3989–4006.
- Bergen P.J., Landersdorfer C.B., Zhang J., Zhao M., Lee H.J., Nation R.L., Li J., 2012. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., (74), 213–223.
- Dorman H.J.D., Deans S.G., 2000. J. Appl. Microbiol., (88), 308–316.
- Hanberger H., Svensson E., Nilsson L.E., Nilsson M., 1995. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., (14), 383–390.
- Keren I., Shah D., Spoering A., Kaldalu N., Lewis K., 2004. J. Bacteriol., (186), 8172–8180.
- Lee S.Y., Choe S.-J., 2004. Int. J. Antimicrob. Agents, (23), 457–461.
- Levin B.R., Rozen D.E., 2006. Nat. Rev. Microbiol., (4), 556–562.
- Liu Y., Zhang X., Wang Y., Chen F., Yu Z., Wang L., Chen S., Guo M., 2013. World J. Microbiol. Biotechnol., (29), 1161–1167.
- Martínez J.L., Rojo F., 2011. FEMS Microbiol. Rev., (35), 768–789.
- May J., Chan C.H., King A., Williams L., French G.L., 2000. J. Antimicrob. Chemother., (45), 639–643.
- Michalopoulos A.S., Falagas M.E., 2011. Ann. Intensive Care, (1), 1.
- Mickiene R., Bakutis B., Baliukoniene V., 2011. Ann. Agric. Environ. Med., (18).
- Owen R.J., Li J., Nation R.L., Spelman D., 2007. J. Antimicrob. Chemother., (59), 473–477.
- Padalia H., Moteriya P., Baravalia Y., Chanda S., 2015. Battle Microb. Pathog. Basic Sci. Technol. Adv. Educ. Programs, (1), 34–45.
- Pankuch G.A., Jacobs M.R., Appelbaum P.C., 2003. Antimicrob. Agents Chemother., (47), 3012–3014.
- Payne D.J., Gwynn M.N., Holmes D.J., Pompliano D.L., 2007. Nat. Rev. Drug Discov., (6), 29–40.
- Petersen P.J., Jones C.H., Bradford P.A., 2007. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., (59), 347–349.

Tableau 1 : Composition du mélange HE déterminée par chromatographie en phase gazeuse.

N° d'ordre	Composés	Moyenne (%)
1	Cinnamaldéhyde	42,73 ± 0,80
2	Thymol	15,00 ± 0,11
3	Carvacrol	8,95 ± 0,12
4	p-cymène	7,95 ± 0,63
5	α-terpinène	6,05 ± 0,26
6	Eugénol	5,90 ± 0,10
7	D-Limonène	3,44 ± 0,12
8	Néral	2,16 ± 0,11
9	β-pinène	1,00 ± 0,06
10	β-caryophyllène	1,01 ± 0,07
11	Géranial	0,54 ± 0,01
12	Disulfure de diallyle	0,41 ± 0,02
13	Linalol	0,35 ± 0,01
14	Citronellal	0,27 ± 0,01
15	Citronellol	0,26 ± 0,01
16	α-terpinéol	0,08 ± 0,01

Tableau 2 : Détermination des CMI de la colistine et du noyau d'huiles essentielles

	CMI colistine (µg/ml)	CMI noyau HE (µg/ml)
<i>E. coli</i>	1,56	291

Figure 1 : Courbes de croissance d'*E. coli* ($\log_{10}$ UFC/ml) en fonction du temps (H), exposée à des CMI et sub-CMI de mélange HE (a) ou de colistine (b).

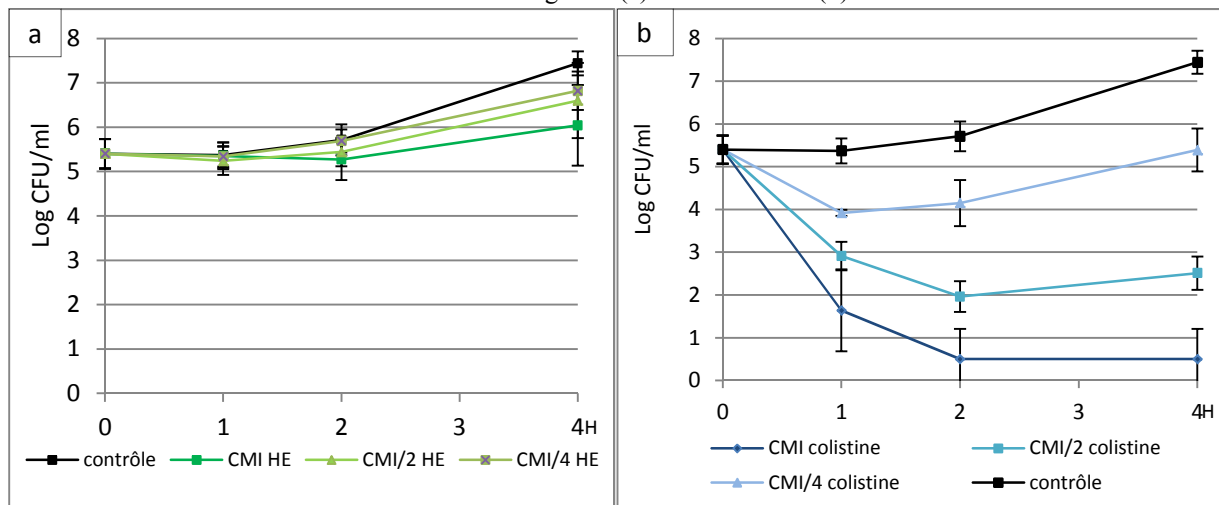
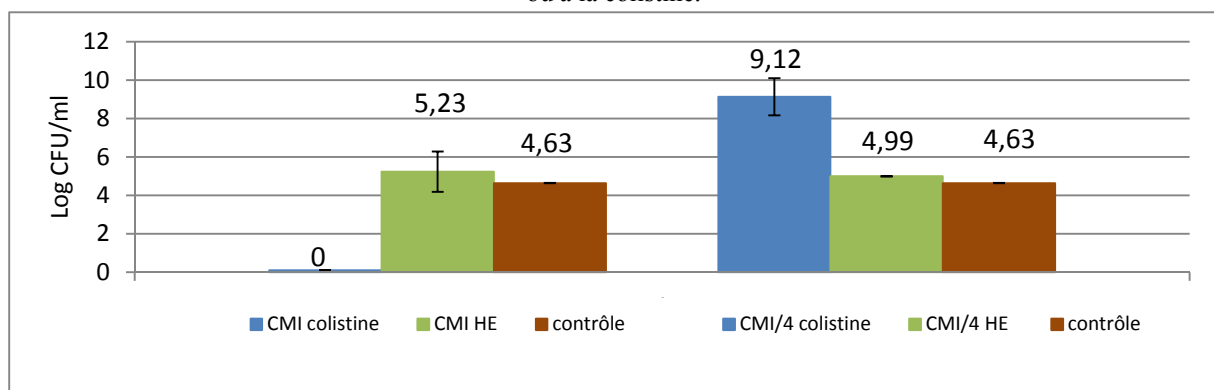


Figure 2 : Capacité de récupération d'*E. coli* ($\log_{10}$ UFC/ml) après une exposition de 90 minutes au mélange HE ou à la colistine.



Étude de la capacité d'inhibition de la croissance d'*E. coli* exposée à un mélange d'huiles essentielles, puis de la capacité de récupération d'*E. coli*, en comparaison de la colistine

GIRARD C.⁽¹⁾, CHABRILLAT T.⁽¹⁾, ARAUJO C.⁽¹⁾, LEGUAY C.⁽¹⁾, JOHANSEN B.⁽²⁾, SERGERE JC.⁽²⁾, KERROS S.⁽¹⁾

⁽¹⁾PHYTOSYNTHESE, 57 AVENUE JEAN JAURÈS, 63200 MOZAC, FRANCE

⁽²⁾SETUBIO S.A., PARC NATUROPÔLE NUTRITION SANTÉ, 03800 SAINT BONNET DE ROCHEFORT, FRANCE

L'augmentation de l'antibio-résistance est une préoccupation actuelle et les additifs phytogéniques constituent une alternative afin de réduire l'utilisation des antibiotiques en nutrition animale. Le but de ce travail est d'étudier la capacité d'inhibition de croissance d'*E. coli* et la capacité de récupération d'*E. coli* exposée à un mélange commercial d'huiles essentielles (mélange HE). L'étude est menée à la concentration minimale inhibitrice (CMI) et à concentrations inférieures (sub-CMI), en comparaison de la colistine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La CMI du mélange HE et de la colistine sur *E. coli* (CIP 53.126) a été déterminée selon la méthode de micro dilution en bouillon décrite dans la norme ISO 20776-1 : 2006. La CMI est définie comme la plus petite concentration d'actif inhibant toute croissance bactérienne visible à l'œil nu à 37°C pendant 18h.

Puis, un suivi de croissance d'*E. coli* a été réalisé par dénombrement à 0h, 1h, 2h, 4h et 6h en présence du mélange HE ou de la colistine à concentrations CMI, CMI/2 et CMI/4. Dans un second temps, le même suivi de croissance a été mesuré mais cette fois après 90 min de contact, les deux agents antibactériens ont été éliminés du milieu par centrifugation. En effet, il s'agit de mesurer la capacité de récupération bactérienne. C'est l'écart de population bactérienne mesuré à partir du temps initial correspondant à l'élimination des substances antibactériennes, jusqu'à 24h. Les deux essais ont été réalisés en 2 expériences indépendantes.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

FIGURE 1 : CAPACITÉ D'INHIBITION DE CROISSANCE DE 3 CONCENTRATIONS DE MÉLANGE HE (A), OU DE COLISTINE (B) SUR *E. COLI*, PENDANT 4H

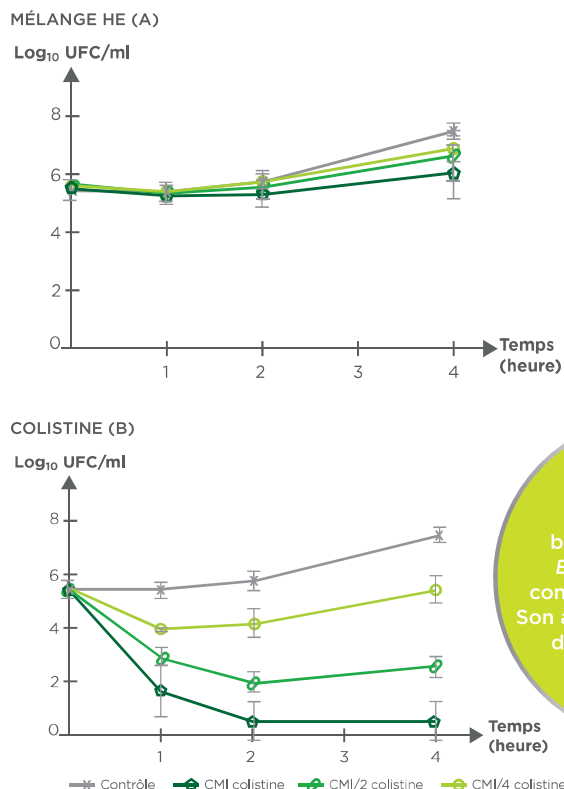
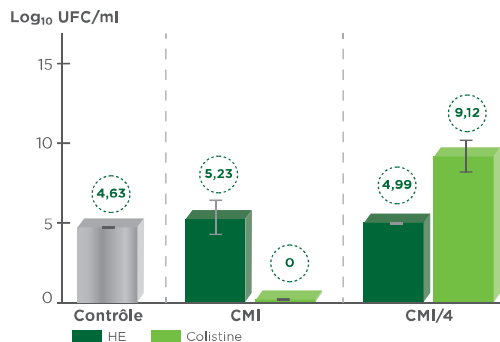


FIGURE 2 : CAPACITÉ DE RÉCUPÉRATION D'*E. COLI* (LOG₁₀ UFC/ML), APRÈS UNE EXPOSITION DE 90 MIN AU MÉLANGE HE, OU À LA COLISTINE



E. coli exposée à la CMI de la colistine ne montre aucune capacité de récupération, due probablement à l'activité bactéricide de l'antibiotique. Exposée au mélange HE à CMI et CMI/4, la souche bactérienne montre la même capacité de récupération que le contrôle. En revanche, la population d'*E. coli* est 1,83 fois supérieure au contrôle après exposition à la colistine à sa CMI/4. Ce phénomène a déjà été rapporté sur des souches Gram négatif exposées à des concentrations sub-CMI de colistine (Owen et al., 2007). Si le mécanisme sous-jacent est inconnu à ce jour (Bergen et al., 2012), une modification du métabolisme bactérien comme dans le cas de la persistance bactérienne (Martinez et Rojo, 2011), pourrait expliquer cette croissance.

Contrairement à la colistine, le mélange HE ne modifie pas la capacité de récupération d'*E. coli* à concentrations sub-CMI

CONCLUSION

Cette étude démontre l'activité bactériostatique du mélange HE même à des concentrations sub-CMI. Cette activité est dépendante de la concentration. Des concentrations sub-CMI de colistine semblent modifier le métabolisme bactérien et augmentent la capacité de récupération d'*E. coli*, contrairement au mélange HE. Cette étude devrait être complétée par des travaux sur l'identification des modes d'action du mélange HE.

RÉFÉRENCES

- LIU Y. ET AL., (JUL. 2013), "Effect of citrus lemon oil on growth and adherence of *Streptococcus mutans*", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 29, no. 7, pp. 1161-1167.
- OWEN R. J., LI J., NATION R. L. ET SPELMAN D., (Janv. 2007), "In vitro pharmacodynamics of colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates", *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 59, no. 3, p. 473-477.
- BERGEN P. J. ET AL., (NOV. 2012), "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 'old' polymyxins: what is new?", *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 74, no. 3, p. 213-223.
- MARTINEZ J. L. ET ROJO F., (Sept. 2011), "Metabolic regulation of antibiotic resistance", *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 35, no. 5, p. 768-789.

IMPACT D'UN EXTRAIT D'ALGUE SUR LA SANTE DIGESTIVE ET LES PERFORMANCES DE PONTE EN DINDE REPRODUCTRICE

Bussy Frédéric¹, Le Goff Matthieu¹, Quero Benoit²

¹*Olmix group - ZA du haut du bois - 56580 BREHAN*

²*R&D Breizh – 56930 PLUMELIAU*

animalcare.ts@olmix.com

RÉSUMÉ

Le système hépatique des dindes reproductrices est fortement sollicité notamment en fin de période de ponte. Celui-ci a besoin d'être régulièrement drainé et stimulé afin de maintenir l'état de santé et les performances de ponte. Dans ce contexte, Olmix a développé un produit (DigestSea) contenant le MSP Lipids (Polysaccharide Sulfaté Marin), issu de macro algues. Pour étudier l'impact de ce complément sur l'état des foies et les conséquences sur les performances de ponte, un essai a été réalisé pendant 6 semaines sur deux bâtiments d'environ 2000 dindes chacun en fin de ponte (des semaines 23 à 28 de ponte). Le lot contrôle a reçu un complément contenant de la choline et du sorbitol à raison de 1L pour 1000L d'eau tandis que le lot test a reçu le produit commercial à raison de 0,5L/1000L d'eau. Les produits ont été distribués pendant 10 jours à partir de la semaine 23 puis pendant 5 jours en semaine 27 de ponte. Les performances de ponte ont été mesurées hebdomadairement. Des analyses histologiques ont été réalisées sur 20 foies de chaque groupe à l'abattage (semaine 28). Elles ont mis en évidence une diminution significative de l'hyperplasie des canaux biliaires mais également de la leucostase au niveau des capillaires sanguins situés dans les espaces portes ($P<0,01$) dans le groupe test. La réduction de l'hyperplasie permet d'améliorer l'excrétion de la bile et ainsi d'améliorer l'activité enzymatique. De plus l'augmentation du flux sanguin via la réduction de la congestion et la leucostase des capillaires sanguins a permis d'améliorer les échanges hépatiques des nutriments mais aussi l'élimination des toxines présentes au niveau du foie. Au niveau des performances zootechniques, l'essai a mis en évidence une augmentation du taux de ponte dans le groupe test par rapport au contrôle (+0,5 œuf/dinde/semaine). L'administration du produit a permis d'améliorer le métabolisme hépatique mais également les performances de ponte.

ABSTRACT

Impact of an algae extract on the digestive health and laying performance of breeding turkeys

The hepatic system of breeding turkeys is highly solicited specifically at the end of the egg production period. Therefore, the digestive system needs to be regularly drained and stimulated in order to maintain health status and egg production. In this context, Olmix has developed a product (DigestSea) containing the MSP anti-hyperlipidemic (Marine Sulfated Polysaccharide), extracted from macroalgae. A trial was carried out during 5 weeks on two buildings with 2000 turkeys each, to evaluate the impact of this complement on liver function and laying performance (from week 23 to week 28 of egg production period). The control group received choline and sorbitol at 1L /1000L of drinking water while the test group received only the commercial product at 0.5L/1000L of drinking water. The products were distributed during 10 days from the week 23 and during 5 days on week 27 of laying. Egg production was monitored weekly. Histological evaluation was performed on 20 livers from each group at slaughter (week 28). Histological examination of the test group showed a significant reduction of the biliary canal hyperplasia and leukocytosis of the blood capillaries present in the portal area ($P<0.01$). The decreased hyperplasia allowed an improvement of the biliary excretion and thereby an improved enzymatic activity. In addition, the increased blood flow due to the reduction of the congestion and leukocytosis on blood capillaries, improved the hepatic substance exchanges (nutrients and toxins). The figures showed an increase in egg production in the test group compared to control (+0.5eggs/turkey/week). The product administration improved hepatic metabolism and thus laying performance.

INTRODUCTION

Le système hépatique des dindes reproductrices est fortement sollicité notamment en fin de cycle de production. Il doit faire face à de nombreux challenges : fourniture des nutriments nécessaires aux besoins d'entretien, à la formation des œufs... C'est pourquoi, des cures régulières sont effectuées en élevage afin de drainer et détoxifier les organes digestifs de manière à limiter les risques d'encombrement et donc de baisse d'efficacité digestive. Dans ce contexte, Olmix a développé un produit composé principalement d'un polysaccharide sulfaté marin (MSP Lipids) aux propriétés anti-hyperlipidémiques. Cet extrait issu de macroalgues, permet de stimuler le métabolisme hépatique et notamment l'excrétion ainsi que la sécrétion d'acides biliaires (Qi *et al.*, 2012 ; Qi *et al.*, 2015 ; Pengzhan *et al.*, 2003).

Pour étudier l'impact de ce produit sur l'efficacité digestive d'animaux fortement sollicités, un essai a été réalisé sur des dindes reproductrices en fin de cycle de ponte.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux

Deux lots de dindes reproductrices, de génétique Aviagen BUT 6, ont été répartis aléatoirement dans deux bâtiments de ponte identiques. La conduite des animaux dans les deux bâtiments a été identique (management, aliment, historique). Le lot contrôle a reçu un complément alimentaire contenant de la choline et du sorbitol à raison de 1L pour 1000L d'eau tandis que le lot test a reçu le produit (DigestSea) composé principalement du MSP Lipids, à raison de 0,5L/ 1000L d'eau. Les deux compléments ont été administrés pendant 10 jours à la semaine 23 (J157 à J166) puis pendant 5 jours la semaine 27 de ponte (J188 à J192).

1.2. Mesures

La production d'œufs a été suivie hebdomadairement dans les deux bâtiments du début de ponte jusqu'à l'abattage.

Une analyse histologique a été réalisée sur 20 foies de chaque groupe. Les sections ont été teintées avec de l'hématoxyline et de l'éosine (H&E). Les cellules hépatiques comme les hépatocytes et les cellules de Kupffer, ainsi que les zones spécifiques comme les espaces portes et les capillaires sanguins ont été évalués histologiquement. L'intégrité des capillaires sanguins, des espaces portes et des cellules de Kupffer a fait l'objet d'une notation de 0 à 4, correspondant respectivement à absence de dommages à dommages sévères.

1.3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R via le test de Mann-Whitney (risque $\alpha = 5\%$).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Histologie

Aucune différence n'a été observée entre les deux groupes en termes de taille et conformation des hépatocytes (résultats non montrés). Néanmoins, la congestion (excès de sang) des capillaires est significativement plus élevée dans le groupe contrôle que dans le groupe test ($P < 0,05$, Tableau 1). Ceci indique que le MSP Lipids améliore le flux sanguin hépatique favorisant ainsi l'élimination des toxines présentes à ce niveau, mais améliorant aussi les apports en nutriments à destination du foie tout comme le flux des métabolites produits à destination des autres organes. Cette hypothèse est confirmée par l'analyse du nombre de vacuoles lipidiques dans les hépatocytes, leur taille étant réduite dans le groupe test par rapport au contrôle sans que leur nombre ne varie (Figure 1).

Les analyses histologiques ont par ailleurs mis en évidence une diminution significative de l'hyperplasie des canaux biliaires ($P < 0,05$) sans autre modification des espaces portes (Tableau 2). L'hyperplasie, qui correspond à une croissance anormale des cellules, conduit à la réduction de la lumière du canal biliaire et donc à une diminution de l'excrétion de bile (Gall *et al.*, 1990). Chaque espace porte contient un canal biliaire, une artère hépatique et une veine. L'hyperplasie des canaux biliaires n'affecte pas le flux sanguin comme l'indique la réduction significative de la leucostase au niveau des capillaires sanguins situés dans les espaces portes ($P < 0,01$). De plus, l'inflammation du tissu lymphoïde résiduel est identique entre les deux groupes. Un résultat similaire est observé pour les macrophages hépatiques appelés cellules de Kupffer, confirmant ainsi l'absence d'induction d'une inflammation par le MSP Lipids (Tableau 3). Par ailleurs, une atteinte des hépatocytes conduit à une hyperplasie des cellules ovales, situées à proximité immédiate des espaces portes, dont le rôle est de se différencier en hépatocytes pour régénérer le foie (Laperche, 2003). Aucune hyperplasie significative de ces cellules n'est observée dans le groupe test ce qui signifie qu'aucune atteinte des hépatocytes n'est observée dans ce groupe.

Au final, l'utilisation du MSP Lipids a amélioré le flux sanguin intra-hépatique, sans altérer le fonctionnement des différents types cellulaires hépatiques ni induire d'inflammation. Il a un effet positif constaté sur la taille des vacuoles lipidiques et réduit la leucostase et la congestion.

2.2. Performances de ponte

Lors des semaines précédant l'essai, les performances de ponte des deux groupes étaient identiques ($P = 1$, Tableau 4). Une diminution des performances de

ponte a été observée dans les deux groupes entre la période précédant l'essai et la période de l'essai. Cette diminution est observée en fin de cycle de ponte après 20 semaines de production (Sauveur, 1988). L'administration du MSP Lipids a permis une augmentation de la production d'œufs de +0,5 œuf/dinde/semaine ($p < 0.05$) par rapport au contrôle.

L'administration du MSP Lipids a été favorable à l'état des foies des dindes reproductrices, reflété par un meilleur métabolisme lipidique, lors d'une période de production critique (fin de ponte). En conséquence, une amélioration des performances de ponte (+0,5 œuf/dinde/semaine) a été observée, soulignant l'intérêt et l'importance d'un drainage et d'une détoxification appropriés chez les reproducteurs.

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Gall J. A. M., Bhathal P. S., 1990, Liver, (10), 106-115.
 Laperche Y., 2003. Med.Sci., (19), 697-698.
 Pengzhan Y., Ning L., Xiguang L., Gefei Z., Quanbin Z., Pengcheng L., 2003. Pharmacol. Res., (48), 543-549.
 Qi H., Huangc L., Liud X., Liua D., Zhangb Q., Liua S., 2012. Carbohydr. Polym., (87), 1637– 1640.
 Qi H., Sheng J., 2015. Mar. Drugs, (13), 3407-3421.
 Sauveur B., 1988. INRA, 1- 455.

Tableau 1. Notation histologique des capillaires sanguins (moyenne $\pm$ écarts type ; N=20/groupe)

		Contrôle	Test	P-value
Capillaires sanguins (hors espaces portes)	Congestion	1,19 $\pm$ 0,4	1,00 $\pm$ 0,1	0,03
	Leucostase	1,14 $\pm$ 0,4	1,00 $\pm$ 0,1	0,07
Capillaires sanguins (dans les espaces portes)	Congestion	1,14 $\pm$ 0,4	1,00 $\pm$ 0,1	0,07
	Leucostase	1,10 $\pm$ 0,6	0,05 $\pm$ 0,2	4,52 ^e -8

Tableau 2. Notation histologique des canaux biliaires et des tissus lymphoïdes dans les espaces portes (moyenne $\pm$ écarts type ; N=20/groupe)

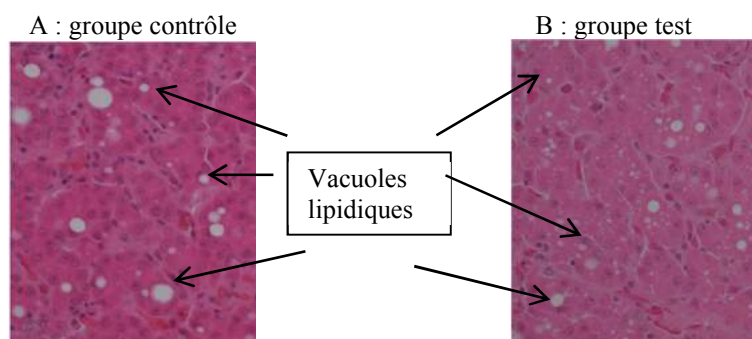
		Contrôle	Test	P-value
Canaux biliaires	Hyperplasie des cellules ovals	1,00 $\pm$ 0,4	0,95 $\pm$ 0,2	0,69
	Hyperplasies des canaux biliaires	0,67 $\pm$ 0,7	0,18 $\pm$ 0,4	0,007
	Hyperplasie des tissus lymphoïdes	0,90 $\pm$ 0,9	0,68 $\pm$ 0,9	0,37

Tableau 3. Notation histologique des cellules de Kupffer (moyenne $\pm$ écart type ; N=20/groupe)

		Contrôle	Test	P-value
	Hyperplasie	0,57 $\pm$ 0,6	0,33 $\pm$ 0,5	0,25
	Surcharge	1,00 $\pm$ 0,1	0,91 $\pm$ 0,3	0,17

Tableau 4. Performances de ponte (moyenne $\pm$ écart type ; N=20/groupe)

	Contrôle	Test	P-value
Nombre d'œufs / semaine / dinde avant l'essai	4,4	4,4	-
Nombre d'œufs / semaine / dinde pendant l'essai	3,5 $\pm$ 0,18	4,0 $\pm$ 0,26	0,025

Figure 1. Analyse histologique des vacuoles lipidiques présentes au niveau des hépatocytes pour le groupe contrôle (A) et test (B). (Grossissement identique : x400)

Impact d'un extrait d'algue sur la santé digestive et les performances de ponte en dinde reproductrice



BUSSY Frédéric¹, LE GOFF Matthieu¹, QUERO Benoit²

¹OLMIX SA – ZA du haut du bois - 56580 Bréhan, France, animalcare.ts@olmix.com

²R&D Breizh – 56930 Plumeliau

INTRODUCTION

En fin de ponte, le système hépatique de la dinde est très sollicité :

- Fourniture des nutriments
- Encombrement des organes digestifs
- Formation des oeufs
- Hyperplasie

Dans ce contexte, Olmix a développé le DigestSea, composé principalement d'un polysaccharide sulfaté marin (MSP Lipids) aux propriétés anti-hyperlipidémiques. Les résultats d'un essai sur 2 lots de 2000 dindes chacun en fin de ponte sont présentés ci-dessous.



MATERIELS ET METHODES

➤ Animaux

2 lots de dindes reproductrices (génétique Aviagen BUT 6), répartis aléatoirement dans 2 bâtiments de ponte identiques, et dans les mêmes conditions. Chaque lot a reçu :

- Lot 1 contrôle : [choline + sorbitol] à 1L pour 1000L d'eau
- Lot 2 test : **DigestSea** à 0,5L pour 1000L d'eau

➤ Mesures

- Suivi hebdomadaire de la production d'œufs
- Analyse histologique sur 20 foies de chaque lot (teintés à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E)). Les cellules hépatiques, cellules de Kupffer, ainsi que les espaces portes et les capillaires sanguins ont été évalués.
- Statistiques : test de Mann-Whitney ($\alpha = 5\%$)

RESULTATS ET DISCUSSION

❖ Histologie

		Lot contrôle [choline + sorbitol] à 1/1000L	Lot test DigestSea à 0,5/1000L	P-value
Capillaires sanguins (hors espaces portes)	Congestion	1,19 ± 0,4	1,00 ± 0,1	0,03
	Leucostase	1,14 ± 0,4	1,00 ± 0,1	0,07
Capillaires sanguins (dans espaces portes)	Congestion	1,14 ± 0,4	1,00 ± 0,1	0,07
	Leucostase	1,10 ± 0,6	0,05 ± 0,2	4,52 ^{e-8}
Hyperplasie des canaux biliaires		0,67 ± 0,7	0,18 ± 0,4	0,007
Hyperplasie des tissus lymphoïdes		0,90 ± 0,9	0,68 ± 0,9	0,37

Moyenne des notations de 0 à 4, correspondant respectivement à « absence de dommages » et « dommages sévères »

➤ Réduction de la congestion

- Amélioration du flux sanguin
- Élimination des toxines + apports en nutriments

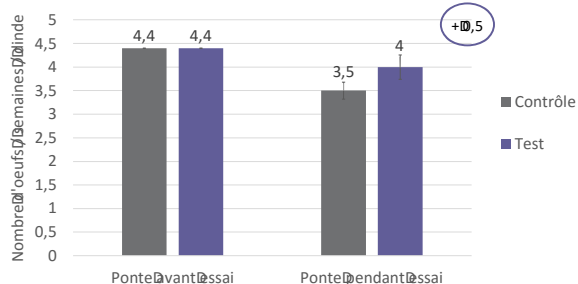
➤ Diminution de l'hyperplasie des canaux biliaires

- Augmentation de la lumière des canaux biliaires
- Augmentation de l'excrétion de bile

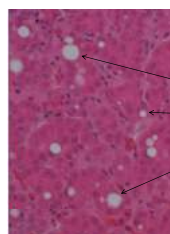
➤ Réduction de la leucostase

➤ Réduction de la taille des vacuoles lipidiques

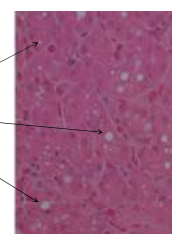
❖ Performance de ponte



A : Lot contrôle



B : Lot test



Section de foie (x400)

CONCLUSION

- ✓ Meilleur métabolisme lipidique (amélioration de l'état du foie)
- ✓ Amélioration des performances de ponte (+0,5 œuf / dinde / semaine)
- ✓ Mise en évidence de l'intérêt d'un drainage et d'une détoxification chez les reproducteurs.

UN EXTRAIT D'ALGUE AMELIORE LA REPONSE VACCINALE CONTRE LE VIRUS DE LA MALADIE DE NEWCASTLE ET LES PERFORMANCES DE PRODUCTION CHEZ LA POULE

Matthieu Le Goff¹, Frédéric Bussy¹

¹OLMIX Group – ZA du haut du bois – 56580 BREHAN,
animalcare.ts@olmix.com

RÉSUMÉ

En volaille, la maladie de Newcastle (ND) peut entraîner d'importantes pertes économiques. La vaccination et le renforcement immunitaire permettent de mieux protéger les animaux. Dans ce contexte, plusieurs essais terrains sur poulettes, pondeuses et poulets de chair ont été conduits pour évaluer l'impact d'un produit commercial composé principalement d'un extrait d'algue (MSP Immunity) administré via l'eau de boisson, sur les performances zootechniques et la réponse vaccinale au virus de la maladie de Newcastle (NDV). Dans le premier essai, réalisé sur poulettes, un vaccin vivant contre NDV a été administré à J35 et J91. Puis, un rappel via un vaccin inactivé a été réalisé à J105. Chaque administration vaccinale a été encadrée d'une distribution du MSP Immunity (un jour avant et deux jours après). Les prises de sang ont été réalisées avant chaque vaccination et après le transfert en bâtiment de ponte. Le deuxième essai sur pondeuses a été réalisé pendant 14 semaines à partir de l'entrée en ponte. Le MSP Immunity a été administré 3 fois, pendant 3 jours consécutifs : au transfert, à 50 % de ponte puis au pic de ponte. Des prises de sang ont été réalisées au moment du transfert, au pic de ponte et 7 semaines après. Dans le troisième essai sur poulets de chair, le MSP Immunity a été distribué au démarrage pendant 3 jours puis en encadrant chaque vaccination (J9 et J22). Des échantillons de sang ont été collectés à l'arrivée des poussins, puis à 8, 14, 21 et 35 jours d'âge. Dans tous les essais, les sérums ont été prélevés sur 20 individus par groupe pour analyser les titres ELISA d'anticorps anti-NDV (kit ID Biotech). Les résultats obtenus mettent en évidence que l'association de la vaccination contre NDV avec la prise orale de MSP Immunity améliore la qualité de la réponse vaccinale globale de l'élevage, comme le souligne la diminution significative des coefficients de variation des titres en anticorps comparativement au groupe contrôle. De plus certaines des performances zootechniques sont améliorées.

ABSTRACT

An algae extract improved vaccine response against Newcastle Disease and zootechnical performance in poultry

Newcastle disease (ND) can cause important economic losses in poultry farms. Animal protection can be achieved via the implementation of vaccination programs and the improvement of the immune function. In this context, 3 field trials conducted in layers, pullets and broilers were set up in order to evaluate the impact of a commercial product containing an algae extract (MSP Immunity), distributed via the drinking water, on performance and on the reinforcement of the adaptive immune response against ND. The first trial was performed in pullets, 2 live ND vaccines were administered respectively at 35 and 91 days old. Then one inactive ND vaccine was performed at 105 days old. Around each vaccination, the MSP Immunity was supplied during 3 days (one day before and two days after vaccination). Blood samples were taken before each ND vaccine and after the transfer to the laying building. The second trial took place in a layer farm from the transfer day of the layers and lasted 14 weeks. The MSP Immunity was administered 3 times, during 3 consecutive days at the transfer, at 50% of laying rate and at the egg production peak. Blood samples were collected the week after arrival, at the egg production peak and 7 weeks later. In the last trial (in a broiler farm), the MSP Immunity was administered 3 days during the first week of life and around both ND vaccines (D9 and D22). Blood samples were collected at chick arrival and then at D8, 14, 21 and 35. In these 3 trials, all blood samples were collected on 20 animals per group in order to analyze anti-NDV antibodies ELISA titer (ID Biotech kit). These trials allowed to prove the potency of the MSP Immunity on vaccine response as a better homogeneity of ND antibody titers (lower coefficient of variation) was measured in the test groups when compared to the control groups. Moreover, zootechnical performances were improved.

INTRODUCTION

La maladie de Newcastle est une maladie virale hautement pathogène pouvant affecter l'ensemble des volailles. Elle est provoquée par certains paramyxovirus aviaires de sérotype 1 (Rauw *et al*, 2009). Les signes cliniques de cette maladie varient fortement selon l'espèce atteinte ainsi que la souche virale et entraînent de lourdes pertes économiques (mortalité, baisse des performances, coûts de la prophylaxie...). Les mesures de biosécurité sont essentielles pour prévenir l'infection. De surcroît la vaccination est une précaution visant à limiter les manifestations cliniques, dont la mortalité, au moment de l'épidémie et à réduire la transmission.

Dans ce contexte, Olmix cherche à évaluer si l'administration d'un extrait d'algue ayant des activités immunomodulatrices (MSP Immunity, Berri *et al*, 2016) peut améliorer la qualité de la prise vaccinale ainsi que les performances de production de différentes volailles dans des zones à forte pression sanitaire.

1. MATERIELS ET METHODES

1. Essai n°1 sur poulettes

Trois bâtiments de poulettes (souche Hy-Line), ont été suivis de l'arrivée des poussins jusqu'à 16 semaines d'âge (i.e. : transfert en bâtiment de ponte). La même prophylaxie vaccinale contre ND a été effectuée dans les 3 bâtiments : J35 et J91 avec un vaccin vivant (Avinew®) administré via nébulisation puis à J105 avec un vaccin inactivé (Gallimune 302®) administré par injection. 2 bâtiments de 20 400 poulettes chacun ont reçu une supplémentation vitaminique, tandis que le troisième, de 18 500 poulettes, a reçu le produit commercial (Searup®) contenant principalement le MSP Immunity en deux prises un jour avant et deux jours après chaque vaccination contre NDV.

La consommation alimentaire a été mesurée quotidiennement pendant toute la durée de l'essai. Des prises de sang ont également été effectuées sur 20 poulettes de chaque bâtiment, une semaine avant le premier vaccin contre NDV, puis entre chaque rappel vaccinal. Une dernière série de prises de sang a été réalisée après le transfert en bâtiment de ponte (à 30 semaine d'âge).

2. Essai n°2 sur poules pondeuses

Cet essai a été réalisé dans une exploitation commerciale, de l'entrée des poules dans les bâtiments de ponte (à 18 semaines d'âge) jusqu'à la semaine 31 (soit pendant une durée de 14 semaines). Cent onze mille trois cents poules de souche Lohmann, issues du même élevage de poulettes, ont suivi le même programme prophylactique avec un

rappel NDV à 17 semaines d'âge (soit une semaine avant le transfert) via un vaccin inactivé injecté (Gallimune 302®). Au transfert, elles ont été réparties dans 2 bâtiments identiques (un bâtiment contrôle de 55 200 poules et un bâtiment test de 56 100 poules). Le bâtiment test a reçu le MSP Immunity à raison de 0,5L / 1000L d'eau de boisson, pendant 3 jours consécutifs : au transfert (17 semaines d'âge), à 50 % de ponte (20 semaines d'âge) puis au pic de ponte (28 semaine d'âge).

Afin de suivre l'état de santé des poules, des prises de sang ont été réalisées au transfert, au pic de ponte et 7 semaines après. Les performances de ponte ont été enregistrées quotidiennement pendant toute la période de l'essai.

3. Essai n°3 sur poulets de chair

Deux bâtiments de 20 000 poulets de souche ROSS ont été suivis de l'arrivée des poussins jusqu'à l'abattage (J35). Les deux bâtiments ont été soumis à la même prophylaxie vaccinale, à savoir un vaccin atténué contre ND (Nobilis ND clone 30®) à J9 puis un rappel avec un vaccin vivant (CEVAC New L®) à J22. Les deux vaccins ont été administrés via l'eau de boisson. En plus de cette prophylaxie, un bâtiment a reçu le MSP Immunity à l'arrivée des poussins pendant 3 jours à raison de 1L/1000L d'eau de boisson, puis un jour avant et deux jours après la vaccination contre NDV suivants) à raison de 0,5L/1000L d'eau de boisson. Un second bâtiment identique mis en place en même temps a servi de contrôle. Du sang a été collecté à l'arrivée des poussins, puis à 8, 14, 21 et 35 jours d'âge dans chaque bâtiment.

1.4. Sérums

Dans les trois essais, les titres d'anticorps ND ont été analysés en utilisant un même kit Elisa (Biocheck, Inc). Les titres d'anticorps ont été obtenue via la méthode de calcul décrite dans le manuel du kit Biocheck.Inc via la fonction antilog.

1.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R via le test de Mann-Whitney (risque $\alpha = 5\%$).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Lors des trois essais aucun épisode infectieux n'a été observé par les vétérinaires réalisant le suivi sanitaire des élevages.

Dans l'essai n°1 sur poulettes, aucun effet significatif n'a été observé au niveau des moyennes des titres d'anticorps après vaccination contre NDV entre le groupe testé recevant le MSP Immunity et le groupe

contrôle, mais une diminution des coefficients de variation (Figure 1) notamment entre le vaccin et le premier rappel effectué à J91. Cette meilleure homogénéité du coefficient de variation (CV inférieur à 50 pour le groupe test contre CV supérieur à 80 pour le contrôle) pourrait refléter une meilleure prise vaccinale contre ND dans le groupe test comparé au contrôle. En effet la prise vaccinale peut être considérée comme mauvaise pour le groupe contrôle contre moyenne pour le groupe test (Salek, 2016). Afin de conforter cette hypothèse une infection d'épreuve pourrait être réalisée.

Les performances (consommation, gain de poids) sont équivalentes dans les deux groupes. Toutefois, une diminution de la mortalité a été observée dans le groupe test (-0,94 points).

Les résultats de l'essai n°2 réalisé en poules pondeuses montrent par contre une amélioration significative des performances de ponte (nombre d'œufs total / poule pondeuse) dans le groupe test recevant le MSP Immunity comparé au contrôle (Tableau 2). Cette amélioration peut être expliquée en partie par une montée en ponte plus précoce (Figure 2). Concernant la réponse vaccinale anti-NDV, les titres d'anticorps étaient similaires entre les deux bâtiments en début de l'essai (résultats non montrés). Lors du pic de ponte, une diminution des titres en anticorps anti-NDV a été observée dans les deux bâtiments, mais plus importante dans le groupe contrôle (-4100 contre -1600 pour le groupe test). A 31 semaines d'âge, les titres d'anticorps se sont

stabilisés dans le groupe test alors que, dans le groupe contrôle, celui-ci a légèrement augmenté tout en restant inférieur au groupe test (-7%, résultats non montrés).

Dans l'essai n°3 sur poulets de chair, malgré un très bon transfert initial des anticorps maternels (titres à J1 supérieurs à 9 000), pour les deux groupes, test et contrôle, une meilleure homogénéité des CV pour les anticorps vaccinaux est ensuite observée avec la supplémentation en MSP Immunity (Figure 3). A J21 (soit après la première vaccination contre NDV), le coefficient de variation du groupe test est significativement plus faible comparé à celui du contrôle. Cette meilleure homogénéité est également observée à J35 (après le rappel). Aucune différence significative n'a été observée au niveau des taux d'anticorps moyens, même si les titres sont supérieurs dans le groupe test à J35.

CONCLUSION

Les résultats obtenus mettent en évidence le potentiel du produit dans l'homogénéisation de la prise vaccinale pour l'élevage, si l'on considère l'exemple de la vaccination contre NDV, puisque l'on constate une diminution significative des coefficients de variation des titres en anticorps spécifiques chez les animaux du groupe ayant reçu le MSP Immunity par rapport au groupe contrôle. De plus, certaines performances de production sont globalement améliorées au niveau de l'élevage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Berri M., Slugocki C., Olivier M., Helloin E., Jacques I., Salmon H., Demais H., Le Goff M., Nyvall Collen P., 2016. *J.Appl.Phycol.*, 28(5), 2 999-3 008.
- Raw F., Gardin Y., Van Den Berg T., Lambrecht B., 2009. *Biotechnol.Agron.Soc.Environ.*, 13(4), 587-596.
- Salek M., 2015. RPPA, 2015.

Tableau 1. Performances zootechniques des poulettes (souche Hy-Line) vaccinées contre le virus de Newcastle à J35 et J91 avec un vaccin vivant (Avinew®) administré via nébulisation puis à J105 avec un vaccin inactivé (Gallimune 302®) administré par injection. Le groupe test a reçu le MSP Immunity un jour avant et deux jours après chaque vaccination à raison de 0,5 L/1000L.

Test de Mann-Whitney (n=112).

	Contrôle	Test	P-value
Consommation alimentaire quotidienne (g/jour/poulette)	290	280	NS
Gain moyen quotidien (g/j)	11	11	NS
Mortalité (%)	2,29	1,35	-

Tableau 2. Performance de ponte des poules pondeuses (souche Lohmann) de l'entrée des poules dans les bâtiments de ponte (à 18 semaines d'âge) jusqu'à la semaine 31 (soit pendant une durée de 14 semaines). Le groupe test a reçu le MSP Immunity à raison de 0,5L / 1000L d'eau de boisson, pendant 3 jours consécutifs : au transfert (17 semaines d'âge), à 50 % de ponte (20 semaines d'âge) puis au pic de ponte (28 semaine d'âge).

Test de Mann-Whitney (n=98).

	Contrôle	Test	P-value
Taux de ponte (%)	81,45	82,25	NS
Nombre total d'œufs/ poule pondeuse	74,56	75,35	<0,05
Poids moyen des œufs (g)	57,44	57,59	NS

Figure 1. Evolution des titres d'anticorps ND des poulettes (souche Hy-Line), de 29 jours d'âge à 50 % de ponte (test de Mann-Whitney, *P-value <0,05). Le groupe test a reçu le MSP Immunity un jour avant et deux jours après chaque vaccination à raison de 0,5 L/1000L.

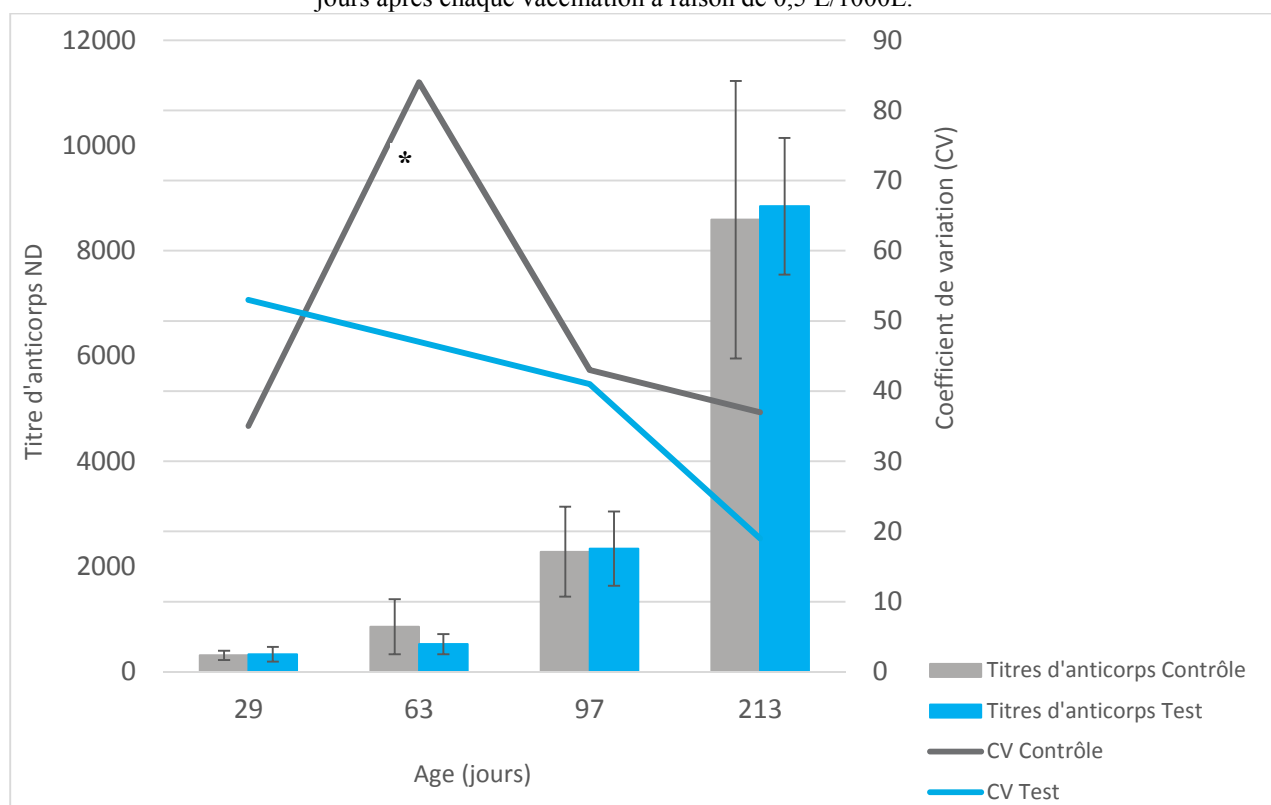


Figure 2. Evolution du taux de ponte des poules pondeuses (souche Lohmann) de l'entrée des poules dans les bâtiments de ponte (à 18 semaines d'âge). Le groupe test a reçu le MSP Immunity à raison de 0,5L / 1000L d'eau de boisson, pendant 3 jours consécutifs : au transfert (17 semaines d'âge), à 50 % de ponte (20 semaines d'âge) puis au pic de ponte (28 semaine d'âge).

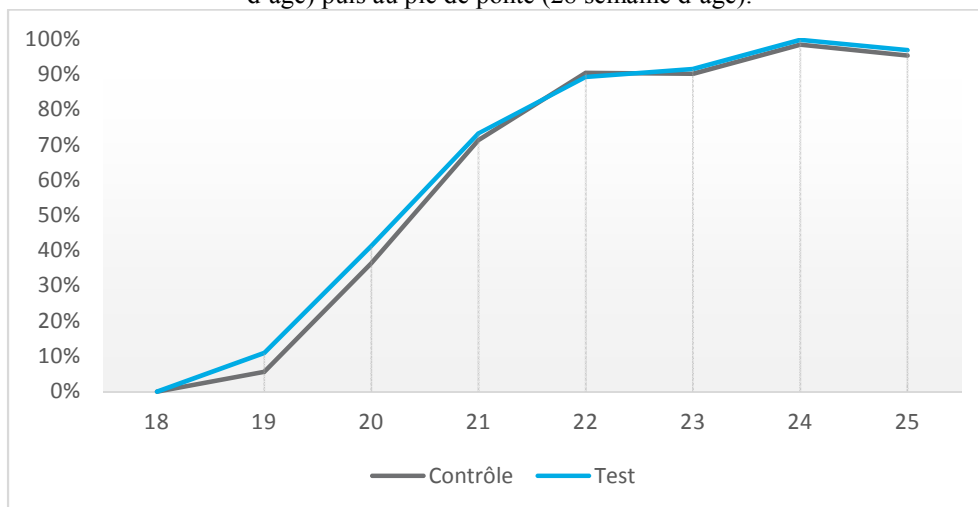
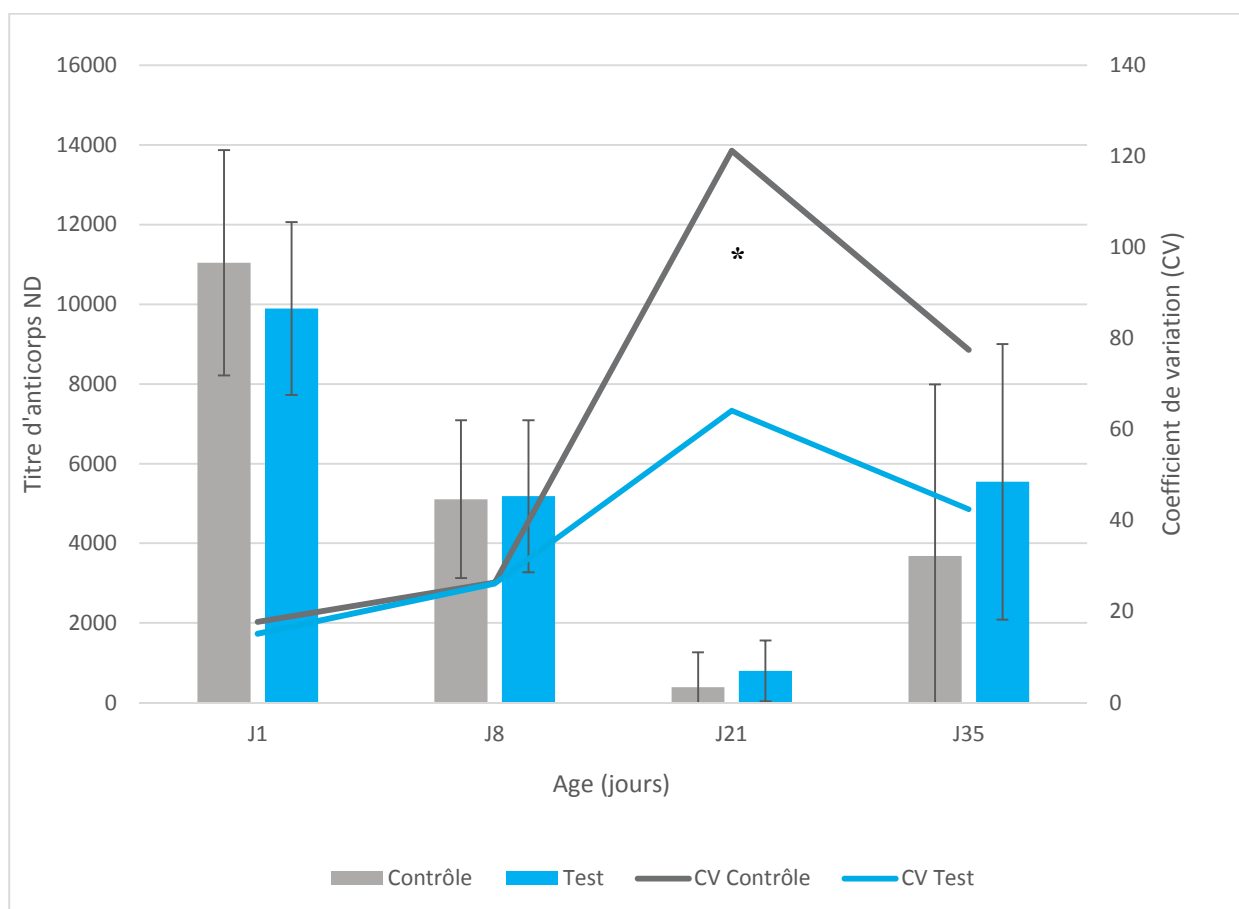


Figure 3. Evolution des titres d'anticorps ND des poulets de chair de souche ROSS suivis de D0 jusqu'à l'abattage (J35). Les deux bâtiments ont reçu un vaccin atténué contre ND (Nobilis ND clone 30®) à J9 puis un rappel via un vaccin vivant (CEVAC New L®) à J22. En plus de cette prophylaxie, le bâtiment test a reçu le MSP Immunity à l'arrivée des poussins pendant 3 jours à raison de 1L/1000L d'eau de boisson, puis un jour avant et deux jours après la vaccination contre NDV suivants) à raison de 0,5L/1000L d'eau de boisson. (Test de Mann-Whitney, *P-value <0,05)



UN EXTRAIT D'ALGUE AMELIORE LA REPONSE VACCINALE CONTRE LE VIRUS DE LA MALADIE DE NEWCASTLE



LE GOFF Matthieu¹, BUSSY Frédéric¹,

¹OLMIX SA – ZA du haut du bois - 56580 Bréhan, France
animalcare.ts@olmix.com

INTRODUCTION

- La maladie de Newcastle (ND) est une maladie virale affectant les volailles et pouvant entraîner de lourdes pertes économiques.
 - La vaccination est la mesure de biosécurité la plus utilisée mais n'est pas toujours fiable à 100%.
- Dans ce contexte, Olmix a évalué l'amélioration de la prise vaccinale ainsi que les performances de production de différentes volailles en administrant un extrait d'algue ayant des activités immunomodulatrices (**MSP^{IMMUNITY}**).

MATERIEL ET METHODES

Essai n°1 sur poulettes (Hy-Line) :

- 2 vaccins vivants à J35 et J91
- 1 vaccin inactivé à J105
- 3 bâtiments d'environ 20 000 poulettes
 - 2 bâtiments « contrôle »
 - 1 bâtiment « test »
- Administration du **MSP^{IMMUNITY}** autour de chaque vaccination (à 0,5ml/L) :
 - 1 jour avant
 - 2 jours après
- Prises de sang 1 semaine avant le premier vaccin, puis entre chaque rappel vaccinal.

Essai n°2 sur poules pondeuses (Lohmann) :

- 1 vaccin inactivé à 17 semaines d'âge (avant le transfert)
- 2 bâtiments d'environ 55 500 poules
 - 1 bâtiment « contrôle »
 - 1 bâtiment « test »
- Administration du **MSP^{IMMUNITY}** (à 0,5ml/L sur 3 jours consécutifs) :
 - Au transfert
 - À 50% de ponte
 - Au pic de ponte
- Prise de sang au transfert, au pic de ponte, et 7 semaines après.

Essai n°3 sur poulets de chair (ROSS) :

- 1 vaccin atténué à J9
- 1 vaccin vivant à J22
- 2 bâtiments d'environ 20 000 poulets
 - 1 bâtiment « contrôle »
 - 1 bâtiment « test »
- Administration du **MSP^{IMMUNITY}** :
 - À l'arrivée des poussins pendant 3 jours à 0,5ml/L
 - 1 jour avant et 2 jours après le vaccin à 1ml/L
- Prise de sang à l'arrivée des poussins, à 8, 14, 21 et 35 jours d'âge.

Dans chaque essai, la réponse vaccinale sur 20 individus par lot a été étudiée.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Fig 1. Evolution des titres d'anticorps ND des poulettes, de 29 jours d'âge à 50 % de ponte.

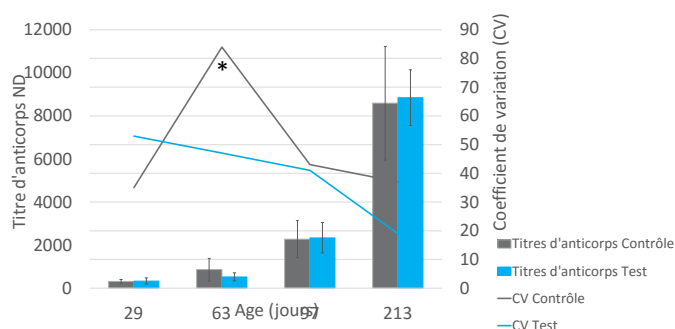
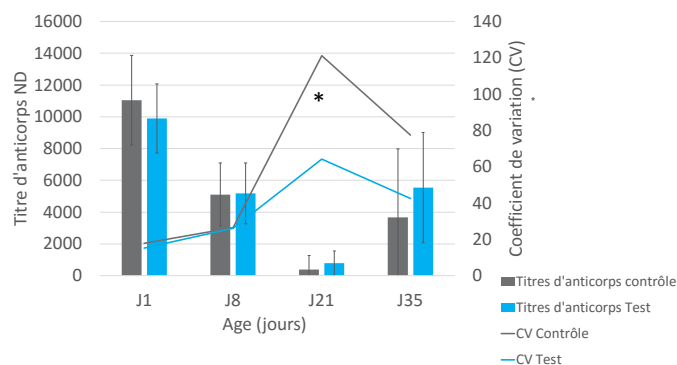
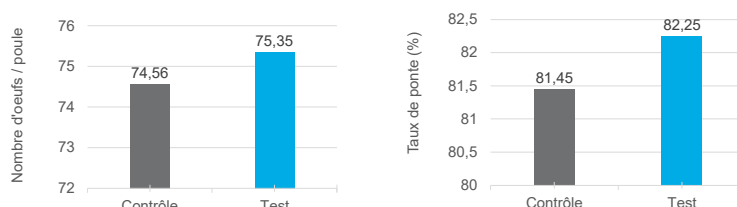


Fig 2. Evolution des titres d'anticorps ND des poulets de chair suivis de J0 jusqu'à l'abattage (J35).



Test de Mann-Whitney, *P-value <0,05

Fig 3 & 4. Evaluation du nombre d'œufs / poule pondeuse & du taux de ponte.



❖ Poules pondeuses

- Amélioration des performances de ponte
- Amélioration de la persistance des anticorps

❖ Poulettes / Poulets de chair

- Diminution du coefficient de variation
- Amélioration de l'homogénéité du statut immunitaire
- Meilleure prise vaccinale contre ND

CONCLUSIONS

- ✓ Amélioration de la prise vaccinale contre ND
- ✓ Amélioration des performances de production

UN EXTRAIT D'*ULVA* SP. STIMULE *IN VITRO* DES CELLULES DE L'IMMUNITÉ INNÉE DE POULETS DE CHAIR

Bussy Frédéric¹, Gouin Christelle¹, Guriec Nathalie², Quero Benoit³, Le Goff Matthieu¹, Nyvall-Collen Pi¹

¹OLMIX GROUP - ZA du Haut du Bois - 56580 BREHAN,

²UNIVERSITE de BRETAGNE OCCIDENTALE - 3 rue des archives - 29238 BREST,

³R&D Breizh – 56930 PLUMELIAU

fbussy@olmix.com

RÉSUMÉ

Avec l'augmentation de l'antibio-résistance dans le monde de plus en plus de mesures sont mises en place afin de raisonner l'utilisation d'antibiotiques. Un exemple est le plan Français Ecoantibio 2017 qui vise à réduire leur utilisation en médecine vétérinaire de 25% en 5 ans. Pour répondre à ces objectifs, différentes solutions stimulant l'immunité des animaux d'élevages sont étudiées.

Cette étude évalue l'action d'un extrait obtenu à partir d'*Ulva armoricana*, récoltée en Bretagne (France), et contenant des polysaccharides sulfatés, sur les hétérophiles et monocytes aviaires *in vitro*.

Les cellules aviaires sont purifiées à partir de sang périphérique de poulets de souche Ross 308 de 28 jours d'âge élevés en conditions standard. Le risque sanitaire a été évalué par un vétérinaire avant les prélèvements. Un suivi vétérinaire jusqu'à l'abattage a aussi été réalisé. L'extrait induit une activation statistiquement significative des hétérophiles, dose et temps dépendant ($p < 0,05$). La concentration nécessaire pour obtenir un effet maximal est de 50 µg/ml, soit 5 fois supérieure à celle du LPS, activateur connu des hétérophiles. Des résultats similaires sont obtenus pour la production de NO par les monocytes.

L'extrait utilisé permet d'activer *in vitro* les hétérophiles et les monocytes, cellules clefs de l'immunité innée des poulets. Des travaux sont en cours pour identifier les mécanismes d'action de l'extrait. D'autres seront nécessaires pour évaluer son efficacité *in vivo*.

ABSTRACT

Since antibiotic resistance is still increasing worldwide, more and more measures are taken to reduce antibiotic use. One example is the French plan Ecoantibio 2017, which aims to reduce the use of antibiotics in veterinary medicine by 25% within next 5 years. This requires new strategies to be developed to stimulate broilers' immunity. In this *in vitro* study, we evaluated an extract of *Ulva armoricana* harvested in Brittany containing sulfated polysaccharides on avian heterophils and monocytes cells. Heterophils and monocytes were purified from the blood of 28 days old broilers with a Ross 308 background outbred in standard conditions. The sanitary status was evaluated by a veterinarian before blood sampling and a follow up conducted until slaughtering. Determination of the oxidative burst and the glucuronidase activity allowed to demonstrate a statistically significant ($p < 0.05$) time and dose-dependent activation of heterophils by the extract. In parallel monocytes were induced to produce NO, also in a time and concentration dependent manner. The maximal effects were obtained for a 50 µg/ml concentration of the extract, that is five times more than the one required for LPS, a well-known activator of both neutrophils and monocytes. Studies are currently performed to analyze the mechanisms of action of the extract.

INTRODUCTION

L'antibio-résistance est désormais reconnue comme un problème majeur de santé publique. Dans son document de travail de 2009, la Commission Européenne a estimé que pour l'ensemble des États membres de l'Union, elle était responsable du décès de 25 000 patients chaque année. En outre, les coûts directs et indirects et les pertes annuelles de productivité induite par ce phénomène ont été évalués à 1,5 milliards d'euros. En conséquence, la France a choisi de mettre en place le plan Ecoantibio 2017 qui vise à réduire l'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire de 25% en 5 ans. Parmi les pistes envisagées pour atteindre cet objectif, la stimulation de l'immunité des animaux d'élevage par des macro-algues ou des fractions apparait comme un axe majeur de recherche. En effet, un certain nombre d'études ont démontré l'intérêt de ces algues *in vitro* et *in vivo* pour les porcs et les poissons d'élevage (Castro et al., 2006 ; Isnansetyo et al., 2016 ; Leonard et al., 2011). Cependant, peu d'entre elles se sont intéressées à l'immunité des poulets de chair. Dans le cas présent, l'action d'un extrait d'*Ulva armoricana*, récoltée en Bretagne (France), et riche en polysaccharides sulfatés, a été évaluée *in vitro* sur les hétérophiles et monocytes aviaires.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Obtention des cellules

Les cellules ont été purifiées à partir de sang périphérique de poulets de souche Ross 308 de 28 jours d'âge élevés en conditions commerciales avec les mêmes programmes alimentaires et de prophylaxie. Le risque sanitaire a été évalué par un vétérinaire avant les prélèvements. Un suivi vétérinaire jusqu'à l'abattage a aussi été réalisé. Il comprenait en outre le suivi des performances zootechniques (mortalité, Gain Moyen Quotidien, Indice de Consommation) ainsi que des visites régulières dans les élevages.

Après élimination des globules rouges par centrifugation en présence de méthylcellulose, les cellules mononuclées sont obtenues par centrifugation sur un gradient discontinu d'Histopaque 1.077-1.113, comme précédemment décrit (Farnell et al., 2003). Les hétérophiles ont été lavés en DPBS, repris en RPMI-1640 puis utilisés immédiatement pour les expériences de stimulation. Comme précédemment décrit et après purification, les hétérophiles sont repris en milieu RPMI-1640 medium glucose supplémenté avec 10mM HEPES et leur viabilité contrôlée par coloration au bleu trypan. Outre un contrôle visuel, la méthode de purification a été validée par recherche par RT-qPCR des ARNm de la myéloperoxydase, de la phosphatase alcaline, de la catalase, dont l'absence est caractéristique des neutrophiles aviaires (Stewart

et al., 2013, Kaiser P. 2012). La viabilité des cellules était >95%.

Les monocytes ont été purifiés à partir de l'anneau de cellules mononuclées par adhésion au plastic et « flushing » après 2h à température ambiante des cellules non adhérentes (thrombocytes) puis cultivés en RPMI-1640 supplémenté avec 10mM HEPES (He et al., 2003 ; He et al., 2011 ; Arsenault et al. 2013).

1.2 Obtention de l'extrait

Ulva armoricana, a été récoltée en Bretagne (France). L'extrait a été obtenu notamment après rinçage, broyage et ultra-filtrations sur des membranes adaptées puis déminéralisation (brevet n°FR 12 61909). L'absence d'endotoxines a été contrôlée à l'aide d'un kit dédié (E-toxateTM, Sigma) dont le seuil de détection est de 0.01U d'endotoxines/ml). L'extrait a été dissous en PBS et les dilutions effectuées en RPMI-1640 medium glucose.

1.3. Activation des cellules

Les hétérophiles sont ensemencés à une concentration de 8.10^6 cellules/ml et 100µl par puits dans une étuve à 41°C avec 5% de CO₂, (Kogut et al., 2005). Leur activation a été mise en évidence par la quantification dans les milieux conditionnés de l'activité enzymatique de la glucuronidase. Celle-ci est sécrétée lors de la dégranulation concomitante à l'activation (Genovese et al., 2013). Après incubation (4h à 41°C), l'activité enzymatique de la glucuronidase dans les milieux conditionnés est mesurée par dosage spectrophotométrique de la concentration en belliférone produite à partir d'un précurseur non fluorescent (4-méthylumbelliferyl-β-D- glucuronide, Sigma) à une concentration de 2,5mM, comme précédemment décrit (Kogut et al., 2005).

En parallèle, la mesure du burst oxydatif a été réalisée en utilisant un substrat fluorescent (diacétate dichlorofluorescéine) à une concentration finale de 10µg/ml. Les cellules sont pré-incubées 30 min avec le substrat avant l'ajout de l'extrait, comme précédemment décrit (Swaggerty et al., 2006). Ce mécanisme reflète une variation de la concentration intracellulaire en radicaux libres (ROS) induite par l'activation de l'hétérophile. Il entraîne le clivage du substrat et conduit à l'émission d'une fluorescence (Swaggerty et al., 2006). La concentration en oxyde nitrique, NO, dans les milieux conditionnés a été déterminée pour les monocytes à l'aide du réactif de Griess (He H., 2003). Toutes les expériences ont été réalisées en parallèle avec du glycogène à une concentration finale de 10 µg/ml comme témoin négatif. Le glycogène étant absent de l'extrait, il a été choisi comme témoin afin de s'assurer que la seule présence d'un polysaccharide n'entraînait pas l'activation des cellules étudiées. Le témoin positif était le LPS (Sigma) à une concentration finale de 10 µg/ml (He H., 2003 ; Farnell et al., 2003 ; St Paul et

al., 2013). Comme pour les hétérophiles, les monocytes ont été cultivés en milieu RPMI-1640 medium glucose dans une étuve à 5% de CO₂ à 41°C, comme précédemment décrit (He et al., 2003 ; He et al., 2011 ; Arsenault et al. 2013).

1.3. Analyses statistiques

Les comparaisons entre les groupes ont été réalisées à l'aide du test ANOVA1 avec correction de Bonferroni et du logiciel PRISM (p-value fixée à 5%). Les résultats sont donnés sous la forme moyenne +/- SEM.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Caractéristiques de l'extrait

Le dosage des protéines par la méthode de BCA using the Micro BC Assay Kit (Interchim, France) (Smith et al. 1985) a mis en évidence une teneur moyenne de 8.9% de la matière sèche. Les acides gras sont indécélabes lors d'un dosage selon la réglementation CE152/2009, dont le seuil de sensibilité est de 0,5g/100g. Le dosage de sucres neutres selon la méthode Dubois a révélé une teneur moyenne de 40.2% (+/-0.7), celui des acides uroniques selon Blumenkrantz et al. 1973 un taux moyen de 32.2% (+/-0.8). Les groupements sulfates liés aux sucres représentent quant à eux en moyenne 8.3% (+/-0.3), par quantification par la méthode de l'azure A (Jaques et al. 1968). L'analyse de la composition mono-saccharidique a été réalisée par chromatographie gazeuse de dérivés triméthylsilyl après méthanolyse acide pendant 4h dans 3 ML⁻¹ de MeOH/HCl à 100 °C par la méthode de Montreuil et al. (1986). L'analyse indique que l'extrait de polysaccharides sulfatés obtenu comprenait essentiellement du rhamnose, du xylose, les acides iduronique et glucuronique, composants classiquement présents dans l'ulvan. L'analyse par RMN proton de l'extrait montre un profil très proche de celui obtenu avec un ulvan traité par l'acide et valide la présence dans l'échantillon d'oligosaccharides avec une structure de type ulvan majoritaire.

2.2. Activation des hétérophiles

Les hétérophiles sont les équivalents des neutrophiles des mammifères. Ils constituent la première ligne de défense contre les infections microbiennes. L'extrait induit une libération de glucuronidase par les hétérophiles, tout comme le LPS (témoin positif) et contrairement au glycogène (témoin négatif). Cette sécrétion est dose et temps dépendant, avec un maximum à t=3h après la mise en contact avec

l'extrait, pour des concentrations de l'extrait 50µg/ml, soit 5 fois supérieure à celle du LPS (figure 1A). La glucuronidase dégrade l'acide glucuronique présent dans la paroi et la membrane plasmique des bactéries, ce qui réduit leurs capacités de survie (Genovese et al. 2013 ; Stewart et al. 2013). De plus, cette réponse à l'extrait s'accompagne d'un burst oxydatif des hétérophiles, comme en témoigne la libération de fluorescéine (figure 1B).

2.3. Monocytes

Le monocyte est la seconde famille d'acteurs intervenant dans l'immunité innée, de par sa capacité à produire du NO à activité bactéricide. L'extrait provoque une sécrétion statistiquement significative de NO par les monocytes. Comme pour les hétérophiles, le phénomène est dose et temps dépendant et l'effet maximal est obtenu pour une concentration de 50µg/ml (figure 2).

CONCLUSION

L'extrait contenant des polysaccharides sulfatés marin (MSP) permet d'activer en quelques heures *in vitro* les hétérophiles et les monocytes, cellules clefs de l'immunité innée des poulets. Des travaux sont en cours pour identifier les mécanismes d'action impliqués à la fois *in vitro* et *in vivo*, l'extrait ayant été inclus dans un produit commercialisé (Searup®) qui s'avère améliorer les performances zootechniques en élevage (Bussy et al. 2015a ; Bussy et al. 2015b).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arsenault R.J., Kogut M.H., He H. 2013. Cellular Signalling (25) 2246–2254.
- Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G., 1973. Anal. Biochem. (54) 484-489.
- Bussy F., Migné C., Quéro B., Le Goff M. 2015. JRA Proceedings (11) 262-266.
- Bussy F., Migné C., Quéro B., Le Goff M. 2015. WPAC Proceedings (19) 1010.
- Castro R., Piazzon, M.C., Zarra, I., Leiro, J., Noya, M., Lamas J., 2006. Aquacult. (254) 9-20.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F., 1956. Anal. Chem. (28) 350-356.
- Farnell M.B., Crippen T.L., He H., Swaggerty C. L., Kogut M.H., 2003. Dev. Comp. Immunol. (27) 423-429.
- Genovese K.J., He H., Swaggerty C.L., Kogut M.H. 2013. Dev. Comp. Immunol. (41) 334–340
- He H., Crippen T.L., Farnell M.B., Kogut M.H. 2003. Dev. Comp. Immunol. (27) 621-627.
- He H., MacKinnon K.M., Genovese K.J., Kogut M.H. 2011. Innate immunity (17) 137-144.
- Isnansetyo, A., Fikriyah, A., Kasanah, N., Murwantoko, 2016. Aquacult. Int. (24) 465-477.
- Kaiser P., 2012. Avian pathology (41) 511-518.
- Kogut M, He H. 2005. Animal Biotechnology, (16) 165–181.
- Leonard, S.G., Sweeney, T., Bahar, B., O'Doherty, J.V., 2011. J Anim Sci. (90) 505-514.
- Stewart C., Keyburn A.L., Deffrasnes C, Tompkins S.M. 2013. Comp. Dev. Immunol. (40) 463-498.
- Swaggerty C., He H., Genovese K.J., Kaiser P., Pevzner I. Y., Kogut M.M. 2006. Avian Pathol. (35) 465-470.
- St Paul M., Brisbin J.T., Addul-Careem M.F., Sharif S. 2013. Vet. Immunol. Immunopath. (152) 191-199.

Figure 1. Activation des hétérophiles par l'extrait (MSP). Chaque point représente la moyenne $\pm$ SEM de 5 répétitions. * signifie $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. A : Mesure de l'activité enzymatique de la glucuronidase par dosage spectrophotométrique de la concentration en belliférone après incubation des milieux conditionnés 4h à 41°C. B : Mesure du burst oxydatif. Les cellules sont incubées avec un précurseur non fluorescent et la variation de fluorescence de la fluorescéine libérée mesurée par spectrophotométrie.

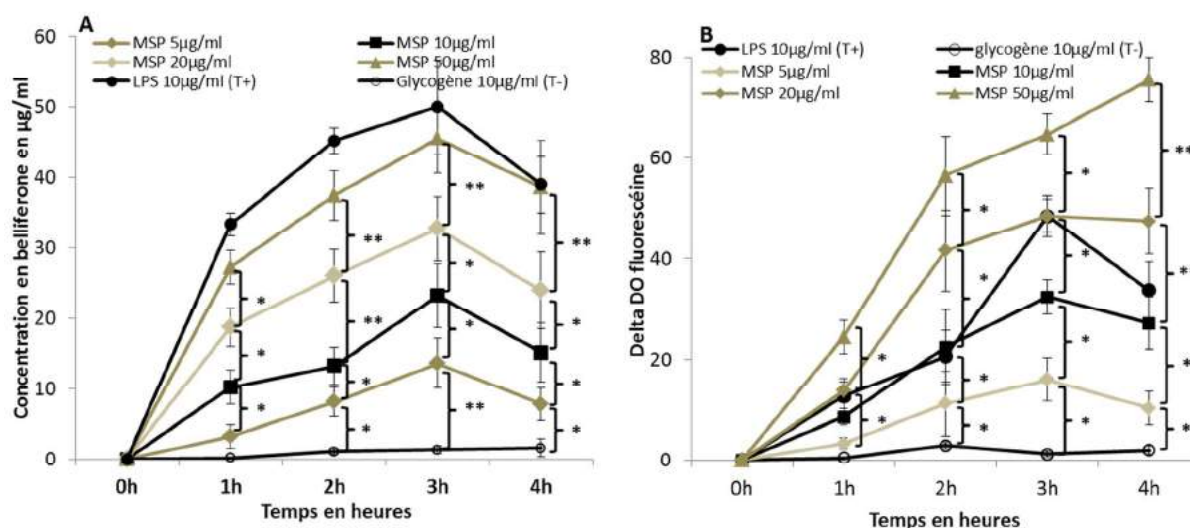
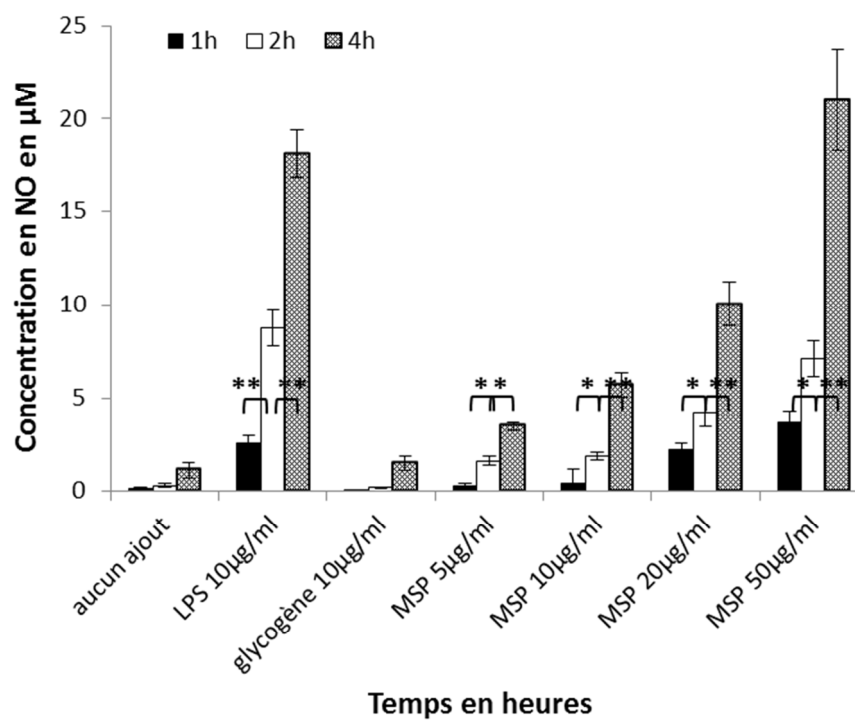


Figure 2. Sécrétion de NO par les monocytes incubés en présence du MSP. Chaque point représente la moyenne $\pm$ SEM de 5 expériences indépendantes. * signifie $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Le dosage des NO est réalisé avec du réactif de Griess.



Un extrait d'*Ulva* sp. stimule *in vitro* des cellules de l'immunité innée de poulets de chair



BUSSY Frédéric¹, GOUIN Christelle¹, GURIEC Nathalie², QUERO Benoît³, LE GOFF Matthieu¹, NYVALL-COLLEN Pi¹

¹OLMIX SA – ZA du haut du bois, 56580 Bréhan, France.

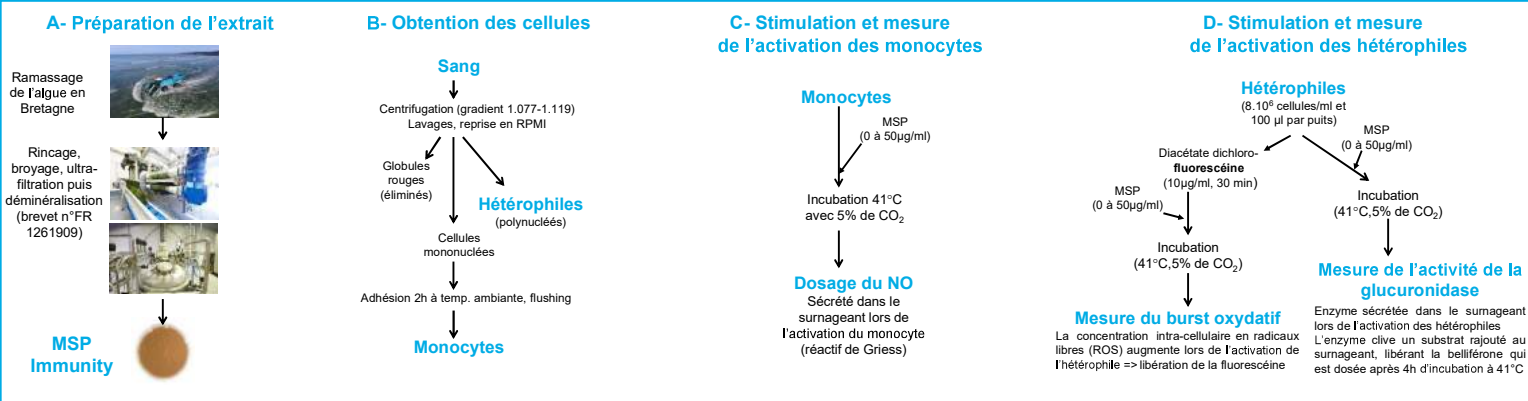
²UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE – 3 rue des archives, 29238 Brest, France.

³R&D BREIZH – 56930 Pluméliau, France.

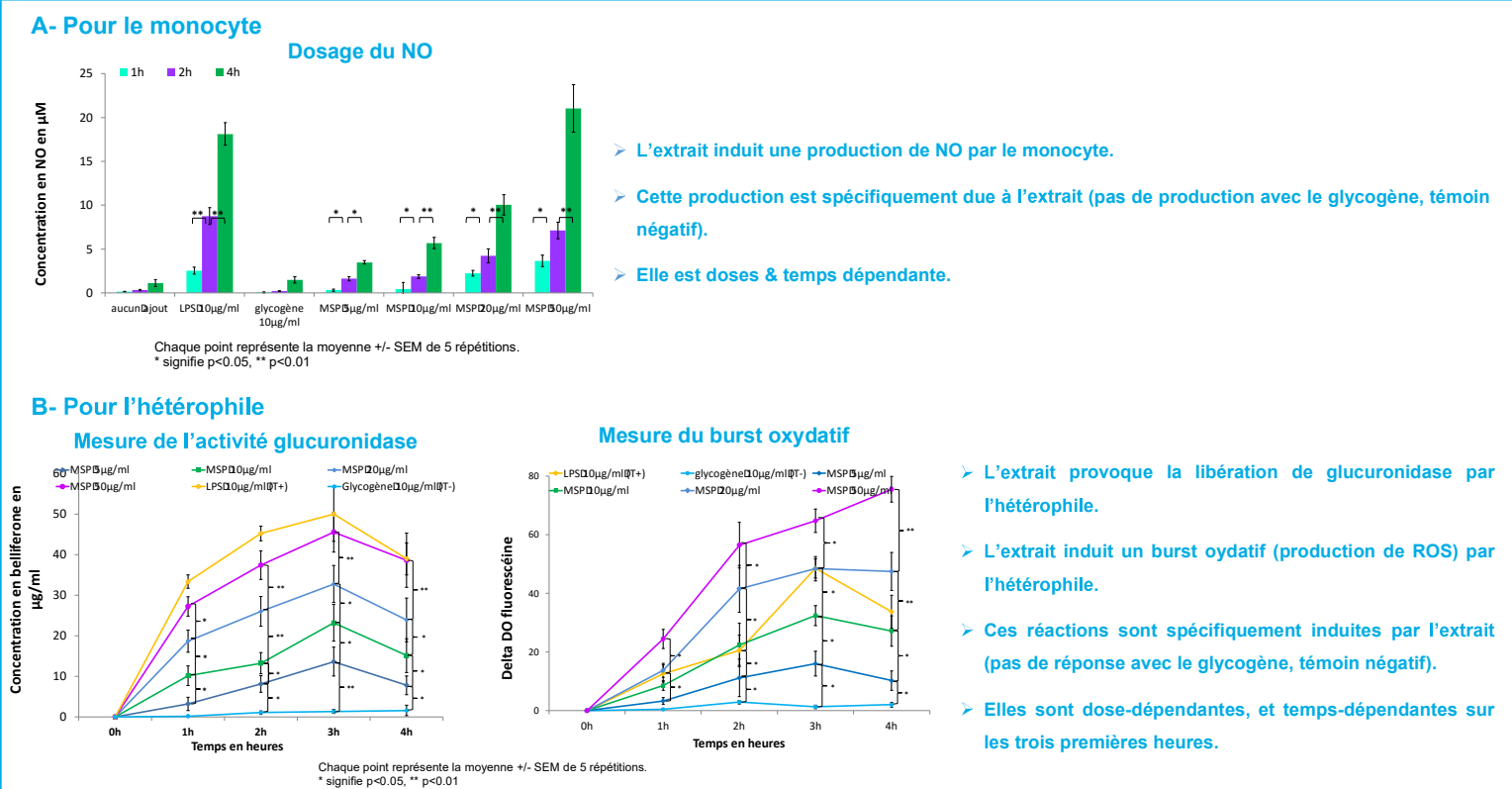
INTRODUCTION

- ✓ L'antibio-résistance est désormais reconnue comme un problème majeur de santé publique avec des coûts directs et indirects et les pertes annuelles évalués à 1,5 milliards d'euros.
- ✓ La France a choisi de mettre en place le plan Ecoantibio 2017 qui vise à réduire l'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire de 25% en 5 ans.
- ✓ Parmi les pistes envisagées pour atteindre cet objectif, la stimulation de l'immunité des animaux d'élevage par des macro-algues ou des fractions apparaît comme un axe majeur de recherche.
- ✓ Plusieurs études ont démontré l'intérêt de ces algues *in vitro* et *in vivo* pour les porcs et les poissons d'élevage (Castro et al., 2006 ; Isnansetoy et al., 2016 ; Leonard et al., 2011).
- ✓ Nous avons évalué l'action d'un extrait d'*Ulva armoricana*, riche en polysaccharides sulfatés, sur l'activation *in vitro* des hétérophiles et monocytes aviaires.

MATERIELS ET METHODES



RESULTATS



CONCLUSION

- ✓ L'extrait (MSP Immunity) contenant des polysaccharides sulfatés marin permet d'activer en quelques heures *in vitro* les hétérophiles et les monocytes, cellules clés de l'immunité innée des poulets.
- ✓ Des travaux sont en cours pour identifier les mécanismes d'action impliqués à la fois *in vitro* et *in vivo*, l'extrait ayant été inclus dans un produit commercialisé (Searup®) qui s'avère améliorer les performances zootechniques en élevage (Bussy et al. 2015a ; Bussy et al. 2015b).

**ÉTUDE DE L'EFFICACITÉ CLINIQUE D'UN AUTOVACCIN DIRIGÉ CONTRE
RIEMERELLA ANATIPESTIFER CHEZ LE CANARD DE BARBARIE,
ADMINISTRÉ SÉPARÉMENT OU MÉLANGÉ À UN VACCIN
CONTRE LA PARVOVIROSE**

**Éric THIBAUT¹, Nelly LESCEAU¹, Hubert GANTELET¹,
Stéphanie CASTAGNOS²**

¹*BIOVAC Angers Technopole 6, Rue Olivier de Serres 49071 BEAUCOUZÉ*

²*CEVA Santé Animale 10 Avenue de la Ballastière 33500 LIBOURNE*

eric.thibault@ceva.com

RÉSUMÉ

Cette étude avait pour objectif d'évaluer l'innocuité et l'efficacité d'un autovaccin dirigé contre *Riemerella anatipestifer* adjuvé en alumine ou en huile et administré à des canards de Barbarie séparément ou mélangé à un vaccin inactivé contre la parvovirose.

L'innocuité de l'autovaccin et la viabilité des canards suite à une épreuve à *Riemerella anatipestifer* sont excellentes quels que soient l'adjuvant et le mode d'administration utilisés. Par contre, l'utilisation d'un adjuvant huileux réduit significativement la proportion de sujets présentant des lésions de riemerellose.

ABSTRACT

Study of the clinical efficiency of an autogenous vaccine against *Riemerella anatipestifer* to Muscovy duck, administered separately or mixed in a vaccine against parvovirose

This study examined safety and clinical efficiency of an autogenous vaccine against *Riemerella anatipestifer* to Muscovy ducks, administered separately or mixed with a Parvovirus vaccine.

Safety of the autogenous vaccine and viability of Muscovy ducks after a *Riemerella anatipestifer* challenge are excellent, regardless of the adjuvant or the vaccination method. However, lesions due to *Riemerella anatipestifer* are significantly reduced in the group immunized with an oiled autogenous vaccine.

INTRODUCTION

L'objectif de réduction de l'usage des antibiotiques tel que défini dans le plan EcoAntibio 2012-2017 prévoit l'usage et la promotion des vaccins. Les vaccins disponibles ne permettent pas de couvrir l'ensemble des maladies bactériennes des palmipèdes, justifiant le recours aux autovaccins, qui se définissent comme des vaccins inactivés fabriqués à partir d'organismes pathogènes provenant d'animaux d'un élevage et destinés aux animaux de cet élevage. Leur usage est répandu chez les palmipèdes notamment vis-à-vis des infections dues à *Riemerella anatipestifer*, bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des *Flavobacteriaceae*. Ce germe est immobile, non sporulé, oxydase positive et catalase positive. L'infection d'un lot de palmipèdes par *R. anatipestifer* provoque des mortalités pouvant atteindre 70% de l'effectif d'un lot (1,2). L'immunité induite par la vaccination contre cette infection est essentiellement à médiation humorale et dirigée contre les lipopolysaccharides, structures impliquées dans les interactions entre la bactérie et les cellules de l'animal.

Les plans de prophylaxie des canards de Barbarie comprennent la vaccination contre la parvovirose. Dans certains cas, un autovaccin est également administré. La question du mélange du vaccin et de l'autovaccin est régulièrement posée. Cette étude a pour objectifs de vérifier si la protection conférée par cet autovaccin n'est pas compromise par le mélange ou inversement et d'évaluer l'influence de cet adjuvant de l'autovaccin sur cette protection.

1. MATERIELS ET METHODES

162 canetons de Barbarie préalablement vaccinés à l'âge d'un jour contre la parvovirose sont répartis en 5 groupes à 2 semaines d'âge.

G1 : canetons recevant l'autovaccin huileux mélangé au vaccin contre la parvovirose avec adjuvant huileux (N=48)

G2 : canetons recevant l'autovaccin avec adjuvant alumine mélangé au vaccin contre la parvovirose avec adjuvant alumine (N=48)

G3 : canetons recevant séparément mais simultanément l'autovaccin huileux et le vaccin contre la parvovirose à adjuvant huileux (N=24)

G4 : témoin non vacciné et non autovacciné éprouvé (N=24)

G5 : témoin non vacciné et non autovacciné non éprouvé (N=18).

Les produits sont administrés par voie sous-cutanée à la base du cou, le point d'injection se situant en

zone dorsale et l'aiguille introduite en direction de la queue de l'animal.

Une épreuve virulente est réalisée à l'âge de 8 semaines sur les sujets des groupes G1, G2, G3 et G4 avec la souche de *Riemerella anatipestifer* incorporée à l'autovaccin.

La mortalité ainsi que les lésions caractéristiques de rimerellose (pneumonie, aërosacculite, péricardite, hydropéricarde, périhépatite, rate hypertrophiée et granuleuse) sont relevées sur chacun des 5 groupes pendant une semaine et le nombre de sujets présentant au moins l'une de ces lésions est comptabilisé.

2. RÉSULTATS

Aucune réaction locale (congestion ou granulomes sous-cutanés) ou générale (prostration) n'est observée sur les sujets des groupes G1, G2 et G3.

2.1. Mortalité

Tableau 1. Mortalité des canards dans les différents groupes après l'épreuve virulente à *Riemerella anatipestifer*

Groupe	Nombre de sujets morts/effectif du groupe	%
G1	1/48	2
G2	0/48	0
G3	0/24	0
G4	14/24	58
G5	0/18	0

La viabilité est excellente pour l'ensemble des lots autovaccinés (G1 à G3, $p_b=0,4694$) et très significativement supérieure au lot témoin éprouvé (G4, $p_b<0,0001$). Aucune différence significative n'est observable entre les lots G1 et G3 ($p_b>0,9999$).

2.2. Lésions de rimerellose

La rimerellose est une infection septicémique se traduisant par des lésions respiratoires (pneumonie, aërosacculite) et générales non spécifiques (périhépatite, péricardite, splénomégalie, hydropéricarde).

Tableau 2. Nombre et proportion de canard par groupe présentant des lésions suite à l'épreuve virulente par *Riemerella anatipestifer*

Groupe	Nombre de sujets présentant des lésions/effectif du groupe	%
G1	7/48	15

G2	30/48	63
G3	7/24	29
G4	24/24	100
G5	0/18	0

La proportion de sujets présentant des lésions de riemerellose est très significativement diminuée sur les lots ayant reçu le vaccin et l'autovaccin à adjuvant huileux (G1 et G3) comparés aux autres lots G2 ($p_b < 0.0001$) et G4 ($p_b < 0.0001$). La différence n'est pas significative entre les lots G1 et G3 ($p_b = 0.2086$).

3. DISCUSSION

Le mélange d'un vaccin et d'un autovaccin incorporant le même type d'adjuvant (huileux ou alumine) est réalisable et n'entraîne pas d'effets secondaires sur les canards de cette étude. L'autovaccin doit induire une réduction de la mortalité et des lésions provoquées par l'infection. L'étude montre que, quels que soient l'adjuvant et l'autovaccin, la viabilité des canards éprouvés est excellente.

Sur l'aspect lésionnel, la protection conférée par les autovaccins huileux est équivalente, que ceux-ci aient été mélangés ou administrés simultanément au vaccin huileux. Par contre, la proportion de sujets présentant des lésions est très significativement diminuée chez les canards ayant reçu un autovaccin huileux, par rapport à celle observée sur les canards

ayant reçu l'autovaccin adjuvé en alumine mélangé au vaccin alumine. Il convient en particulier de noter que près de 60% des canards vaccinés avec un autovaccin adjuvé en alumine développent des lésions de pneumonie et 15% un hydropéricarde, contre respectivement 15% et 0% de ceux vaccinés avec l'autovaccin huileux. En limitant les capacités respiratoires et circulatoires des canards de Barbarie, ces lésions augmentent leur sensibilité aux infections respiratoires telles que les infections colibacillaires, tout en diminuant leur potentiel de croissance. Elles peuvent également faire l'objet de retraits en abattoir.

CONCLUSION

Cette étude montre que le mélange d'un vaccin et d'un autovaccin *Riemerella anatipestifer* est possible bien que cet usage soit hors RCP - donc sous la responsabilité du prescripteur - et peut réduire très significativement la mortalité des canetons autovaccinés lors d'une épreuve homologue.

La protection conférée par l'autovaccin huileux est toutefois très significativement supérieure à celle de l'autovaccin adjuvé en alumine en ce qui concerne la proportion de sujets survivants à l'épreuve mais présentant des lésions de riemerellose : le recours à l'autovaccin huileux est donc largement préférable à l'utilisation de l'autovaccin adjuvé en alumine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Haiwen et al., 2013. Development and evaluation of a trivalent *Riemerella anatipestifer* inactivated vaccine. Clinical and Vaccine Immunology, 20 (5): 691-697
- 2- Sandhu TS., Rimler RB., 1997. *Riemerella anatipestifer* infection, Diseases of poultry, 10th edition: 161-166



ÉTUDE DE L'EFFICACITÉ CLINIQUE D'UN AUTOVACCIN DIRIGÉ CONTRE *RIEMERELLA ANATIPESTIFER* CHEZ LE CANARD DE BARBARIE, ADMINISTRÉ SÉPARÉMENT OU MÉLANGÉ À UN VACCIN CONTRE LA PARVOVIROSE

Eric THIBAULT¹, Nelly LESCEAU¹, Hubert GANTELET¹, Stéphanie CASTAGNOS²

¹ BIOVAC Angers Technopole 6, Rue Olivier de Serres 49071 BEAUCOUZÉ

² CEVA Santé Animale, 10 avenue de la Ballastière 33500 LIBOURNE

Introduction

L'objectif de réduction de l'usage des antibiotiques tel que défini dans le plan EcoAntibio 2012-2017 prévoit l'usage et la promotion des vaccins. Les vaccins disponibles ne permettent pas de couvrir l'ensemble des maladies bactériennes des palmipèdes, justifiant le recours aux autovaccins, qui se définissent comme des vaccins inactivés fabriqués à partir d'organismes pathogènes provenant d'animaux d'un élevage et destinés aux animaux de cet élevage. Leur usage est répandu chez les palmipèdes notamment vis-à-vis des infections dues à *Riemerella anatipestifer*, bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des *Flavobacteriaceae*. Ce germe est immobile, non sporulé, oxydase positive et catalase positive. L'infection d'un lot de palmipèdes par *R. anatipestifer* provoque des mortalités pouvant atteindre 70% de l'effectif d'un lot (1,2). L'immunité induite par la vaccination contre cette infection est essentiellement à médiation humorale et dirigée contre les lipopolysaccharides, structures impliquées dans les interactions entre la bactérie et les cellules de l'animal.

Les plans de prophylaxie des canards de Barbarie comprennent la vaccination contre la parvovirose. Dans certains cas, un autovaccin est également administré. La question du mélange du vaccin et de l'autovaccin est régulièrement posée. Cette étude a pour objectifs de vérifier si la protection conférée par cet autovaccin n'est pas compromise par le mélange ou inversement et d'évaluer l'influence de l'adjuvant de l'autovaccin sur cette protection.

Matériels et méthodes

162 canetons de Barbarie préalablement vaccinés à l'âge d'un jour contre la parvovirose sont répartis en 5 groupes à 2 semaines d'âge.

G1 : canetons recevant l'autovaccin huileux mélangé au vaccin contre la parvovirose avec adjuvant huileux (N=48)

G2 : canetons recevant l'autovaccin avec adjuvant alumine mélangé au vaccin contre la parvovirose avec adjuvant alumine (N=48)

G3 : canetons recevant séparément mais simultanément l'autovaccin huileux et le vaccin contre la parvovirose à adjuvant huileux (N=24)

G4 : témoin non vacciné et non autovacciné éprouvé (N=24)

G5 : témoin non vacciné et non autovacciné non éprouvé (N=18).

Les produits sont administrés par voie sous-cutanée à la base du cou, le point d'injection se situant en zone dorsale et l'aiguille introduite en direction de la queue de l'animal.

Une épreuve virulente est réalisée à l'âge de 8 semaines sur les sujets des groupes G1, G2, G3 et G4 avec la souche de *Riemerella anatipestifer* incorporée à l'autovaccin. La mortalité ainsi que les lésions caractéristiques de riemerellose (pneumonie, aérosacculite, péricardite, hydropéricarde, périhépatite, rate hypertrophiée et granuleuse) sont relevées sur chacun des 5 groupes pendant une semaine et le nombre de sujets présentant au moins l'une de ces lésions est comptabilisé.

Résultats

Aucune réaction locale (congestion ou granulomes sous-cutanés) ou générale (prostration) n'est observée sur les sujets des groupes G1, G2 et G3.

Mortalité

Tableau 1. Mortalité des canards dans les différents groupes après l'épreuve virulente à *Riemerella anatipestifer*

Groupes	Nombre de sujets morts / effectif du groupe	% Mortalité
G1	1/48	2
G2	0/48	0
G3	0/24	0
G4	14/24	58
G5	0/18	0

La viabilité est excellente pour l'ensemble des lots autovaccinés (G1 à G3, $p_b=0,4694$) et très significativement supérieure au lot témoin éprouvé (G4, $p_b<0,0001$). Aucune différence significative n'est observable entre les lots G1 et G3 ($p_b>0,9999$).

Lésions de Riemerellose

La riemerellose est une infection septicémique se traduisant par des lésions respiratoires (pneumonie, aérosacculite) et générales non spécifiques (périhépatite, péricardite, splénomégalie, hydropéricarde).

Tableau 2. Nombre et proportion de canard par groupe présentant des lésions suite à l'épreuve virulente par *Riemerella anatipestifer*

Groupes	Nombre de sujets présentant des lésions / effectif du groupe	%
G1	7/48	15
G2	30/48	63
G3	7/24	29
G4	24/24	100
G5	0/18	0

La proportion de sujets présentant des lésions de riemerellose est très significativement diminuée sur les lots ayant reçu le vaccin et l'autovaccin à adjuvant huileux (G1 et G3) comparés aux autres lots G2 ($p_b<0,0001$) et G4 ($p_b<0,0001$). La différence n'est pas significative entre les lots G1 et G3 ($p_b=0,2086$).

Discussion

Le mélange d'un vaccin et d'un autovaccin incorporant le même type d'adjuvant (huileux ou alumine) est réalisable et n'entraîne pas d'effets secondaires sur les canards de cette étude. L'autovaccin doit induire une réduction de la mortalité et des lésions provoquées par l'infection. L'étude montre que, quels que soient l'adjuvant et l'autovaccin, la viabilité des canards éprouvés est excellente.

Sur l'aspect lésionnel, la protection conférée par les autovaccins huileux est équivalente, que ceux-ci aient été mélangés ou administrés simultanément au vaccin huileux. Par contre, la proportion de sujets présentant des lésions est très significativement diminuée chez les canards ayant reçu un autovaccin huileux, par rapport à celle observée sur les canards ayant reçu l'autovaccin adjuvé en alumine mélangé au vaccin alumine. Il convient en particulier de noter que près de 60% des canards vaccinés avec un autovaccin adjuvé en alumine développent des lésions de pneumonie et 15% un hydropéricarde, contre respectivement 15% et 0% de ceux vaccinés avec l'autovaccin huileux. En limitant les capacités respiratoires et circulatoires des canards de Barbarie, ces lésions augmentent leur sensibilité aux infections respiratoires telles que les infections colibacillaires, tout en diminuant leur potentiel de croissance. Elles peuvent également faire l'objet de retraits en abattoir.

Conclusion

Cette étude montre que le mélange d'un vaccin et d'un autovaccin *Riemerella anatipestifer* est possible bien que cet usage soit hors RCP - donc sous la responsabilité du prescripteur - et peut réduire très significativement la mortalité des canetons autovaccinés lors d'une épreuve homologue.

La protection conférée par l'autovaccin huileux est toutefois très significativement supérieure à celle de l'autovaccin adjuvé en alumine en ce qui concerne la proportion de sujets survivants à l'épreuve mais présentant des lésions de riemerellose : le recours à l'autovaccin huileux est donc largement préférable à l'utilisation de l'autovaccin adjuvé en alumine.

Références bibliographiques

- 1- Haiwen et al., 2013. Development and evaluation of a trivalent *Riemerella anatipestifer* inactivated vaccine. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20 (5): 691-697
- 2- Sandhu TS., Rimler RB., 1997. *Riemerella anatipestifer* infection, *Diseases of poultry*, 10th edition : 161-166

ÉTUDE DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE CONFÉRÉE PAR UN VACCIN CONTRE LA PARVOVIROSE ET LA MALADIE DE DERSZY DU CANARD DE BARBARIE MÉLANGÉ À UN AUTOVACCIN À ADJUVANT HUILEUX

Stéphanie CASTAGNOS¹, Clémentine CAUDRON¹, Eric THIBAUT²,
Hubert GANTELET², Charles FACON³

¹CEVA Santé Animale 10 Av de la Ballastière 33500 LIBOURNE

²BIOVAC Angers Technopole 6, Rue Olivier de Serres 49071 BEAUCOUZÉ

³LABOVET Conseil, Rue Olivier de Serres 85500 LES HERBIERS

stephanie.castagnos@ceva.com

RÉSUMÉ

La promotion de la vaccination rentre dans le cadre du plan EcoAntibio 2012-2017 visant à réduire l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire. L'objectif de cette étude est d'apprécier la qualité de la réponse immunitaire suite à une administration d'un mélange d'un vaccin contre la parvovirose et la maladie de Derszy du canard de Barbarie et d'un autovaccin à adjuvant huileux. Quatre lots de canards de Barbarie répartis chacun en 3 groupes ont reçu soit un vaccin commercial contre la parvovirose et maladie de Derszy seul, soit un vaccin commercial contre la parvovirose et maladie de Derszy avec un autovaccin à adjuvant huileux contre *Riemerella anatipestifer* séparément ou simultanément. Les réponses immunitaires vis-à-vis du *Parvovirus* du canard de Barbarie (DPV) ont été évaluées par des sérologies. Aucune différence significative entre les réponses immunitaires n'a été remarquée sur les sérologies 3 semaines après vaccination. L'administration du mélange du vaccin contre la parvovirose et maladie de Derszy avec l'autovaccin à adjuvant huileux n'impacte pas la qualité de la réponse immunitaire vis-à-vis du *Parvovirus*. Pour les sérologies réalisées 6 semaines après vaccination, des titres très élevés sont observés et sont compatibles soit avec un passage viral *Parvovirus*, soit avec un effet stimulant de l'autovaccin.

ABSTRACT

Study of the immune response conferred by a vaccine against *Parvovirus* disease and Derszy disease of Muscovy duck mixed with an autogenous vaccine with oil adjuvant

Promotion of vaccination returns within the framework of EcoAntibio 2012-2017 plan to reduce antibiotics use in veterinary medicine. The objective of the study is to appreciate immune response quality further to an administration of a mixture composed by a vaccine against duck parvovirose and Derszy disease and an autogenous vaccine with an oily adjuvant. Four flocks of Muscovy ducks each there 3 groups received either a commercial vaccine against parvovirose and Derszy disease or the same commercial vaccine with an autogenous vaccine oily adjuvanted against *Riemerella anatipestifer* mixed before or administered simultaneously. Immune responses towards Duck *Parvovirus* (DPV) are evaluated by serological analysis. No significant difference between immune responses was noticed on analysis realized 3w after vaccination. The administration of a mixture composed by a vaccine against duck parvovirose and Derszy disease with an autogenous vaccine with an oily adjuvant does not impact immune response quality against *Parvovirus*. For the analysis realized 6 weeks post vaccination, high titers observed are compatible either with an infection by *Parvovirus* either with a booster effect due to autogenous vaccine.

INTRODUCTION

L'utilisation des antibiotiques conduit à la sélection de souches bactériennes résistantes. Ces bactéries résistantes aux antibiotiques sont une menace tant en santé humaine qu'en santé animale.

Afin de diminuer les consommations d'antibiotiques en médecine vétérinaire, des axes de travail ont été inscrits dans le plan EcoAntibio 2012-2017. L'un d'entre eux consiste en la promotion des vaccins et des autovaccins.

Selon la réglementation française, les autovaccins sont des vaccins bactériens inactivés destinés à un élevage défini et fabriqués à partir d'une ou plusieurs souches bactériennes isolées dans ce même élevage.

Les canards de Barbarie sont sensibles à des pathologies virales telles que la parvovirose et à des infections bactériennes dues à *Riemerella anatipestifer* ou *Escherichia coli*. Il existe des vaccins commerciaux destinés à protéger contre la parvovirose mais aucun vaccin commercial contre *Riemerella anatipestifer* n'est disponible à ce jour d'où un recours possible à un autovaccin.

Les interventions de vaccination en élevage sont une source de stress pour les animaux. Afin de limiter ces stress, la question du mélange de différents vaccins est régulièrement posée afin de limiter les interventions. La question qui se pose est de savoir s'il existe des interférences entre les valences vaccinales utilisées.

1. MATERIELS ET METHODES

Quatre lots de canards de Barbarie sont vaccinés à 1 jour d'âge au couvoir avec un vaccin commercial à adjuvant huileux contre la parvovirose et la maladie de Derszy (Deparmune®).

Lors de la vaccination de rappel, chaque lot est séparé en 3 groupes. Un groupe (G1) reçoit uniquement le vaccin contre la parvovirose. Le deuxième groupe (G2) reçoit un mélange constitué du vaccin contre la parvovirose et d'un autovaccin dirigé contre *Riemerella anatipestifer* à adjuvant huileux. Le vaccin et l'autovaccin sont mélangés dans le même flacon. Dans le troisième groupe (G3) le vaccin et l'autovaccin ne sont pas mélangés au préalable mais sont injectés simultanément à l'aide d'une seringue double corps à aiguille unique.

Les chantiers de vaccination ont été suivis afin de vérifier la qualité de l'injection des vaccins ainsi que l'innocuité du mélange vaccin et autovaccin.

La réponse immunitaire est évaluée par des sérologies réalisées 3 semaines après le rappel de vaccination. Il est également réalisé une seconde série de prises de sang 6 semaines après le rappel de vaccination dans le but de vérifier la persistance des anticorps dans le temps et par conséquent la protection immunitaire jusqu'à la fin du lot.

Les sérums sont analysés par une méthode ELISA développée par les équipes de Ceva-Phylaxia (Jacquinet, 2007) détectant et quantifiant les anticorps dirigés contre les *Parvovirus* contenus dans le vaccin.

Ce test ELISA permet de corréliser les niveaux de titres en anticorps circulants et la protection des canards. C'est un test qui a été validé par challenges effectués sur des animaux vaccinés. Le titre est calculé par extrapolation d'un sérum de contrôle interne dont le titre en vironeutralisation est connu. L'immunité active débute à partir d'un seuil de 4-5 en titres ELISA. Les titres au-delà de 1000 traduisent une circulation de virus sauvage.

A l'occasion des sérologies, une observation des animaux a été réalisée afin de vérifier les signes cliniques de parvovirose et l'état de ceux-ci.

2. RÉSULTATS

Dans les 7 jours suivant la vaccination, aucun effet indésirable n'a été observé sur aucun des groupes vaccinés.

Pour les sérologies effectuées 3 semaines après le rappel de vaccination, les quatre lots présentent une moyenne des titres >4 (4 étant le seuil de protection vaccinale).

Aucune différence significative n'apparaît entre les 3 groupes des 4 lots (analyse de variance, test de Kruskal-Wallis, $\alpha = 0,05$).

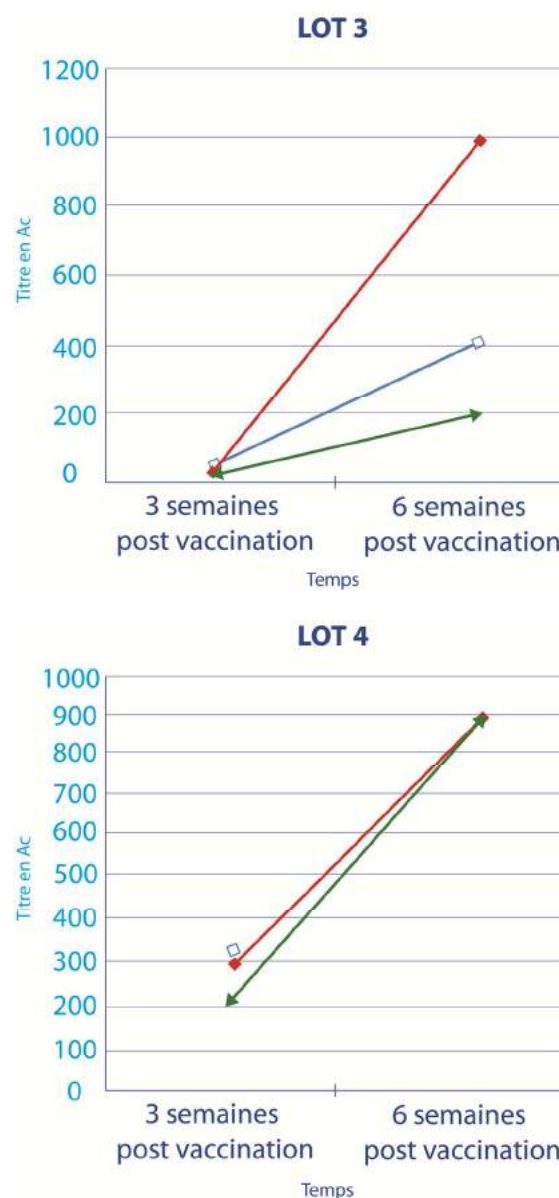
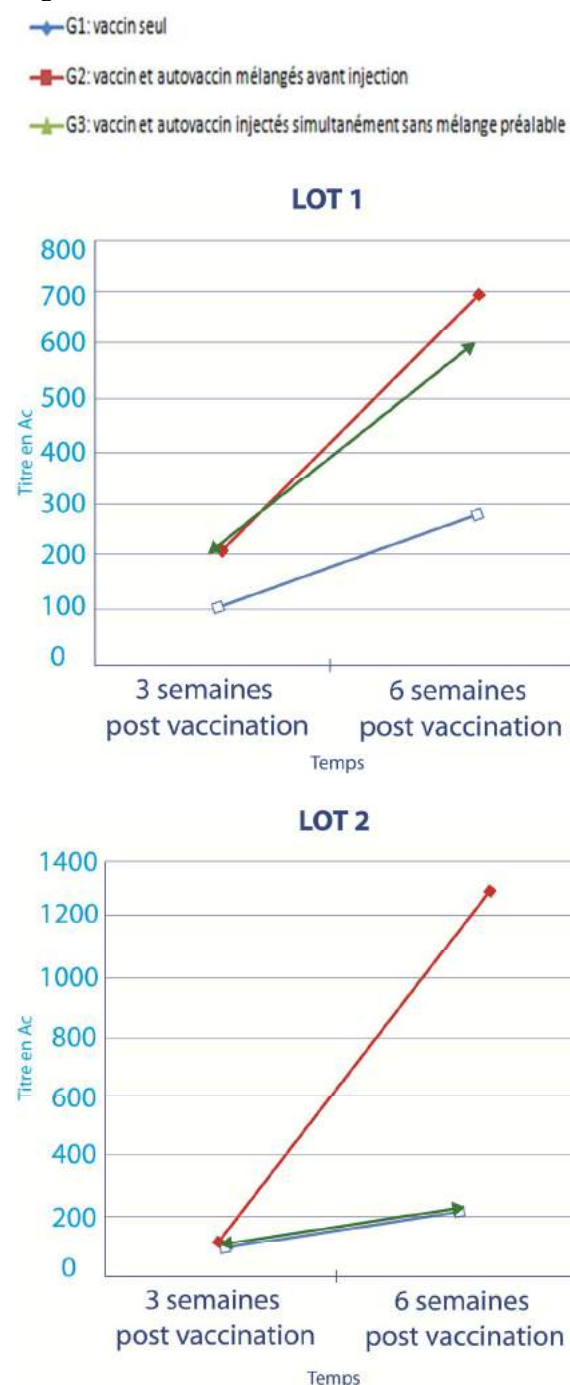
Les sérologies effectuées 6 semaines après le rappel de vaccination mettent en évidence sur plusieurs groupes des titres individuels élevés (>3000). Ces titres extrêmes contribuent à augmenter fortement les titres moyens des groupes observés 6 semaines post-vaccination pour les 4 lots.

Ainsi, des différences significatives sont notées entre 3 et 6 semaines post-vaccination pour les groupes G2 des lots 1, 2 et 3 et du groupe G3 du lot 4 (test SIDAK de comparaisons multiples, $\alpha = 0,05$).

Dans chacun des lots de l'étude, aucun signe clinique de parvovirose n'a été constaté.

Figure 1. Titres sérologiques ELISA *Parvovirus* des 4 lots de canards en suivant les 3 groupes à 3 et 6 semaines après la vaccination de rappel

Légende :



Les résultats individuels des sérologies ELISA se trouvent en annexe.

DISCUSSION

Des mélanges de vaccins sont régulièrement réalisés par les opérateurs sur le terrain sans que les aspects innocuité et efficacité ne soient contrôlés. Cette étude a permis de démontrer que les innocuités locale et générale du mélange Deparmune® et autovaccin à adjuvant huileux sont satisfaisantes. En détail, il n'a pas été observé de différences de comportement entre les animaux recevant le Deparmune® seul et ceux recevant le mélange. Par ailleurs, à l'autopsie, il n'était également pas possible de faire de différence.

Sur les sérologies réalisées 3 semaines après la vaccination, on n'observe aucune différence significative entre les 3 groupes ce qui démontre l'absence d'impact sur le vaccin lorsque

l'autovaccin est mélangé au vaccin ou administré simultanément sans mélange préalable.

Ainsi, la réponse sérologique est identique que l'administration du vaccin soit seule, séparée de l'autovaccin ou mélangée à celui-ci.

Les sérologies réalisées 6 semaines après vaccination montrent que les titres élevés observés sur certains individus des groupes G2 et G3 (annexe 1), peuvent être compatibles avec ceux observés suite à une infection *Parvovirus*. En effet, les titres supérieurs à 1000 ne sont pas ceux attendus après une vaccination contre la parvovirose mais correspondent généralement à une infection naturelle à *Parvovirus*. On ne peut toutefois pas exclure un effet stimulant de l'adjuvant de l'autovaccin, voire de l'autovaccin (adjuvant+corps bactériens avec présence de LPS) car la plupart des

titres élevés s'observent sur des sujets ayant reçu l'autovaccin administré en mélange avec le vaccin.

CONCLUSION

La réponse sérologique des canards vis-à-vis de la parvovirose n'est pas altérée lorsque le vaccin à adjuvant huileux est administré avec un autovaccin à adjuvant huileux mélangé préalablement ou injectés séparément. L'hypothèse de l'effet "booster" de l'autovaccin sur la réponse immunitaire *Parvovirus* reste néanmoins à confirmer. Les auteurs rappellent que le mélange d'un vaccin commercial et d'un autovaccin est hors RCP et se fait sous l'entière responsabilité du prescripteur.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1- Jacquinet C., Palya V., Kardi V3, Warin S., 2007. Intérêts du suivi sérologique dans des élevages de canards de Barbarie vaccinés avec le vaccin Deparmune®. Journées de la Recherche Avicole

ANNEXE

Tableau 1 - Titres sérologiques ELISA *Parvovirus* des 4 lots de canards en suivant les 3 groupes à 3 et 6 semaines après la vaccination de rappel

Lot 1 (3 sem post vaccination)				Lot 1 (6 sem post vaccination)				Lot 2 (3 sem post vaccination)			Lot 2 (6 sem post vaccination)		
G1	G2	G2 (suite)	G3	G1	G2	G2 (suite)	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
1	1	55	41	4	1	176	29	1	13	14	1	7	16
2	10	56	41	15	5	179	61	1	14	19	2	16	30
2	12	57	42	16	11	236	96	2	28	20	32	26	50
4	12	73	85	21	11	238	112	3	36	24	34	28	78
6	13	77	93	28	17	275	113	11	42	50	34	64	79
8	17	82	122	29	18	279	114	16	49	56	76	143	105
11	18	84	123	34	18	291	158	17	49	60	91	189	155
13	20	91	136	46	19	307	168	32	50	62	93	284	163
14	24	94	141	112	29	435	177	63	60	62	104	312	165
25	28	95	149	135	30	455	223	64	77	70	151	356	179
53	28	95	183	150	33	474	253	80	87	76	293	458	185
78	29	95	184	177	33	514	394	84	91	79	321	963	210
99	30	98	190	336	46	522	524	108	93	94	665	2312	267
209	31	98	226	388	52	566	573	257	130	104	834	2829	291
354	34	116	335	576	53	579	723	288	163	111	870	3011	1128
363	35	143	345	636	55	599	915		187	129	9987	1194	
	36	148	567	759	60	842	1586		197	142			
	36	170	956	808	60	844	1682		202	187			
	38	174		945	60	878	1939		250	195			
	41	196			62	1074	2458		336	239			
	42	247			83	1204							
	42	258			92	1524							
	45	291			115	1537							
	45	345			123	1618							
	46	381			133	1674							
	51	382			138	1742							
	53	459			147	2093							
	53	2060			147	2931							
	54	3567			164	4305							
					169	11570							

Lot 3 (3 sem post vaccination)			Lot 3 (6 sem post vaccination)			Lot 4 (3 sem post vaccination)			Lot 4 (6 sem post vaccination)	
G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G2	G3
1	0	2	1	7	16	3	36	10	73	113
14	0	5	2	16	30	4	42	24	84	331
34	1	10	32	26	50	88	76	44	115	335
38	1	14	34	28	78	95	89	46	225	368
52	6	15	34	64	79	113	89	69	252	414
57	9	15	76	143	105	115	124	71	273	628
77	9	17	91	189	155	116	157	96	347	652
125	13	30	93	284	163	117	218	102	365	867
138	16	38	104	312	165	149	220	124	388	1066
194	35	66	151	356	179	203	289	149	591	1415
296	39	68	293	458	185	289	321	160	664	2014
320	101	79	321	963	210	633	428	448	1204	2884
	126	104	665	2312	267	635	471	481	1742	
	139	128	834	2829	291	878	478	564	2925	
	431	131	870	3011	1128	1788	1156	772	4587	
				9987	1194					



ÉTUDE DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE CONFÉRÉE PAR UN VACCIN CONTRE LA PARVOVIROSE ET LA MALADIE DE DERSZY DU CANARD DE BARBARIE MÉLANGÉ À UN AUTOVACCIN À ADJUVANT HUILEUX

Stéphanie CASTAGNOS¹, Clémentine CAUDRON¹, Eric THIBAUT², Hubert GANTELET², Charles FACON³

¹ CEVA Santé Animale 10 Avenue de la Ballastière 33500 LIBOURNE

² BIOVAC Angers Technopole 6, Rue Olivier de Serres 49071 BEAUCOUZÉ

³ LABOVET Conseil, Rue Olivier de Serres 85500 LES HERBIERS

Introduction

L'utilisation des antibiotiques conduit à la sélection de souches bactériennes résistantes. Ces bactéries résistantes aux antibiotiques sont une menace tant en santé humaine qu'en santé animale.

Afin de diminuer les consommations d'antibiotiques en médecine vétérinaire, des axes de travail ont été inscrits dans le plan EcoAntibio 2012-2017. L'un d'entre eux consiste en la promotion des vaccins et des autovaccins. Selon la réglementation française, les autovaccins sont des vaccins bactériens inactivés destinés à un élevage défini et fabriqués à partir d'une ou plusieurs souches bactériennes isolées dans ce même élevage.

Les canards de Barbarie sont sensibles à des pathologies virales telles que la parvovirose et à des infections bactériennes dues à *Riemerella anatipestifer* ou *Escherichia coli*. Il existe des vaccins commerciaux destinés à protéger contre la parvovirose mais aucun vaccin commercial contre *Riemerella anatipestifer* n'est disponible à ce jour d'où un recours possible à un autovaccin.

Les interventions de vaccination en élevage sont une source de stress pour les animaux. Afin de limiter ces stress, la question du mélange de différents vaccins est régulièrement posée afin de limiter les interventions. La question qui se pose est de savoir s'il existe des interférences entre les valences vaccinales utilisées.

Matériels et méthodes

Quatre lots de canards de Barbarie sont vaccinés à 1 jour d'âge au couvoir avec un vaccin commercial à adjuvant huileux contre la parvovirose et la maladie de Derszy (Deparmune®). Lors de la vaccination de rappel, chaque lot est séparé en 3 groupes. Un groupe (G1) reçoit uniquement le vaccin contre la parvovirose. Le deuxième groupe (G2) reçoit un mélange constitué du vaccin contre la parvovirose et d'un autovaccin dirigé contre *Riemerella anatipestifer* à adjuvant huileux. Le vaccin et l'autovaccin sont mélangés dans le même flacon. Dans le troisième groupe (G3) le vaccin et l'autovaccin ne sont pas mélangés au préalable mais sont injectés simultanément à l'aide d'une seringue double corps à aiguille unique.

Les chantiers de vaccination ont été suivis afin de vérifier la qualité de l'injection des vaccins ainsi que l'innocuité du mélange vaccin et autovaccin. La réponse immunitaire est évaluée par des sérologies réalisées 3 semaines après le rappel de vaccination. Il est également réalisé une seconde série de prises de sang 6 semaines après le rappel de vaccination dans le but de vérifier la persistance des anticorps dans le temps et par conséquent la protection immunitaire jusqu'à la fin du lot.

Les sérums sont analysés par une méthode ELISA développée par les équipes de Ceva-Phylaxia (Jacquinet, 2007) détectant et quantifiant les anticorps dirigés contre les *Parvovirus* contenus dans le vaccin. Ce test ELISA permet de corréler les niveaux de titres en anticorps circulants et la protection des canards. C'est un test qui a été validé par challenges effectués sur des animaux vaccinés. Le titre est calculé par extrapolation d'un sérum de contrôle interne dont le titre en vironeutralisation est connu. L'immunité active débute à partir d'un seuil de 4-5 en titres ELISA. Les titres au-delà de 1000 traduisent une circulation de virus sauvage.

À l'occasion des sérologies, une observation des animaux a été réalisée afin de vérifier les signes cliniques de parvovirose et l'état de ceux-ci.

Résultats

Dans les 7 jours suivant la vaccination, aucun effet indésirable n'a été observé sur aucun des groupes vaccinés.

Pour les sérologies effectuées 3 semaines après le rappel de vaccination, les quatre lots présentent une moyenne des titres >4 (4 étant le seuil de protection vaccinale).

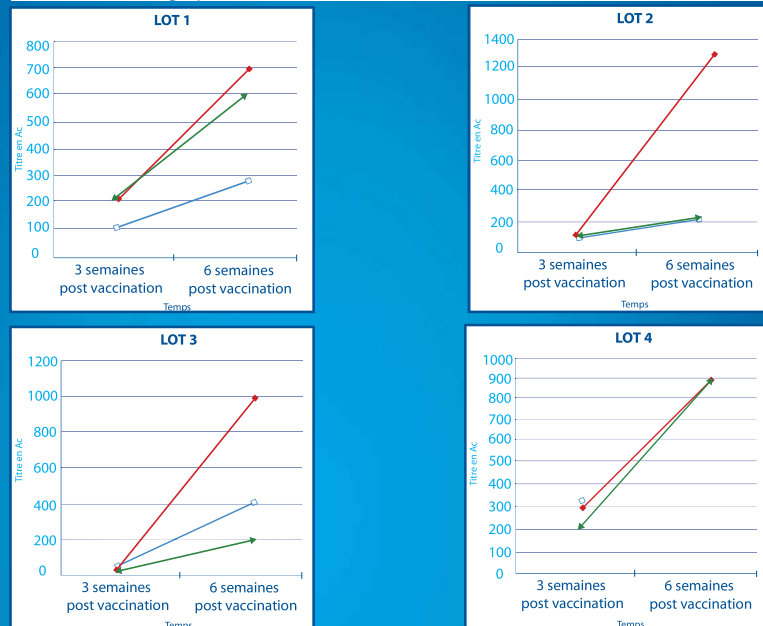
Aucune différence significative n'apparaît entre les 3 groupes des 4 lots (analyse de variance, test de Kruskal-Wallis, $\alpha = 0,05$).

Les sérologies effectuées 6 semaines après le rappel de vaccination mettent en évidence sur plusieurs groupes des titres individuels élevés (>3000). Ces titres extrêmes contribuent à augmenter fortement les titres moyens des groupes observés 6 semaines post-vaccination pour les 4 lots. Ainsi, des différences significatives sont notées entre 3 et 6 semaines post-vaccination pour les groupes G2 des lots 1, 2 et 3 et du groupe G3 du lot 4 (test SIDAK de comparaisons multiples, $\alpha = 0,05$). Dans chacun des lots de l'étude, aucun signe clinique de parvovirose n'a été constaté.

Figure 1. Titres sérologiques ELISA Parvovirus des 4 lots de canards en suivant les 3 groupes à 3 et 6 semaines après la vaccination de rappel

Légende :

- G1 : vaccin seul
- G2 : vaccin et autovaccin mélangés avant injection
- ◀▶ G3 : vaccin et autovaccin injectés simultanément sans mélange préalable



Discussion

Des mélanges de vaccins sont régulièrement réalisés par les opérateurs sur le terrain sans que les aspects innocuité et efficacité ne soient contrôlés. Cette étude a permis de démontrer que les innocuités locale et générale du mélange Deparmune® et autovaccin à adjuvant huileux sont satisfaisantes. En détail, il n'a pas été observé de différences de comportement entre les animaux recevant du Deparmune® seul et ceux recevant le mélange. Par ailleurs, à l'autopsie, il n'était également pas possible de faire la différence. Sur les sérologies réalisées 3 semaines après la vaccination, on n'observe aucune différence significative entre les 3 groupes, ce qui démontre l'absence d'impact sur le vaccin lorsque l'autovaccin est mélangé au vaccin ou administré simultanément sans mélange préalable.

Ainsi, la réponse sérologique est identique que l'administration du vaccin soit seule, séparée de l'autovaccin ou mélangée à celui-ci.

Les sérologies réalisées 6 semaines après vaccination montrent que les titres élevés observés sur certains individus des groupes G2 et G3 peuvent être compatibles avec ceux observés suite à une infection à *Parvovirus*. En effet, les titres supérieurs à 1000 ne sont pas ceux attendus après une vaccination contre la parvovirose mais correspondent généralement à une infection naturelle à *Parvovirus*. On ne peut toutefois pas exclure un effet stimulant de l'adjuvant de l'autovaccin, voire de l'autovaccin (adjuvant+corps bactériens avec présence de LPS) car la plupart des titres élevés s'observent sur des sujets ayant reçu l'autovaccin administré en mélange avec le vaccin.

Conclusion

La réponse sérologique des canards vis-à-vis de la parvovirose n'est pas altérée lorsque le vaccin à adjuvant huileux est administré avec un autovaccin à adjuvant huileux mélangé préalablement ou injecté séparément. L'hypothèse de l'effet " booster " de l'autovaccin sur la réponse immunitaire contre *Parvovirus* reste néanmoins à confirmer. Les auteurs rappellent que le mélange d'un vaccin commercial et d'un autovaccin est hors RCP et se fait sous l'entière responsabilité du prescripteur.

Références bibliographiques

1- Jacquinet C., Palya V., Kardi V3, Warin S., 2007. Intérêts du suivi sérologique dans des élevages de canards de Barbarie vaccinés avec le vaccin Deparmune®. Journées de la Recherche Avicole



Offrez du
FOIE GRAS
ON S'EN SOUVIENDRA !



Pour plus d'informations sur la tradition culturelle et gastronomique du Foie Gras :
www.leblogdufoiegras.com / www.lefoiegras.fr

Un Oeuf chaque jour... En forme toujours !*

Grâce à ses qualités nutritionnelles,
l'Oeuf est un aliment d'exception

L'Oeuf offre des protéines de qualité pour
un prix très abordable

En cuisine, l'Oeuf fait merveille dans
de nombreuses recettes salées ou sucrées



Pour en savoir plus sur l'Oeuf, connectons-nous sur www.leblogdeloeuf.com

Le CNPO est l'Interprofession de l'Oeuf qui représente chacun des maillons de la filière Oeuf, des accoueurs aux transformateurs en passant par les éleveurs, il regroupe huit organisations. Le CNPO a été reconnu par les pouvoirs publics le 12 mars 1996. Il est chargé de contribuer au développement et à la prospérité des différentes branches de la filière ponte.

*sauf contre indication



Comité National pour
la Promotion de l'Oeuf



Delacon.
performing nature