



# Bulletin épidémiologique Santé animale - alimentation

Octobre 2017 trimestriel/numéro 80

ÉDITORIAL

Dans ce numéro d'octobre 2017, vous trouverez tout d'abord quatre articles sur l'influenza aviaire, explorant en situation de crise, les paramètres de diffusion et de persistance des virus hautement pathogènes dans les élevages infectés. Ces articles viennent en complément de ceux parus dans le précédent numéro d'avril consacrés à la description de l'épizootie d'influenza aviaire hautement pathogène en France et Europe en 2016-2017. L'article consacré à la surveillance des virus influenza porcins par le réseau Résavip présente la synthèse de la surveillance de la diversité de ces virus en élevage porcin, dispositif de vigilance vis-à-vis de ces virus potentiellement zoonotiques.

Enfin un article relate l'investigation épidémiologique de cas groupés de fièvre charbonneuse en élevage bovin dans l'Est de la France. Ses résultats ont montré que la sensibilisation vis-à-vis de la fièvre charbonneuse de l'ensemble des professionnels est indispensable pour une suspicion précoce de l'infection et ainsi éviter de nouveaux épisodes de ce type à l'avenir.

Par ailleurs, les modalités de diffusion du *Bulletin épidémiologique, Santé animale – Alimentation (BE)* changent à partir du numéro 80. Les articles du *BE* sont désormais mis en ligne dans leur forme définitive dès qu'ils sont prêts, afin de ne pas retarder leur lecture. Les articles mis en ligne sont ensuite assemblés chaque trimestre, ce qui a conduit à revoir le maquettage de ces numéros périodiques. Les numéros spéciaux, comme le numéro spécial Maladies réglementées et émergentes ou d'autres numéros spéciaux thématiques (à paraître un numéro spécial Abeilles fin 2017) continueront à être publiés comme auparavant. Tous les articles du *BE* sont accessibles et téléchargeables à partir de la page internet du *BE*, comme les numéros dans leur intégralité. Nous vous rappelons enfin que les articles du *BE* sont libres de droit et ont vocation à être largement diffusés... sans oublier de mentionner l'origine des articles.

Bonne lecture,

**Le comité de rédaction**

#### Introduction page 1

Observations de terrain dans le Sud-Ouest de la France lors de l'épizootie d'influenza aviaire hautement pathogène de l'hiver 2016-2017

#### Article 1 page 2

Détection du génome de virus influenza aviaire A de sous type H5 dans des échantillons d'air collectés à l'intérieur, à l'extérieur et sous le vent de bâtiments de volailles infectées par un virus d'influenza aviaire hautement pathogène de sous type H5N8

#### Article 2 page 6

Efficacité de la décontamination des caisses et des véhicules de transport de canard: observations de terrain durant l'épizootie d'influenza aviaire H5N8 en France en 2017

#### Article 3 page 10

Évolution de la détection de virus influenza aviaire dans des élevages de volailles infectées par un virus influenza aviaire hautement pathogène de sous-type H5N8

#### Article 4 page 17

Évaluation de la survie des virus Influenza aviaires H5N8 dans les lisiers d'élevages de palmipèdes gras

#### Article 5

Fièvre charbonneuse en Moselle au cours de l'été 2016 : investigations épidémiologiques sur l'origine de la contamination et l'ampleur de l'épisode

#### Article 6

Réseau national de surveillance des virus influenza A chez le Porc (Résavip) Bilan de fonctionnement et résultats de la surveillance menée en 2016

#### Introduction page 1

*Field observations in the south-west of France during the winter 2016-2017 highly pathogenic avian influenza epizootic*

#### Paper 1 page 2

*Detection of the H5 subtype A avian influenza virus genome in air samples collected indoors, outdoors and downwind of poultry buildings infected with highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N8*

#### Paper 2 page 6

*Effectiveness of decontamination of crates and trucks used for duck transport : field observations during the avian influenza H5N8 epizootic, France 2017*

#### Paper 3 page 10

*Evolution of the detection of avian influenza virus in poultry farms infected with a highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N8*

#### Paper 4 page 17

*Evaluation of H5N8 avian influenza viruses' survival in manure from fatty web-footed bird farms*

#### Paper 5

*Anthrax in Moselle during the summer 2016: investigations to identify the origin of the infection and understand the extent of the outbreak*

#### Paper 6

*National network for surveillance of type A influenza virus in swine (Résavip) – Review of operations and surveillance results for 2016*

# Bulletin épidémiologique Santé animale - alimentation

Octobre 2017  
Dossier influenza aviaire

Dissémination et persistance dans l'environnement  
des virus influenza aviaries

## Observations de terrain dans le Sud-Ouest de la France lors de l'épizootie d'influenza aviaire hautement pathogène de l'hiver 2016-2017

Ont contribué à la rédaction des quatre articles de ce dossier : Axelle Scoizec, Adeline Huneau-Salaün, Audrey Schmitz, Rozenn Souillard, Rodolphe Thomas, Patrick Daniel, Marion Pertusa, Nathalie Rousset, Eric Niqueux, Nicolas Eterradossi, Sophie Le Bouquin

Depuis l'hiver 2015, la France a subi deux épisodes successifs d'influenza aviaire qui ont sévèrement impacté les filières palmipèdes à foie gras, mais aussi l'ensemble des filières avicoles. À chaque fois, les questions de la dissémination des virus et de leur persistance dans l'environnement ont été au cœur des préoccupations sanitaires. Ainsi, connaître la persistance des virus dans les lisiers d'élevage est un préalable indispensable à la définition des modalités de stockage des effluents. De même, la connaissance de la persistance du virus dans l'environnement des élevages, et plus particulièrement sur les parcours fréquentés par les animaux, représente une information indispensable pour déterminer des durées de vide sanitaire satisfaisantes. Les parcours tout comme les effluents d'élevage sont, d'une manière générale, difficiles à assainir et constituent l'un comme l'autre des points critiques dans la décontamination des sites d'élevage. Dans ces deux crises, les voies de dissémination des virus ont été multiples, et les transports d'animaux vivants ont joué un rôle primordial. Les dispositifs de nettoyage et de désinfection des caisses de transport et des véhicules mis en œuvre ont-ils été efficaces et comment en juger en l'absence d'une méthode de validation éprouvée? Enfin, la voie de diffusion aéroportée des virus d'un élevage à l'autre via les aérosols a été régulièrement évoquée par les acteurs locaux sans qu'elle ait pu être scientifiquement objectivée. Au cours de ces deux épizooties, toutes ces données ont manqué cruellement, aussi bien aux évaluateurs du risque chargés d'évaluer les niveaux de risque liés aux situations et pratiques rencontrées, qu'aux gestionnaires en charge de définir des règles sanitaires applicables et efficaces. Les données disponibles dans la littérature sur la survie des virus dans l'environnement ne permettaient pas de répondre directement aux questionnements soulevés car elles ne sont pas extrapolables directement d'une souche virale à une autre, étaient absentes en ce

qui concerne le lisier de palmipèdes, et dans la grande majorité ont été produites en conditions expérimentales et contrôlées ou dans des conditions de terrain peu transposables aux conditions d'élevage rencontrées en France.

Au cours de l'épizootie de l'hiver 2016-2017, nous avons tenté de recueillir des informations sur le terrain susceptibles d'apporter des éléments de réponse à quelques questions récurrentes. La collecte des données s'est réalisée dans des conditions délicates en situation de crise, sur un laps de temps court et à un moment où les différents acteurs, éleveurs, services vétérinaires, laboratoires étaient peu disponibles. Les résultats présentés ne sont pas encore parfaitement consolidés, ils présentent l'inconvénient majeur d'être trop peu nombreux pour en tirer des conclusions généralisables. Ils ont toutefois l'avantage d'apporter des éléments de compréhension concrets pour cette épizootie 2016-2017. Quatre aspects sont successivement abordés dans quatre articles: i) l'environnement des lots infectés (bâtiment et parcours), ii) l'air dans et autour des bâtiments de lots infectés, iii) le lisier d'élevages de canards infectés et iv) les camions de transport dans le cadre des abattages préventifs de lots de volailles.

Ces études, malgré leurs limites, ont mis en évidence une contamination importante de l'environnement des lots infectés et accrédité la possibilité d'une diffusion par voie aéroportée via la détection de génome viral sur parcours non utilisé, à proximité d'un bâtiment de volailles infectées et sur des échantillons d'air prélevés par ailleurs autour de foyers. Ces études ont également mis en évidence que les fosses à lisier pouvaient constituer un lieu de persistance des virus et que les mouvements des animaux pour la mise en œuvre des abattages préventifs pouvaient représenter un risque important de contamination environnementale.

# Détection du génome de virus influenza aviaire A de sous type H5 dans des échantillons d'air collectés à l'intérieur, à l'extérieur et sous le vent de bâtiments de volailles infectées par un virus d'influenza aviaire hautement pathogène de sous type H5N8

Axelle Scoizec (1), Eric Niqueux (2), Rodolphe Thomas (1), Patrick Daniel (3), Audrey Schmitz (2), Sophie Le Bouquin (1)

Auteur correspondant : axelle.scoizec@anses.fr

(1) Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité d'Épidémiologie et bien-être en aviculture et cuniculture, Ploufragan, France

(2) Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Virologie immunologie parasitologie aviaires et cunicoles, Ploufragan, France

(3) Laboratoire des Pyrénées et des Landes, Mont de Marsan, France.

## Résumé

Lors de l'épizootie française d'IAHP H5N8 de l'hiver 2016-2017 en France, la propagation rapide des foyers malgré les mesures de contrôle mises en place, dans des zones de forte densité d'élevages, la perception des acteurs de terrain concernant la voie d'introduction du virus dans les élevages ainsi que l'augmentation de l'incidence dans le département des Landes après le passage de la tempête Marcel, ont soulevé la question de la possible contribution de la diffusion aéroportée à la dissémination de la maladie entre élevages. Comme première approche pour répondre à cette question, nous avons exploré la contamination de l'air dans et autour des bâtiments de lots infectés via des prélèvements effectués dans cinq foyers d'IAHP H5N8 de volailles lors de cette épizootie. L'étude a permis de mettre évidence la détection de génome viral IA H5 dans l'air à l'intérieur mais également à l'extérieur des bâtiments d'élevage dans des foyers d'IAHP H5N8, jusqu'à une distance de 50 à 100 m des bâtiments. Ces résultats vont dans le sens l'hypothèse d'une transmission aéroportée de virus IAHP H5N8.

## Mots-clés

Influenza aviaire, IAHP, environnement, diffusion aérienne

## Abstract

**Detection of the H5 subtype A avian influenza virus genome in air samples collected indoors, outdoors and downwind of poultry buildings infected with highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N8**

*During HPAI H5N8 winter 2016-2017 epizootic in France, the rapid spread of the infection between farms in high density zones despite the control measures implemented, the field stakeholders' perception on virus introduction route into farms and the incidence increase after storm Marcel, raised the issue of the possible airborne transmission contribution to the global farm to farm spread of the disease. As a first step to explore that question, we explored the air contamination inside, outside and downwind from five infected poultry flocks houses during that epizootic. This study evidenced the AI H5 viral RNA detection in air samples inside but also outside poultry flocks houses in HPAI H5N8 outbreaks, up to 50-100 m from poultry house. These results are in accordance with the hypothesis of airborne transmission of H5N8 HPAI viruses.*

## Keywords

*Avian influenza, HPAI, Environment, Airborne transmission*

La propagation rapide des foyers d'influenza aviaire (IA) hautement pathogène (IAHP) H5N8 et H5Nx de la lignée A/gs/Gd/1/96 clade 2.3.4.4 malgré les mesures de contrôle mises en place, dans des zones de forte densité d'élevages, la perception des acteurs de terrain concernant la voie d'introduction du virus dans les élevages (éleveurs, agents des services de l'État), la proportion élevée des élevages infectés dans certaines zones ainsi que l'augmentation de l'incidence dans le département des Landes après le passage de la tempête Marcel, ont soulevé la question de la possible contribution de la diffusion aéroportée dans l'épizootie d'IAHP H5N8 en France en 2016-2017. La capacité des volailles à transmettre par voie aéroportée des virus influenza a été mise en évidence précédemment par des essais expérimentaux sur des poulets avec des souches d'IAHP H5N1 (Spekreijse et al. 2011, Spekreijse et al. 2013) et a été fortement suggérée par des études de terrain qui ont permis la détection voire l'isolement de virus IA dans la fraction alvéolaire des aérosols (i.e. la fraction de l'air correspondant aux particules de diamètre inférieur à 5µm, pouvant pénétrer les voies respiratoires profondes) dans des marchés de volailles vivantes en Chine (Zhou et al. 2016, Chen et al. 2009, Kang et al. 2016) et lors de foyers d'IA à l'intérieur de bâtiments de volailles, jusqu'à une distance de 59 m pour des virus IA faiblement pathogènes (IAFP), jusqu'à une distance de 1000 m pour la détection et de 70 à 150 m pour l'isolement

avec des virus IAHP H5N2 de clade 2.3.4.4 (Torremorell et al. 2016, Jonges et al. 2015, Alonso et al. 2017). Des études épidémiologiques confortent également l'hypothèse de la voie aéroportée comme voie possible d'infection de lots de volailles. C'est ainsi l'hypothèse majeure avancée pour expliquer l'association entre la proximité géographique d'élevages de porcs et la séropositivité d'élevages de dindes à un virus d'influenza de type A d'origine porcine (Corzo et al. 2013). Les études par modélisation de l'épizootie d'IAHP H7N7 en 2003 aux Pays-Bas ont estimé que la contribution d'un mécanisme possible de diffusion liée au vent était aux alentours de 18 % des cas de contamination d'élevages de volailles (Ypma et al. 2013) et ont montré que la diffusion liée au vent pouvait contribuer substantiellement à la diffusion à courte distance, expliquant par exemple 24 % des transmissions dans un rayon de 25 km (Ssematimba et al. 2012).

Afin de contribuer à l'évaluation de l'hypothèse de la voie de diffusion aéroportée lors de l'épizootie 2016-2017 d'IAHP H5N8 en France, l'objectif de cette étude était de déterminer si des virus IA étaient détectables sur des échantillons d'air collectés à l'intérieur, à l'extérieur et sous le vent de bâtiments de volailles infectées par un virus IAHP H5N8, dans des conditions de terrain. Cette étude a été conçue et réalisée dans le cadre d'investigations épidémiologiques menées en urgence lors de l'épizootie.

## Matériels et Méthodes

### Sélection des lots de volailles

L'étude a été réalisée en janvier et mars 2017. Le recrutement des lots a été mené en collaboration avec les services des DDecPP des départements concernés et les prélèvements réalisés avec l'accord des éleveurs. Trois lots de canards (nommés A, B et C) et deux lots de poulets (nommés D et E), situés dans les départements des Landes et des Pyrénées-Atlantiques ont été étudiés. Tous les lots étaient confirmés infectés par un virus IAHP H5N8 au moment de la visite. Les prélèvements de confirmation avaient été réalisés dans les deux à sept jours précédents. Les lots étaient confinés à 100 % dans trois cas sur cinq lors de la réalisation des prélèvements d'air. Pour un lot de poulets (E), le chargement des volailles dans les caissons à CO<sub>2</sub> situés à l'extérieur du bâtiment dans le cadre de la dépopulation du foyer a démarré durant la visite. Les caractéristiques des lots sont résumées dans le [tableau 1](#).

### Protocole et méthodes d'échantillonnage d'air

Afin de détecter du génome de virus IA dans les aérosols, des prélèvements d'air ont été réalisés en utilisant l'échantillonneur d'air Coriolis<sup>®</sup> microbial (Bertin Technologies, St-Quentin en Yvelines, France) selon les réglages suivants: débit d'aspiration de 300 L/min, 10 min/échantillon, échantillon collecté dans 10 à 12 mL de solution Triton à 0,005 %. Après chaque prélèvement, l'échantillonneur était nettoyé et désinfecté et les échantillons stockés entre 0 et +4°C. Les échantillons étaient transportés dans les 12 heures suivant leur réalisation au laboratoire agréé le plus proche où ils étaient stockés à une température < 65°C dans l'attente de leur analyse.

Pour chaque lot de volailles, les échantillons d'air étaient collectés dans un ordre précis: le premier sous le vent du bâtiment à une distance comprise entre 50 et 110 m, le second à 5 m du bâtiment, le troisième au niveau des sorties d'air à l'extérieur du bâtiment et le dernier à l'intérieur. Pour le lot E, le chargement des volailles ayant débuté au cours de la visite, les échantillons ont été prélevés à 110 m et à

l'intérieur du bâtiment ainsi qu'à une distance d'un mètre du camion en cours de chargement. Un échantillon témoin négatif a été collecté à une distance de plus de 5 km de tout élevage de volailles.

### Détection et quantification de l'ARN génomique de virus IA

Après concentration puis extraction de l'ARN, les échantillons ont été testés par RT-PCR temps réel (rRT-PCR) gène M. Les échantillons avec détection d'un signal gène M étaient testés ensuite par rRT-PCR gène H5. Nous nous référerons dans la suite du texte aux échantillons avec détection d'un signal de génome viral par rRT-PCR en tant qu'échantillons positifs. Le nombre de copies de gène M par mètre cube d'air a été estimé à partir des valeurs brutes de Ct obtenues en rRT-PCR gène M, d'après une calibration obtenue par dilution sériée d'une suspension de virus H5N8 HP de clade 2.3.4.4 isolé en France.

## Résultats

### Détection d'ARN génomique viral d'influenza aviaire

Aucun signal n'a été détecté par rRT-PCR gène M dans l'échantillon d'air témoin négatif. Tous les échantillons d'air détectés positifs lors de l'étude étaient à la fois positifs par rRT-PCR gène M et gène H5. Tous les échantillons d'air collectés à l'intérieur (5/5), collectés au niveau des sorties d'air (4/4), à une distance de 5 m (4/4) étaient positifs. Trois des cinq échantillons collectés sous le vent à une distance de 50 à 110 m étaient positifs ([Tableau 2](#)). Ces trois lots (A, D, E) étaient soumis respectivement à des températures ambiantes lors de l'échantillonnage de 2, 12 et 20°C et présentaient des signes cliniques (mortalité). Les deux lots (B & C) sans détection de signal pour l'échantillon prélevé sous le vent, étaient soumis à des températures ambiantes de 17 et 24°C et ne présentaient pas de signes cliniques. En outre dans ces lots, la densité animale (nombre d'animaux par m<sup>2</sup>) intra-bâtiment était faible ([Tableaux 1 et 2](#)). La proportion d'animaux excréteurs était quant à elle comparable entre les trois lots A, D et E et le lot C, mais significativement inférieure dans le lot B ( $p \leq 0,05$ ). L'échantillon d'air collecté au niveau du chargement du lot E était positif.

**Tableau 1.** Caractéristiques des lots de volailles étudiés et des conditions environnementales au moment de la réalisation des prélèvements d'air

Lot	Dép.	Espèce/ prod.	Bât.	Effectif initial du lot	Densité de volailles en bât. <sup>A</sup>	Date de confirmation <sup>B</sup> (jj/mm/aaaa)	Proportion de pools positifs <sup>C</sup>	Signes cliniques	Date des prélèvements (jj/mm/aaaa)	Lieu du prélèvement/ distance (mètres)	Temp. ambiante (°C)	Vitesse du vent (km/h)
A	40	Canard/ PAC <sup>D</sup>	Tunnel <sup>F</sup>	2500	7/m <sup>2</sup>	29/01/2017	2/2	Mortalité/ signes cliniques	31/01/2017	Intérieur Sorties d'air Extérieur à 5 m Sous le vent 50 m	NR <sup>E</sup> NR NR 20	< 5
B	64	Canard/ PAC	Tunnel	3000	0,5/m <sup>2</sup>	09/03/2017	5/24	Aucun	16/03/2017	Intérieur Sorties d'air Extérieur à 5 m Sous le vent 80 m	NR NR NR 24	10
C	64	Canard/ gavage	Classique	800	2,5/m <sup>2</sup>	11/03/2017	12/12	Aucun	16/03/2017	Intérieur Sorties d'air Extérieur à 5 m Sous le vent 60 m	NR NR NR 17	< 5
D	40	Poulet/ chair	Classique	4000	1/m <sup>2</sup>	14/03/2017	2/2	Mortalité/ signes cliniques	21/03/2017	Intérieur Sorties d'air Extérieur à 5 m Sous le vent 50 m	NR NR NR 12	< 5
E	64	Poulet/ chair	Classique	4400	8/m <sup>2</sup>	18/03/2017	8/8	Mortalité/ signes cliniques	22/03/2017	Intérieur Chargement Sous le vent 110 m	NR NR 2	≈ 0

<sup>A</sup> Au moment de la réalisation des prélèvements

<sup>B</sup> Date de réalisation des prélèvements ayant conduit à la confirmation de l'infection par un virus IAHP H5N8

<sup>C</sup> Proportion de pools de cinq écouvillons (cloacaux ou oropharyngés) positifs par rRT-PCR vis-à-vis du gène M lors des prélèvements officiels

<sup>D</sup> PAC: prêts à gaver

<sup>E</sup> NR: non relevé

<sup>F</sup> Tunnel: tunnel ouvert sur les deux faces (bâtiment ouvert)

**Tableau 2.** Détection de génome viral influenza dans des échantillons d'air par rRT-PCR à l'intérieur et à l'extérieur de bâtiments de volailles infectées par un virus IAHP H5N8 de clade 2.3.4.4 (France 2017)

Lot	Espèce/prod	Valeur de Ct <sup>A</sup> par rRT-PCR gène M/Valeur de Ct par rRT-PCR gène H5				
		Intérieur	Sorties d'air	Extérieur 5 m	Sous le vent (distance en mètres)	Point de chargement
A	Canard/PAG <sup>B</sup>	32,4/34,9	32,7/35,8	32,3/36,1	33,6/35,4 (50)	NR <sup>C</sup>
B	Canard/PAG	35,6/39,7	31,2/34,8	33,9/35,8	Non détecté (80)	NR
C	Canard/gavage	29,8/30	31/30,7	30,5/31,1	Non détecté (60)	NR
D	Poulet/chair	34,9/35,3	33,1/34,4	33,1/36,2	34,2/38,8 (50)	NR
E	Poulet/chair	31,5/32	NR	NR	34,2/37,5 (110)	28,7/29,3

<sup>A</sup> Ct: cycle threshold (cycle seuil)

<sup>B</sup> PAG: prêts à gaver

<sup>C</sup> NR: non réalisé

### Quantification du génome viral IAHP dans les échantillons d'air

La quantité de génome viral (exprimée en log<sub>10</sub> de copies d'ARN par m<sup>3</sup>) dans les échantillons d'air était comprise entre 4,33 et 6,09 pour les lots de canards et entre 4,54 et 6,43 pour les lots de poulets. La concentration maximale mesurée correspondait à l'échantillon prélevé dans l'élevage E à une distance de 1 m au niveau du camion en cours de chargement des animaux. Les concentrations mesurées à l'intérieur du bâtiment étaient légèrement inférieures à celles au niveau des sorties d'air pour deux lots sur quatre testés. Ce sont les concentrations à l'intérieur du bâtiment qui sont les plus variables d'un lot à l'autre comparativement aux autres lieux de prélèvements (Tableau 3). Les deux concentrations les plus faibles mesurées à l'intérieur du bâtiment correspondaient aux lots (B & D) avec les plus faibles densités d'animaux intra-bâtiment au moment de la réalisation des prélèvements (Tableau 1). De plus le lot avec la concentration intra-bâtiment la plus faible (lot B) était également celui avec la plus faible proportion de pools d'animaux positifs (Tableau 1). Les concentrations les plus élevées mesurées à l'intérieur et à courte distance du bâtiment (sortie d'air et à 5 m de distance) correspondaient au lot C, composé de canards en gavage. Pour les mesures à l'extérieur du bâtiment, on constate une diminution de la moyenne des concentrations mesurées avec l'augmentation de la distance au bâtiment (Tableau 3).

## Discussion

L'étude a permis de mettre évidence la détection d'ARN de virus IA H5 dans l'air à l'intérieur, mais également à l'extérieur des bâtiments d'élevage dans des foyers d'IAHP H5N8. Ces résultats confortent l'hypothèse d'une transmission aéroportée.

La variabilité inter-lots importante des concentrations de génome viral dans l'air dans le bâtiment résulterait probablement de la variation inter-lots de la proportion de volailles excrétrices et de la densité animale au moment de la réalisation des prélèvements, tel que cela pouvait être logiquement attendu. La diminution de la proportion d'échantillons positifs et de la concentration dans les échantillons positifs entre ceux collectés à faible distance (sortie d'air et 5 m de

**Tableau 3.** Concentration en ARN viral (log<sub>10</sub> copies d'ARN par m<sup>3</sup>) des échantillons d'air positifs par site de prélèvements (France 2017)

Site de prélèvement	Nombre de prélèvements	Moyenne	Écart type
Zone de chargement	1	6,43	-
Intérieur du bâtiment	5	5,17	0,73
Sortie d'air	4	5,42	0,32
Distance de 5 m du bâtiment	4	5,29	0,44
Distance de 50 à 110 m du bâtiment	3	4,82	0,11

distance) et ceux collectés à 50-110 m du bâtiment d'élevage, reflète probablement la diminution de la concentration virale en fonction de la distance à la source d'émission, par un phénomène de dilution.

Les niveaux de détection de génome viral dans l'air (proportion d'échantillons positifs et concentration des échantillons positifs) sont comparables voire supérieurs à ceux trouvés dans et autour de bâtiments de volailles infectées par un virus IAHP H5N2 de clade 2.3.4.4 durant l'épizootie 2015 aux États-Unis (Torremorell et al. 2016) et sont nettement supérieures à ceux trouvés dans le cadre de foyers IA faiblement pathogène aux Pays-Bas (Jonges et al. 2015) et dans des marchés de volailles vivantes en Chine avec des virus IA faiblement pathogènes (Zhou et al. 2016, Chen et al. 2009). Dans notre étude, la viabilité des virus dans les échantillons d'air collectés n'a pas pu être déterminée du fait de la nature du diluant utilisé lors de l'échantillonnage. L'hypothèse que les virus détectés dans les échantillons d'air de cette étude sont en partie viables peut être envisagée de par le niveau des concentrations mesurées. En effet, dans le cadre d'autres études, des isolements viraux sur des prélèvements d'air ont été possibles avec des concentrations sur prélèvement d'air comparables que ce soit avec des souches virales d'IA différentes (Zhou et al. 2016) ou bien avec une souche de même clade (Torremorell et al. 2016).

Afin de corroborer l'hypothèse d'une transmission aéroportée, il serait toutefois nécessaire de pouvoir s'assurer du caractère infectieux des virus détectés dans l'air en modifiant les méthodes d'échantillonnage pour permettre des essais d'isolement viral, mais également de déterminer à quelle fraction de l'air correspond cette détection. En effet, une détection sur la fraction alvéolaire de l'air (considérée comme la partie de l'air qui peut être inhalée jusque dans les voies respiratoires profondes, i.e. les particules fines) rend très plausible la possibilité d'infection par voie aéroportée, les particules infectieuses pouvant alors atteindre les alvéoles pulmonaires, et être ainsi plus susceptibles de causer une infection. Cependant, des études expérimentales antérieures ont montré la possibilité de diffusion virale entre lots de volailles par voie aéroportée avec un virus IAHP H5N1 (Spekreijse et al. 2011) avec des concentrations aériennes de génome viral comparables (Spekreijse et al. 2013) à celles de notre étude qui, exprimées en log<sub>10</sub> EID50 par m<sup>3</sup>, se situaient entre 2,1 et 4,2. De plus, des études de terrain ont permis de démontrer que le génome de virus IAHP H5N2 de clade 2.3.4.4 était détecté à la fois sur les particules fines à forte pénétration pulmonaire et sur les particules de diamètre plus élevé (Torremorell et al. 2016, Alonso et al. 2017).

Malgré les limites de l'étude, nos résultats suggèrent que l'air évacué de bâtiment de volailles infectées par un virus IAHP H5N8 pourrait être une source de contamination environnementale via les aérosols, par dépôt de poussière contaminée sur les surfaces à proximité des bâtiments générant ainsi de possibles vecteurs passifs (personnes, matériels, véhicules, faune). Ce phénomène serait très dépendant des facteurs climatiques pouvant influencer la survie des virus ainsi déposés ou transportés tels que la température, l'humidité relative

et l'exposition aux ultra-violets. Ils suggèrent également que la possibilité d'une transmission aéroportée ne peut être exclue eu égard aux quantités de virus émises par un bâtiment de volailles infectées, en particulier si l'on considère l'ensemble de la période d'émission qui couvre généralement plusieurs jours (par exemple dans notre étude la durée pour le lot B peut être estimée à au moins 7 jours), et les concentrations mesurées dans cette étude. Néanmoins la possibilité d'une transmission aéroportée est non seulement dépendante des conditions climatiques mais également des facteurs influençant le mode de dispersion des aérosols infectieux tel que le vent et de la réceptivité des espèces exposées aux aérosols: à quelle dose peuvent être soumis les élevages voisins, en prenant en compte les phénomènes de dilution et dispersion et cette dose est-elle infectieuse pour l'espèce présente ?

Nos résultats et tout particulièrement celui concernant l'échantillon d'air au moment du chargement d'un lot infecté, questionnent également les mesures actuelles de gestion des foyers. Le confinement des volailles dans les bâtiments pourrait ne pas permettre de prévenir suffisamment la diffusion du virus dans l'environnement proche des bâtiments (surtout lors de conditions hivernales favorables à la survie des virus dans l'environnement) et le mode actuel de dépopulation des foyers qui nécessite la manipulation des oiseaux à l'extérieur des bâtiments pourrait être la source d'une émission importante de poussières et aérosols infectieux dans l'environnement

Ce risque potentiel de diffusion à partir du foyer justifie ainsi la nécessité de pratiquer un abattage le plus rapide possible des animaux en cas de foyer.

Pour réduire au maximum ces émissions, en plus de la rapidité de la réalisation de la dépopulation d'un foyer après confirmation de l'infection, il conviendrait d'envisager des méthodes de dépopulation limitant les émissions de poussières et d'aérosols vers l'extérieur des bâtiments. Par exemple, des méthodes telles que l'abattage d'urgence de masse de volailles intra-bâtiment par couverture des animaux par une mousse aqueuse et le compostage intra-bâtiment des carcasses et de la litière qui ont été développées aux États-Unis (Benson et al. 2007, Benson et al. 2008) peuvent contribuer à limiter largement l'émission de virus dans le milieu extérieur<sup>(1)</sup>.

## Conclusion

Nos résultats vont dans le sens de la possibilité d'une transmission aéroportée dans les cas de foyers d'IAHP H5N8 mais pour étayer cette hypothèse, des preuves ou indices de la viabilité des virus dans l'air et en particulier dans la fraction alvéolaire de l'air ainsi que des preuves ou indices épidémiologiques sont encore nécessaires.

## Remerciements

Aux éleveurs ayant accepté de participer à cette étude, aux directions départementales de protection des populations des Landes et du Gers pour leur appui et aux techniciens du Laboratoire des Pyrénées et des Landes pour la réalisation des analyses et leur disponibilité.

## Références bibliographiques

- Alonso C, Raynor PC, Goyal S, Olson BA, Alba A, Davies PR and Torremorell M. Assessment of air sampling methods and size distribution of virus-laden aerosols in outbreaks in swine and poultry farms. *J Vet Diagn Invest.* 2017 May;29(3):298-304.
- Benson E, Malone GW, Alphin RL, Dawson MD, Pope CR, Van Wicklen GL. Foam-Based Mass Emergency Depopulation of Floor-Reared Meat-Type Poultry Operations. *Poult Sci.* 2007; 86(2):219–24.
- Benson ER, Malone GW, Alphin RL, Johnson K, Staicu E. Application of in-house mortality composting on viral inactivity of Newcastle disease virus. *Poult Sci.* 2008 Apr;87(4):627-35. doi: 10.3382/ps.2007-00308.
- Chen P-S, Lin CK, Tsai FT, Yang C-Y, Lee C-H, Liao Y-S, et al. Quantification of Airborne *Influenza* and Avian *Influenza* Virus in a Wet Poultry Market using a Filter/Real-time qPCR Method. *Aerosol Sci. Technol.* 2009; 43(4):290–7. doi: 10.1080/02786820802621232.
- Corzo CA, Culhane M, Dee S, Morrison RB, Torremorell M (2013) Airborne Detection and Quantification of Swine *Influenza* A Virus in Air Samples Collected Inside, Outside and Downwind from Swine Barns. *PLoS ONE* 8(8): e71444. doi:10.1371/journal.pone.0071444.
- Jonges M, van Leuken J, Wouters I, Koch G, Meijer A, Koopmans M. Wind-Mediated Spread of Low-Pathogenic Avian *Influenza* Virus into the Environment during Outbreaks at Commercial poultry farms. *PLoS ONE* 10(5): e0125401.
- Kang N, Chen M, Bi F-Y, Chen M-M, Tan Y. First Positive Detection of H9 Subtype of Avian *Influenza* Virus Nucleic Acid in Aerosol Samples from Live Poultry Markets in Guangxi, South of China. *Chinese Medical Journal.* 2016;129(11):1371-1373. doi:10.4103/0366-6999.182824.
- Spekreijse D, Bouma A, Koch G, Stegeman JA. Airborne transmission of a highly pathogenic avian *influenza* virus strain H5N1 between groups of chickens quantified in an experimental setting. *Vet Microbiol* 2011; 2:88–95.
- Spekreijse D, Bouma A, Koch G, Stegeman JA. Quantification of dust-borne transmission of highly pathogenic avian *influenza* virus between chickens. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2013; 7(2) 132-138.
- Ssematimba A, Hagens TJ, de Jong MCM. Modelling the Wind-Borne Spread of Highly Pathogenic Avian *Influenza* Virus between Farms. Vespignani A, ed. *PLoS ONE.* 2012;7(2):e31114. doi:10.1371/journal.pone.0031114.
- Torremorell M, Alonso C, Davies PR, Raynor PC, Patnayak D, Torchetti M, and McCluskey B. Investigation into the Airborne Dissemination of H5N2 Highly Pathogenic Avian *Influenza* Virus During the 2015 Spring Outbreaks in the Midwestern United States. *Avian Dis.* 2016 60 (3), 637-643.
- Ypma RJF, Jonges M, Bataille A, Stegeman A, Koch G, van Boven M, Koopmans M, van Ballegooijen WM, Wallinga J; Genetic Data Provide Evidence for Wind-Mediated Transmission of Highly Pathogenic Avian *Influenza*. *J Infect Dis* 2013; 207 (5): 730-735.
- Zhou J, Wu J, Zeng X, Huang G, Zou L, Song Y, Gopinath D, Zhang X, Kang M, Lin J, Cowling BJ, Lindsley WG, Ke C, Peiris JSM, Yen H. Isolation of H5N6, H7N9 and H9N2 avian *influenza* A viruses from air sampled at live poultry markets in China, 2014 and 2015. *Euro Surveill.* 2016;21(35):pii=30331.

(1) Note de la rédaction: à noter que les méthodes proposées par Benson et al. sont actuellement non conformes à la réglementation européenne sur le bien-être animal (règlement 1099/2009).

# Efficacité de la décontamination des caisses et des véhicules de transport de canard : observations de terrain durant l'épizootie d'influenza aviaire H5N8 en France en 2017

Adeline Huneau-Salaün, Axelle Scoizec, Rodolphe Thomas, Sophie Le Bouquin

Auteur correspondant : adeline.huneau@anses.fr

Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Épidémiologie et bien-être en aviculture et cuniculture, Ploufragan, France

## Résumé

La validation de la décontamination des caisses et des moyens de transport des volailles soulève de nombreuses interrogations chez les professionnels depuis la première crise d'influenza aviaire en 2015. Cette étude porte sur le contrôle de la décontamination de camions de transport dans le cadre des abattages préventifs de lots de volailles via huit séries de prélèvements sur camion et caisses de transport dans quatre abattoirs, au cours de l'épizootie d'influenza aviaire hautement pathogène H5N8 en hiver 2016-2017. Les résultats suggèrent que les mouvements des animaux lors de la mise en œuvre des abattages préventifs pouvaient représenter un risque important de contamination environnementale, attesté par la détection de génome viral d'influenza aviaire sur des caisses et des véhicules avant le processus de décontamination, dans quelques cas par la persistance de cette présence après la décontamination, et par la mise en évidence de la possibilité d'une contamination croisée de caisses lors du processus de décontamination.

## Mots-clés

Influenza aviaire, IAHP, H5N8, volailles, canard, décontamination, véhicules

## Abstract

**Effectiveness of decontamination of crates and trucks used for duck transport : field observations during the avian influenza H5N8 epizootic, France 2017**  
*The validation of the decontamination process of crates and trucks used for poultry transport appeared to be a key issue for the professionals since the first avian influenza crisis in France in winter 2015-2016. This study focused on the control of the decontamination process of transport trucks and crates used for the preventive culling of duck flocks. Eight sampling series were carried out in four abattoirs during the HPAI H5N8 winter 2016-2017 epizootic. The results suggested that movements of animals generated during preventive culling could contribute to environment contamination, evidenced by avian influenza viral RNA detection on trucks and crates before decontamination, in few cases by the persistence of that detection on crates after decontamination process and by the possibility of cross-contamination of crates during the decontamination process.*

## Keywords

Avian Influenza, HPAI, H5N8, Poultry, Duck, Decontamination, Fomites

Pour lutter contre la diffusion de l'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) H5N8 dans les élevages de volailles du Sud-Ouest de la France durant l'hiver 2016-2017, un abattage préventif des palmipèdes a été mis en place par les autorités sanitaires (arrêté du 4 janvier 2017). La possibilité d'envoyer les oiseaux concernés par le dépeuplement dans des abattoirs réquisitionnés a entraîné le transport d'un nombre important de canards depuis les exploitations vers les abattoirs. Afin de prévenir tout risque de diffusion de l'IAHP durant ces mouvements, des mesures spécifiques de biosécurité ont été adoptées pour le transport des oiseaux (arrêté du 31 mars 2017 et note de service DGAL/SDSPA/2017-1 du 6 janvier 2017). Ces mesures imposaient notamment « le nettoyage et la désinfection [des véhicules et équipements utilisés pour le transport] dans les plus brefs délais après le déchargement » et « une vérification visuelle et microbiologique régulière de l'efficacité des opérations de nettoyage et de désinfection », dont la mise en œuvre était confiée au responsable du transport. La validation de la décontamination des caisses et des moyens de transport soulève de nombreuses interrogations chez les professionnels depuis la première crise d'IA en 2015. Cet article présente les résultats de contrôle de la décontamination des caisses et véhicules de transport obtenus lors de deux missions réalisées par l'Anses EBEAC (Unité Épidémiologie et bien-être en aviculture et cuniculture), entre le 24 janvier et le 1<sup>er</sup> février 2017 et entre le 17 et le 20 mars 2017, dans le contexte du dépeuplement des élevages de palmipèdes du Sud-Ouest.

## Matériel et Méthode

Le principe de cette étude d'observation était de comparer la fréquence d'isolement de génome viral d'IA sur les camions, les caisses de transport des canards et l'environnement d'abattage avant et après décontamination (Tableau 1). Le protocole de nettoyage et désinfection (N&D) est défini et appliqué par l'abatteur et/ou le transporteur; les informations sur ce protocole ont été relevées par l'enquêteur au moyen d'un questionnaire standardisé. Sept séries de prélèvements ont été réalisées dans quatre abattoirs, localisés dans le Gers (A, B), les Landes (C) et les Pyrénées-Atlantiques (D). Deux à quatre camions ont été étudiés par visite, le même véhicule étant suivi avant et après décontamination. Les prélèvements n'ont pas été faits sur les mêmes caisses avant et après décontamination mais chaque lot de cages en provenance d'un camion a été contrôlé aux deux stades. Les caisses ont été échantillonnées à l'aide d'une chiffonnette stérile sèche (Sodibox, France) frottée sur la moitié du fond de caisse et de deux écouvillons secs (Copan, Italie) appliqués sur l'intérieur et l'extérieur de la cage. Pour les camions, un prélèvement consiste en une chiffonnette passée sur au moins un mètre linéaire. Les aires bétonnées ont été contrôlées avec une paire de pédichiffonnettes stériles. Les prélèvements ont été acheminés le jour même dans un laboratoire agréé pour le criblage de l'IA. La recherche de génome viral a été réalisée individuellement sur chaque prélèvement par rRT-PCR gène M et gène H5 selon la méthode officielle (Spackman et al., 2002). Pour les besoins de l'étude,



**Tableau 1.** Prélèvements réalisés pour recherche de génome de virus IA sur les camions et caisses de transport de canards (N=690, France)

Abattoir	Date	Nb camions	Avant décontamination						Après décontamination					
			Caisse	Ext <sup>1</sup>	Camion		Aire <sup>3</sup>	Tot	Caisse	Ext	Camion		Aire	Tot
A	24/01	4	60	3	3	9	4	79	60	4	4	12	6	86
A	27/01	2	30	2	2	6	2	42	30	2	2	6	2	42
B	26/01	4	60	4	4	12	1	81	60	4	4	12	2	82
B	30/01	2	30	3	2	6	1	42	30	2	2	6	2	42
C	01/02	2	30	2	2	6	1	41	30	2	2	6	2	42
D	17/03	2	20	4		2	1	27	20	4		2	2	28
D	20/03	2	20	4		2	2	28	20	4		2	2	28
<b>Total général</b>		<b>18</b>	<b>250</b>	<b>22</b>	<b>13</b>	<b>43</b>	<b>12</b>	<b>340</b>	<b>250</b>	<b>22</b>	<b>14</b>	<b>46</b>	<b>18</b>	<b>350</b>

<sup>1</sup> bas de caisse, hayon et plateau<sup>2</sup> volant, pédales et poignée<sup>3</sup> aires de déchargement et de lavage des véhicules

A, B : Gers, C : Landes, D : Pyrénées-Atlantiques

**Tableau 2.** Protocoles de décontamination des caisses et véhicules de transport appliqués dans trois abattoirs de canards du Sud-Ouest dans le contexte d'abattage préventif contre l'IA (France, 2017)

Abattoir		A	B	C	D
Camion extérieur		<ul style="list-style-type: none"> <li>Désinfection des roues par pulvérisation à l'entrée</li> <li>Décapage HP</li> <li>Une désinfection par pulvérisation</li> <li>Désinfection des roues par pulvérisation à la sortie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Désinfection des roues par pulvérisation à l'entrée</li> <li>Décapage HP</li> <li>Une désinfection par pulvérisation</li> <li>Désinfection des roues par pulvérisation à la sortie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Désinfection des roues par pulvérisation à l'entrée</li> <li>Décapage HP</li> <li>Une désinfection par pulvérisation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rotoluve avec désinfectant à l'entrée</li> <li>Décapage HP à 60°C</li> <li>Une désinfection par moussage</li> <li>Rotoluve avec désinfectant à la sortie</li> </ul>
Camion cabine		<ul style="list-style-type: none"> <li>Pulvérisateur de désinfectant à disposition</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pas de décontamination</li> </ul>		
Caisse	Détrempe - lavage	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tunnel lavage BP</li> <li>Détergent pendant quelques secondes</li> <li>Rinçage</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Quai lavage avec système écartement des caisses</li> <li>Lavage BP</li> <li>Trempe à 80°C pendant 5 sec.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tunnel lavage BP</li> <li>Détergent pendant quelques secondes</li> <li>Rinçage</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Prélavage BP à 60°C avec détergent</li> <li>Trempe à 60°C, 20 sec. avec détergent</li> </ul>
	Décapage	<ul style="list-style-type: none"> <li>Si caisse non propre après lavage, décapage HP</li> </ul>			
	Désinfection	<ul style="list-style-type: none"> <li>Une désinfection par pulvérisation</li> <li>Reprise de la désinfection après nettoyage complémentaire si nécessaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Une désinfection par pulvérisation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Une désinfection par pulvérisation</li> <li>Reprise de la désinfection après nettoyage complémentaire si nécessaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Désinfection par immersion (20°C)</li> <li>Reprise de la désinfection après nettoyage complémentaire si nécessaire</li> </ul>

BP: basse pression, HP: haute pression

un prélèvement est considéré comme positif vis-à-vis de l'IA si la présence de gène M est détectée: ceci montre la présence de génome de virus IA, sans information complémentaire sur le ou les sous-types impliqués, leur capacité infectante ou leur pathogénicité. La détection du gène H5 permet de conclure à la présence d'ARN viral d'un ou de plusieurs virus IA de sous-type H5.

## Résultats et discussion

Les procédures de décontamination sont décrites dans le [tableau 2](#). Si le protocole pour les camions est relativement similaire dans les quatre sites étudiés, des différences importantes ont été notées pour les caisses: les procédures dépendent du matériel disponible (laveuse, système de trempage). Le choix des équipements de lavage est très fortement conditionné par la place disponible sur l'aire de N&D des cages. L'espace dédié à la décontamination des caisses apparaît parfois aussi insuffisant pour mettre en place les barrières sanitaires entre zones sale (réception) et propre (chargement) et éviter les croisements de circuits. Il est également difficile de bien séparer les circuits des camions entre déchargement, lavage et chargement, faute de place sur les sites. Les produits désinfectants utilisés dans les abattoirs A et D (glutéraldéhyde, ammoniums IV) et B (ammonium IV) sont actifs

contre les virus IA aux doses utilisées; pour le produit de l'abattoir B, l'activité contre l'IA est garantie à 20°C par le fabricant pour la concentration employée mais les jours d'observation, la température était inférieure à 5°C sur le quai de lavage et désinfection. Pour l'abattoir C, les informations sur les produits utilisés n'étaient pas encore disponibles lors de l'écriture de l'article.

Sur un total de 340 prélèvements réalisés avant nettoyage et désinfection, 86 se sont révélés positifs vis-à-vis du gène M en RT-PCR temps réel, marquant la présence de génome de virus IA de type A, soit 25 %. Ces résultats positifs ont été trouvés lors de cinq visites ([Tableau 3](#)), dans des proportions très variables selon les sites (0 à 63 %). La majorité des détections concernait les caisses (74/86, 86 %) mais sept camions sur les dix-huit prélevés au moment du déchargement ont aussi été détectés positifs sur leur extérieur ou leur intérieur; ces véhicules transportaient tous des caisses détectées positives. La détection du gène H5 a été observée pour quinze de ces 86 prélèvements positifs pour le gène M, essentiellement sur les caisses de transport des canards sur le site D le 17 mars (11/20, 55 %). Le gène H5 a aussi été retrouvé dans l'abattoir A sur les aires de lavage et de déchargement (n=3) et sur le châssis et bas de caisse d'un camion du site D. Les journées de prélèvements ont été programmées en fonction de contraintes logistiques alors que le statut des lots abattus était

**Tableau 3. Résultats positifs de recherche par RT-PCR temps réel de gène M**

Prélèvements réalisés avant et après décontamination des caisses, véhicules de transport et aires bétonnées dans trois abattoirs du Sud-Ouest (142 prélèvements positifs, France, 2017)

Abattoir	Date	Camion	Localisation	Avant	Après	Commentaires
A	24/01	1	Cabine	N.T	3/3	Contamination résiduelle élevée
			Ext. camion	N.T	1/1	
			Caisse	14/15	10/15	
		2	cabine	1/3	0/3	Possibilité d'une contamination croisée
			Roue	0/1	1/1	
			Caisse	9/15	6/15	
		3	Ext. camion	1/1	0/1	Contamination résiduelle élevée
			Caisse	15/15	5/15	
		4	Cabine	0/3	1/3	Possibilité d'une contamination croisée
			Caisse	9/15	7/15	Contamination résiduelle élevée
27/01	Aire			1/4	3/6	Possibilité d'une contamination croisée
		1	Ext. camion	0/1	1/1	
			Aire	2/2	0/2	
B	26/01	1	Cabine	1/3	0/3	
			Caisse	7/15	4/11	
		2	Ext. camion	1/1	1/1	
			Caisse	6/15	5/15	
		3	Cabine	1/3	1/3	
			Caisse	1/15	2/15	
		4	Ext. camion	1/1	0/1	
			Roue	1/1	0/1	
			Caisse	1/15	2/15	
		30/01	Aire			1/1
1	Caisse			0/15	1/15	
2	Caisse			0/15	1/15	
D	17/03	1	Cabine	0/1	1/1	Caisse bien décontaminées
			Ext. camion	1/2	0/2	
			Caisse	9/10	0/10	
		2	Cabine	0/1	1/1	Possibilité d'une contamination croisée
			Caisse	2/10	0/10	

N.T: non testé

Légendes:

- Camion initialement contaminé mais non détecté positif après décontamination (hors caisse)
- Camion non détecté positif avant décontamination (hors caisse) mais positif après
- Contamination initiale détectée
- Pas de contamination résiduelle détectée sur une surface initialement positive
- Contamination résiduelle d'une surface initialement positive
- Contamination résiduelle d'une surface non détectée positive avant décontamination

encore inconnu (sauf le 17 mars avec un lot détecté contaminé H5N8 IAHP à l'élevage sans signe clinique). Il aurait été plus intéressant de pouvoir cibler systématiquement l'abattage de lots infectés pour mieux évaluer l'efficacité de la décontamination. Il a pu être néanmoins établi *a posteriori* qu'au moins trois visites correspondaient à l'abattage de troupeaux infectés, ce qui a mené à l'observation d'une contamination importante des caisses mais aussi des camions avant N&D.

Après décontamination, 56 prélèvements sur les 350 effectués (16 %) ont montré la présence du gène M d'IA. Des échantillons positifs ont été détectés lors des cinq visites où du génome viral avait été trouvé avant N&D. Le gène H5 a été détecté quatre fois dans l'abattoir A, sur deux caisses et l'aire de lavage lors de la première visite et sur le châssis d'un camion lors de la seconde journée.

Comme avant N&D, la présence de génome viral M a surtout été observée sur des caisses: respectivement 15 % (14/90) et 18 % (29/160) d'échantillons positifs par chiffonnage et par écouvillonnage sur cages. Ceci concerne particulièrement deux visites lors desquelles les caisses avaient été détectées positives avant lavage. Plus étonnant,

deux caisses, appartenant à des chargements distincts, ont aussi été contrôlées positives après décontamination à l'abattoir B le 30 janvier bien qu'aucune présence initiale n'ait été détectée (0/30). Ce résultat a été observé avec un lavage manuel à basse pression, alors que les autres sites utilisent des laveuses ou tunnel de lavage pour cette étape. De plus, une étape de trempage apparemment insuffisamment maîtrisée (eau sale) malgré une température élevée (80°C) pourrait être à l'origine d'une contamination croisée des cages. Les dix camions étudiés durant ces trois visites sont repartis avec un lot de cages positif. Au contraire, aucune présence résiduelle d'ARN d'IA n'a été détectée sur les caisses lors de la visite du 17 mars à l'abattoir D alors que 60 % (12/20) des prélèvements étaient positifs avant N&D (transport de lots reconnus infectés par IA H5N8 HP). L'efficacité de la décontamination pourrait être attribuée à un protocole de nettoyage en trois phases (prélavage, trempage, détergence), uniquement appliqué dans cet abattoir.

Huit camions (sur 18 suivis) étaient positifs vis-à-vis du gène M après décontamination. Trois de ces camions n'avaient pas été

détectés positifs avant N&D; deux d'entre eux ont été contrôlés positifs à l'intérieur de la cabine (les chauffeurs avaient participé au déchargement des canards). À l'opposé, trois camions où la présence de génome d'IA a été trouvée avant décontamination n'ont pas été détectés positifs après nettoyage et désinfection.

Cette étude présente plusieurs limites, liées notamment à la difficulté de la réalisation d'observations durant une période de crise sanitaire. D'une part, un long délai de prise en charge des prélèvements par le laboratoire d'analyses a été observé pour trois visites (le 27 janvier dans les abattoirs A et C, le 1<sup>er</sup> février dans l'abattoir C, le 17 mars dans l'abattoir D) à cause d'un volume très important d'échantillons à traiter. Pour ces visites, une faible proportion de prélèvements positifs (0 à 2 %) a été obtenue, sans qu'il soit possible de savoir si cette situation était liée à l'absence de contamination ou à un biais analytique. La portée de l'étude se trouve donc limitée par cette difficulté. D'autre part, le nombre d'échantillons par camion a été déterminé pour permettre à un enquêteur de prélever le maximum d'échantillons sans perturber le rythme normal de fonctionnement de l'abattoir. Les contraintes logistiques ont donc prévalu sur l'optimisation du plan d'échantillonnage. Enfin la recherche des gènes M et H5 par rRT-PCR ne permet pas de savoir si l'ARN détecté correspond à un virus infectieux. L'avantage de cette méthode est sa mise en œuvre plus rapide et plus simple que l'isolement viral, la rendant intéressante pour le suivi de la contamination environnementale et l'évaluation de l'efficacité de la décontamination. Malgré les limites identifiées, le protocole de prélèvement proposé a montré que: 1) du génome viral peut être détecté en de nombreux points lors de l'abattage de lots contaminés, 2) le génome viral n'est pas systématiquement détecté lors de l'abattage de lots indemnes, 3) une positivité résiduelle peut être mise en évidence par cette méthode. Ces observations tendent à prouver que le chiffonnage-écouvillonnage couplé à la rRT-PCR gène M est un protocole adapté pour l'évaluation de l'efficacité de la décontamination même si aucun lien direct ne peut être établi avec un risque infectieux.

Les visites réalisées durant la période d'abattage préventif ont permis de constater la réelle implication des abattoirs réquisitionnés dans la maîtrise du risque de diffusion de l'IA: des mesures spécifiques avaient été mises en place sur tous les sites comme exigé réglementairement, au-delà d'une simple adaptation des pratiques habituelles. Les résultats après décontamination dans un des abattoirs de l'étude montrent qu'il est possible de réduire fortement une éventuelle contamination initiale. Cependant, les protocoles de nettoyage et désinfection se sont avérés insuffisants dans deux des abattoirs fortement contaminés. Les camions repartis étaient positifs au niveau de leur chargement de caisses et de l'intérieur et/ou de l'extérieur du véhicule. La variabilité de ces résultats peut s'expliquer par des différences de contamination

initiale, de protocoles de décontamination et de maîtrise de leur application. La réussite de la décontamination semble en partie liée aux moyens mis en œuvre, avec notamment l'utilisation de laveuses, mais aussi à l'espace dédié à cette activité qui dans l'idéal devrait être suffisamment vaste pour installer le matériel de nettoyage et éviter des croisements entre zone propre et zone sale (caisse, personnel). La positivité des cabines de camion après nettoyage et désinfection est très certainement due à l'absence de protection (bottes, gants spécifiques) des chauffeurs lors du déchargement et d'un protocole strict de nettoyage de l'intérieur des véhicules. Le contrôle de la contamination résiduelle par chiffonnage-écouvillonnage couplé à la rRT-PCR gène M est une méthode de surveillance de l'efficacité du nettoyage et désinfection adaptée à la gestion du risque d'IA en abattoir, qui peut être facilement utilisée dans le cadre d'un plan de maîtrise par les professionnels. Il doit être couplé au contrôle visuel de la propreté des caisses et des camions au moyen d'une grille standardisée (non réalisée dans cette étude faute de moyens humains). Le lien entre les résultats de contrôle par recherche de génome viral d'IA et par dénombrement de microorganismes indicateurs de la qualité de la décontamination (pratiqué dans certains abattoirs) devra à terme être aussi exploré, afin de disposer d'un moyen complémentaire de mesure de l'efficacité de la désinfection des caisses et des camions de transport des volailles.

## Remerciements

Les auteurs remercient le Dr Mattias Delpont de l'École vétérinaire de Toulouse pour son aide lors de la réalisation des visites, les abattoirs ayant accepté les visites ainsi que les DDecPP des départements concernés.

## Références bibliographiques

- Arrêté du 4 janvier 2017 relatif aux mesures complémentaires techniques et financières pour la maîtrise de l'épizootie d'*influenza* aviaire due au virus H5N8 dans certains départements <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2017/1/4/AGRG1700293A/JO/texte>.
- Arrêté du 31 mars 2017 déterminant des dispositions de prévention, de surveillance et lutte complémentaires contre l'*influenza* aviaire hautement pathogène dans certaines parties du territoire <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2017/3/31/AGRG1710381A/JO/texte>.
- DGAL/SDSPA/2017-1032 du 04/01/2017 : Précisions sur les mesures d'abattage préventif de palmipèdes dans certains départements définies par l'arrêté du 4 janvier 2017 suite à la circulation de virus *influenza* aviaire H5N8
- 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. Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A *Influenza* Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. *Clin. Microbiol.* 40, 3256–3260.

# Évolution de la détection de virus influenza aviaire dans des élevages de volailles infectées par un virus influenza aviaire hautement pathogène de sous-type H5N8

Axelle Scoizec (1), Rozenn Souillard (1), Patrick Daniel (2), Rodolphe Thomas (1), Sophie Le Bouquin (1)

Auteur correspondant: axelle.scoizec@anses.fr

(1) Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Épidémiologie et bien-être en aviculture et cuniculture, Ploufragan, France

(2) Laboratoire des Pyrénées et des Landes, Mont de Marsan, France

## Résumé

Les questions de la dissémination des virus et de leur persistance dans l'environnement ont été au cœur des préoccupations sanitaires au cours des dernières épizooties d'influenza aviaire en France. Au cours de l'épizootie de l'hiver 2016-2017, nous avons exploré la contamination de l'environnement des lots infectés (bâtiments et parcours) au travers du suivi de huit lots de canards infectés par un virus IAHP H5N8. Cette étude a montré un niveau important de contamination de l'environnement dans des foyers d'IAHP H5N8 au moment de l'excrétion virale par des canards infectés, à la fois dans les bâtiments et sur les parcours. Elle a également montré que malgré la baisse très nette de la fréquence de détection du génome viral suite à la mise en œuvre de mesures de nettoyage et de désinfection, et suite à des conditions climatiques défavorables au virus, la présence de génome viral pouvait perdurer jusqu'à trois à quatre semaines dans le bâtiment en cas de non nettoyage ou en cas de conditions climatiques favorables aux virus, et jusqu'à dix semaines sur les parcours sur des zones humides.

## Mots-clés

Influenza aviaire, IAHP, volailles, canard, environnement, H5N8

## Abstract

**Evolution of the detection of avian influenza virus in poultry farms infected with a highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N8**

Environmental virus dissemination and persistence were key issues for management and health considerations during the last two avian influenza epizooties in France. During winter 2016-2017 epizootic, we explored the contamination of infected flocks' environment (houses and open-air runs) by eight HPAI H5N8 infected duck flocks follow-up. This study highlighted in HPAI H5N8 infected farms, the important contamination of the flocks' environment at the moment of viral excretion by the infected ducks, in the houses as well as on the open-air runs. It showed also that despite the clear decrease of viral genome detection frequency after implementation of cleaning and disinfection measures, and after adverse climatic conditions for virus viability, the viral genome could still be present after depopulation up to three to four weeks in flock's premises in case of non-implementation of cleaning measures or in case of favorable climatic conditions for virus viability, and up to ten weeks on open-air ranges, in humid zones.

## Keywords

Avian influenza, HPAI, Poultry, Duck, Environment, H5N8

L'assainissement des foyers d'influenza aviaire (IA), en particulier hautement pathogène (HP) est un point crucial dans la maîtrise d'une épizootie. Les caractéristiques de chaque virus influenza peuvent influencer le niveau de contamination initial de l'environnement des élevages (quantité excrétée, capacité de survie du virus, etc.). Dans le contexte de l'épizootie d'IAHP H5N8 apparenté à la lignée A/Gs/Gd/1/96 clade 2.3.4.4, cette étude avait pour objectif de décrire la contamination initiale de l'environnement dans les foyers (bâtiment et parcours) et suivre l'évolution des indicateurs d'une contamination initiale dans le temps. Cette étude a été conçue et réalisée dans le cadre d'investigations épidémiologiques menées en urgence lors de l'épizootie de l'hiver 2016-2017.

## Matériels et Méthodes

### Sélection des lots de volailles

L'étude a été réalisée de janvier à mars 2017. Le recrutement des foyers a été mené en collaboration avec les services des DDecPP des départements concernés et les prélèvements réalisés avec l'accord des éleveurs. Huit lots de canards, au sein de six élevages foyers (qui comportaient au total quinze lots, à raison de un à cinq lots par foyer),

situés dans les départements des Landes et du Gers ont été inclus dans l'étude. Au moment de la visite initiale, les animaux étaient présents et confinés dans le bâtiment d'élevage. Les lots présentaient tous des signes cliniques et de la mortalité. Les élevages avaient été officiellement confirmés infectés par un virus IAHP H5N8 et aucune mesure de nettoyage/désinfection n'avait encore été mise en œuvre depuis la détection de l'infection au moment de la première visite. Les caractéristiques des lots sont résumées dans le [tableau 1](#). Suite à la visite initiale, deux autres visites ont été réalisées, respectivement entre trois et quatre semaines, puis à dix semaines après dépopulation des lots. Lors de la visite initiale, les commémoratifs sur l'expression clinique et la mortalité par lot étaient collectés. Lors des visites suivantes, les commémoratifs depuis la visite précédente concernant les mesures de nettoyage/désinfection mises en œuvre ainsi que les conditions climatiques étaient relevés.

### Protocole et méthodes d'échantillonnage sur les animaux

Lorsque cela était possible, 30 animaux par lot étaient prélevés par prise de sang sur tube sec et par écouvillonnage trachéal et cloacal (écouvillons secs Copan, Italie). Lors de la visite initiale, la dépopulation du site était généralement en cours; pour ne pas perturber (retarder) ces opérations, il a été impossible faute de temps d'effectuer les

**Tableau 1. Caractéristiques des lots de volailles étudiés au moment de la visite initiale (réalisée entre le 3 et le 5 janvier 2017)**

Élevage	Départ.	Lot	Espèce/prod.	Bâtiment	Effectif initial du lot	Age des volailles <sup>A</sup> (j)	Délai (j) début de mortalité – visite initiale	Taux cumulé de mortalité <sup>A</sup> en %	Lot ayant été sorti sur parcours	Durée (j) du vide sur parcours <sup>A,E</sup>
A	40	A1	Canard/PAG <sup>B</sup>	Classique	1 350	27	1	0,4	Non	SO <sup>C</sup>
B	40	B1	Canard/PAG	Classique	4 080	48	8	20	Oui	7
C	32	C1	Canard/repro <sup>F</sup> . femelles	Classique	3 860	595	11	9	Non	SO
		C2	Canard/repro. femelles	Classique	2 650	545	11	13	Non	SO
D	40	D1	Canard/PAG	Tunnel <sup>G</sup>	4 000	52	1	7	Oui	7
E	40	E1	Canard/PAG	Tunnel	6 000	28	2	NR	Oui	1
		E2	Canard/PAG	Tunnel	6 000	84	10	NR	Oui	6
F	32	F1	Canard/PAG	Classique	6 300	92	6	30	Oui	7

<sup>A</sup> Au moment de la visite initiale<sup>B</sup> PAG: prêts à gaver<sup>C</sup> SO: sans objet<sup>D</sup> NR: non renseigné<sup>E</sup> Durée depuis que les animaux sont confinés et ne sont donc plus présents sur le parcours<sup>F</sup> Repro: reproducteurs<sup>G</sup> Tunnel ouvert sur les deux faces**Tableau 2. Points d'échantillonnage sur l'environnement des lots infectés**

Lieu	Point de prélèvement	Type de prélèvement	Description du prélèvement
Intérieur du bâtiment	Sol du sas	Une paire de pédichiffonnettes	Passage sur l'ensemble du sol du SAS
	Semelles des bottes dédiées au bâtiment	Une chiffonnette	Passage sur les semelles de toutes les bottes dédiées au bâtiment
	Surfaces touchées fréquemment par les personnes dans le sas: poignées de porte, interrupteurs, etc.	Une chiffonnette	Passage sur tous les points touchés fréquemment par les personnes
	Sol du bâtiment (à l'exception de la litière)	Une paire de pédichiffonnettes	Passage sur l'ensemble du sol du bâtiment (déambulation)
	Murs du bâtiment	Une chiffonnette	Passage sur les murs du bâtiment (entre 50 et 150 cm de hauteur par rapport au sol)
	Mécanisme de circulation d'air et points de sortie d'air	Une chiffonnette	Passage sur ventilateurs pour la circulation et pour l'extraction de l'air et sur les sorties d'air.
	Mangeoires (collecte des poussières)	Une chiffonnette	Passage sur 3 mangeoires réparties dans le bâtiment
	Abreuvoirs (collecte des poussières)	Une chiffonnette	Passage sur 3 abreuvoirs répartis sur l'ensemble du bâtiment
Parcours	Litière dans le bâtiment	5 écouvillons	Écouvillonnage en surface (zone de 3 cm de profondeur) sur les zones les plus humides
	Zones de sorties des animaux du bâtiment (à 1 m de distance maximale du bâtiment)	Une paire de pédichiffonnettes	Passage sur l'ensemble des zones ou sur 50 % des points de sortie (déambulation)
	Abreuvoirs situés sur le parcours	Une chiffonnette	Passage sur 3 abreuvoirs répartis sur le ou les parcours
	Mangeoires situées sur le parcours	Une chiffonnette	Passage sur 3 mangeoires réparties sur le ou les parcours
	Zones humides sur le parcours	Une paire de pédichiffonnettes	Passage sur l'ensemble de la zone
Autre	Zones avec présence de nombreuses déjections de volailles	5 écouvillons	Écouvillonnage des fientes les moins sèches possibles
	Fumière	100 cm <sup>3</sup> de fumier	Prélèvement en surface

prélèvements sur les animaux dans deux lots (B1 et E1) et ces prélèvements n'ont été possibles que sur vingt animaux dans deux autres lots (D1 et E2).

Les échantillons étaient transportés dans les 12 heures après prélèvement au laboratoire agréé le plus proche où, dans l'attente de leur analyse, ils étaient stockés entre 0 et +4°C pour les échantillons de sang et élués puis stockés à ≤ -65°C pour les écouvillons.

### Protocole et méthodes d'échantillonnage sur l'environnement

Des prélèvements environnementaux dans le bâtiment d'élevage et le cas échéant sur le parcours ayant été fréquenté, étaient réalisés par écouvillonnage (écouvillons secs Copan, Italie) ou à l'aide de chiffonnettes ou pédichiffonnettes stériles et sèches (Sodibox, France). Le détail du protocole standardisé d'échantillonnage est présenté dans le [tableau 2](#). Ces prélèvements ont été réalisés à chacune des trois visites.

Les échantillons étaient transportés dans les 12 heures après leur réalisation au laboratoire agréé le plus proche où, dans l'attente de leur analyse, ils étaient élués puis stockés à ≤ -65°C.

### Détection de la séroconversion des lots de volailles

La détection des anticorps dans les sérums de canards a été réalisée par la méthode officielle d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) en utilisant les antigènes de sous-type H5N3 et H5N8, ce dernier étant considéré comme représentatif des souches IA H5HP clade 2.3.4.4 qui ont circulé au cours de l'hiver 2016-2017 en Europe.

### Détection de l'ARN génomique de virus IA

Les échantillons ont été testés individuellement par RT-PCR temps réel (rRT-PCR) gène M-AIV selon la méthode officielle (Spackman et al., 2002). Les échantillons pour lesquels le gène M AIV a été détecté ont été testés par la suite en rRT-PCR gène H5. Nous nous référons dans la suite du texte aux échantillons avec détection de génome viral par rRT-PCR en tant qu'échantillons positifs en gène M ou en gène H5.

## Résultats

### Statut virologique et sérologique des lots de volailles étudiés

Les résultats des analyses réalisées sur les animaux montrent une séroconversion massive sur cinq des six lots dont le statut sérologique a été étudié. Pour ces cinq lots, la proportion d'animaux séropositifs vis-à-vis d'un antigène H5N8 (représentatif des souches IA H5HP clade 2.3.4.4 circulant en Europe en 2016-2017) variait de 90 à 100 % (Tableau 3). La séroconversion du lot peut être précoce par rapport à l'apparition de la mortalité dans celui-ci: un lot avec 100 % des animaux prélevés ayant séroconverti présentait de la mortalité depuis seulement une journée (lot D1).

Au sein des six lots dont le statut virologique a été étudié, la proportion par lot d'animaux positifs en rRT-PCR gène M variait de 35 à 100 % et celle en gène H5 de 30 à 100 % (Tableau 3). La proportion de prélèvements positifs par rRT-PCR gène M était de 38 % (61/160) et de 43 % (69/160) respectivement pour les écouvillons trachéaux et cloacaux. En rRT-PCR gène H5, elle était de 32 % (52/160) et de 40 % (64/160) respectivement pour les écouvillons trachéaux et cloacaux. Chacun des six lots présentait à la fois des résultats positifs en rRT-PCR gène M et gène H5 sur des écouvillons trachéaux et cloacaux. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les proportions d'écouvillons trachéaux et cloacaux positifs dans les six lots par rRT-PCR gène H5 et dans cinq lots sur six en rRT-PCR gène M. Les valeurs de Ct (cycle threshold) en gène M variaient entre 24,9 et 39,2, et entre 25,7 et 39,4 respectivement pour les écouvillons trachéaux et cloacaux. Quant aux valeurs de Ct en gène H5, elles variaient entre 21 et 39,3 et entre 22,7 et 38,2 respectivement pour les écouvillons trachéaux et cloacaux (Figure 1). La distribution des valeurs de Ct ne présentait pas de différence significative entre les écouvillons trachéaux et cloacaux, par rRT-PCR gène M. En RRT-PCR gène H5, la distribution des Ct est très large aussi bien pour les écouvillons trachéaux que cloacaux (Figure 1) mais la médiane des Ct est significativement plus faible dans les écouvillons trachéaux (test W de Wilcoxon,  $p < 0,05$ ). Si la valeur du Ct par rRT-PCR ne permet pas d'évaluer la quantité d'ARN viral présente dans un échantillon, elle est tout de même corrélée à cette quantité: les échantillons avec les valeurs de Ct les plus faibles contenant très probablement des quantités d'ARN viral supérieures à celles des échantillons avec les valeurs de Ct les plus élevées. Les distributions de valeurs de Ct plutôt similaires entre les deux types d'écouvillons, ainsi que les proportions d'animaux excréteurs de même grandeur par voie trachéale et par voie cloacale suggèrent fortement que les quantités excrétées sont très probablement équivalentes par ces deux voies.

Ces six lots présentaient une mortalité depuis un à onze jours (Tableau 1). Dans les deux lots qui présentaient de la mortalité depuis une journée (lots A1 et D1), la proportion de canards avec une détection d'excrétion de virus influenza H5 était respectivement de

30 % (IC95 % [11-54]) et de 100 % (IC95 % [88-100]). Entre dix et onze jours après le début de l'épisode de mortalité lié à l'infection d'IAHP, la proportion d'animaux excréteurs dans les lots C1, C2 et E2 était respectivement de 57, 37 et 50 %. Pour les deux lots (B1 et E1) pour lesquels il n'y a pas eu de prélèvements sur les animaux au cours de cette étude, des signes cliniques ainsi que de la mortalité étaient toujours observés au jour de la visite initiale.

### Détection d'ARN génomique viral d'influenza aviaire dans l'environnement

#### Visite initiale

Lors de la visite initiale, le génome viral d'IA a été détecté par rRT-PCR gène M et gène H5 dans les bâtiments des huit lots étudiés (Tableau 4). Il a également été détecté sur respectivement cinq et quatre parcours par rRT-PCR gène M et gène H5 dans les six lots étudiés pour lesquels des prélèvements sur parcours ont été effectués. Dans les bâtiments, la proportion de prélèvements positifs par lot variait respectivement de 46 à 100 % et de 28 à 100 % par rRT-PCR gène M et gène H5. Dans quatre bâtiments classiques sur les cinq étudiés, la proportion de prélèvements positifs (en gène M) était supérieure à 75 % (46 % pour

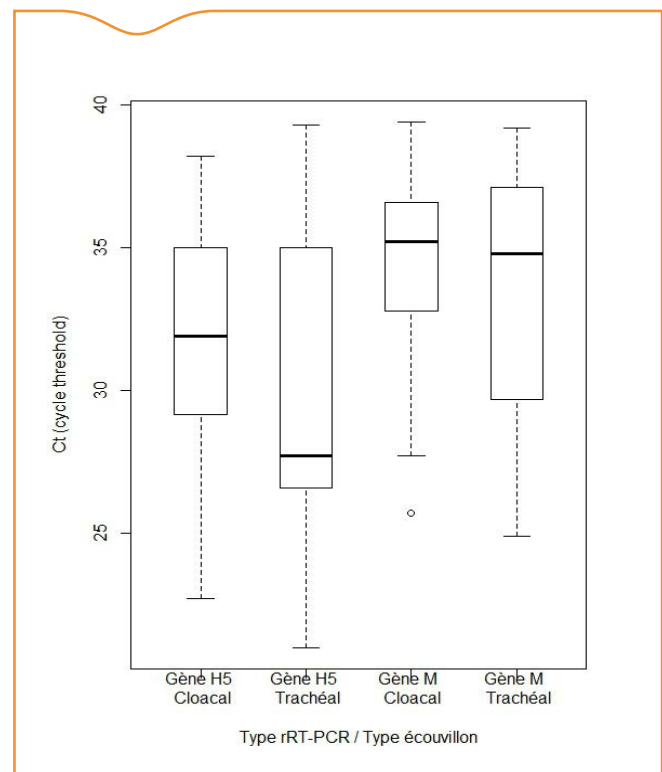


Figure 1. Distribution des Ct (cycle threshold) par type de rRT-PCR et type d'écouvillon des prélèvements positifs d'animaux de six lots infectés par un virus IAHP H5N8

Tableau 3. Résultats des analyses sérologiques et virologiques des volailles des lots étudiés

Élevage	Lot	Nb collectés	Sérologie IHA <sup>A</sup>		Virologie rRT-PCR	
			positifs <sup>A</sup> /analysables		Gène M positifs <sup>B</sup> /analysés	Gène H5 positifs/analysés
A	A1	30		0/30	30/30	30/30
B	B1		Prélèvements non réalisés			
C	C1	30		25/25	20/30	17/30
	C2	30		28/28	12/30	11/30
D	D1	20		16/16	7/20	6/20
E	E1		Prélèvements non réalisés			
	E2	20		16/16	13/20	10/20
F	F1	30		26/29	13/30	11/30

<sup>A</sup> Vis-à-vis de l'antigène H5N8 (tous les échantillons présentaient un résultat négatif vis-à-vis de l'antigène H5N3)

<sup>B</sup> Sont considérés comme positifs par rRT-PCR les oiseaux pour lesquels de l'ARN viral a été détecté sur écouvillon trachéal et/ou cloacal

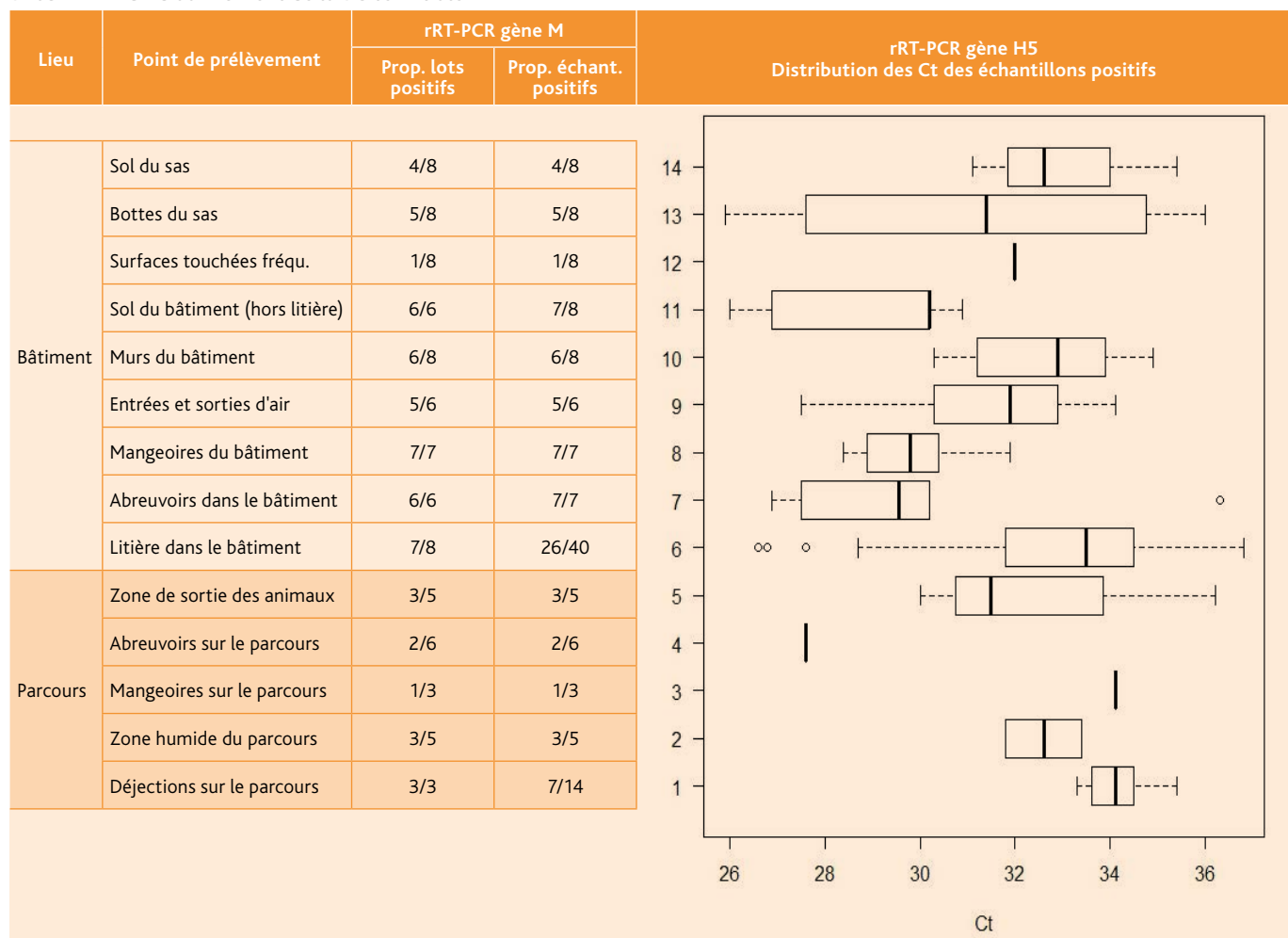
**Tableau 4.** Détection de génome viral d'influenza dans le bâtiment et sur le parcours de lots de canards infectés par un virus IAHP H5N8, avant destruction du lot infecté (visite 1), trois à quatre semaines (visite 2) et dix semaines (visite 3) après destruction du lot

Élevage	Lot	Nb de prélèvements positifs <sup>A</sup> par rRT-PCR gène M (par gène H5)/ Nb réalisés					
		Visite 1		Visite 2		Visite 3	
		Bâtiment	Parcours	Bâtiment	Parcours	Bâtiment	Parcours
A	A1	10(9)/13	1(0)/2	0(0)/8	NR <sup>C</sup>	0(0)/7	NR
B	B1	11(11)/11	4(3)/8	3(1)/5	0(0)/5	0(0)/5	1(0)/5
C	C1	11(11)/13	SO <sup>B</sup>	0(0)/11	0(0)/1	0(0)/9	SO
	C2	10(10)/13	SO	NR	SO	0(0)/7	SO
D	D1	6(6)/11	2(2)/4	0(0)/5	0(0)/4	0(0)/5	0(0)/4
E	E1	7(6)/12	5(4)/9	0(0)/6	0(0)/3	0(0)/6	0(0)/2
	E2	7(4)/14	4(4)/8	0(0)/6	0(0)/5	0(0)/5	0(0)/4
F	F1	6(6)/13	0(0)/2	1(0)/6	1(0)/3	0(0)/7	0(0)/3
<b>Total</b>		<b>68(63)/100</b>	<b>16(13)/33</b>	<b>4(1)/47</b>	<b>1(0)/21</b>	<b>0(0)/51</b>	<b>1(0)/18</b>

<sup>A</sup> Le prélèvement est considéré comme positif si un signal génomique est détecté par rRT-PCR

<sup>B</sup> SO: sans objet

<sup>C</sup> NR: non réalisé

**Tableau 5.** Détection de génome viral influenza aviaire par point de prélèvement dans les huit lots étudiés de canards infectés par un virus IAHP H5N8 au moment de la visite initiale

le cinquième). Dans les trois bâtiments « tunnel », cette proportion était comprise entre 50 et 58 %. La proportion de prélèvements positifs était élevée (supérieure à 75 %) à la fois sur un lot en début d'épisode de mortalité (A1) et sur des lots dont la durée de l'épisode de mortalité datait d'au moins huit jours (B1, C1, C2). Les niveaux de Ct en rRT-PCR gène H5 variaient entre 25,9 et 36,8 pour les échantillons prélevés dans les bâtiments et entre 27,6 et 36,2 pour ceux collectés sur le parcours (Tableau 5).

Dans les bâtiments, tous les types de support prélevés ont présenté au moins un résultat positif par rRT-PCR pour un des lots. Les types de support, qui présentaient à la fois une proportion de détection

élevée (supérieure à ou égale à 75 % des lots) ainsi que des valeurs de Ct comparativement plus faibles en rRT-PCR, étaient par ordre décroissant: les mangeoires et abreuvoirs, le sol et la litière, les murs ainsi que les entrées et sorties d'air (Tableau 5). Du génome viral a été détecté dans le sas du bâtiment pour plus de la moitié des lots étudiés.

Parmi les cinq lots dont les animaux sont sortis sur parcours avant leur claustration, quatre présentaient au moins deux résultats positifs à la recherche de génome viral H5 sur le parcours (Tableau 4). Les points de prélèvements sur parcours qui présentaient une fréquence de détection plus élevée en proportion de lots ou de prélèvements positifs étaient les déjections sur parcours, la zone de sortie des

**Tableau 6.** Mesures de nettoyage/désinfection mises en œuvre entre les visites, conditions climatiques dans les 7 jours précédents (J-7/J0) et au moment de la réalisation des prélèvements (J0)

Élevage	Lot	Visite1		Mesures <sup>A</sup>		Visite2		Mesures		Visite3	
		Conditions climatiques		(période visite1-visite2)		Conditions climatiques		(période visite2-visite3)		Conditions climatiques	
		J-7/J0	J0	Bâtiment	Parcours	J-7/J0	J0	Bâtiment	Parcours	J-7/J0	J0
A	A1	Humide-froid	Brouillard-froid	N/D1	N/D1	Ensoleillé-froid	Sec-chaud	D2	-	Sec-chaud	Ensoleillé-froid
B	B1	Humide-froid	Brouillard-froid	N	-	Humide-froid	Ensoleillé-froid	D1/D2	N/D1	Sec-chaud	Ensoleillé-froid
C	C1	Humide-froid	Sec-froid	N	SO <sup>B</sup>	Ensoleillé-froid	Orage	D1/D2	SO	Sec-chaud	Ensoleillé-froid
	C2	Humide-froid		N	SO			D1/D2	SO		
D	D1	Humide-froid	Sec-froid	N/Dsol1	N/D1	Ensoleillé-froid	Sec-chaud	D1/D2	-	Sec-chaud	Ensoleillé-froid
E	E1	Humide-froid	Brouillard-froid	-	D1	Ensoleillé-froid	Sec-chaud	-	-	Sec-chaud	Ensoleillé-froid
	E2			n/D1	D1/R			-	-		
F	F1	Humide-froid	Couvert-froid	N/D1/D2	N/D1/R	Humide-froid	Ensoleillé-froid	-	S	Sec-chaud	Ensoleillé-froid

<sup>A</sup> N=nettoyage avec détergent, n=nettoyage sans détergent, D1=première désinfection, D2=seconde désinfection, Dsol1=première désinfection réalisée seulement sur le sol du bâtiment, R=retournement du sol sur le parcours, S=semis après retournement.

<sup>B</sup> SO: sans objet

bâtiments des animaux ainsi que les zones humides du parcours (Tableau 5). La proportion de prélèvements positifs (gène M et gène H5) était équivalente (Tableau 4) entre le lot E1 dont le début de la mortalité datait de deux jours et la claustration (vide du parcours) d'un jour, le lot D1 dont le début de la mortalité datait d'un jour et la claustration de sept jours, et les lots B1 et E2 dont la mortalité datait de huit à dix jours et la claustration de sept jours. Concernant, le lot F1 pour lequel le génome viral n'a pas été détecté sur parcours, la mortalité datait de six jours et la claustration de sept jours. Pour le lot D1, dont les animaux confinés depuis une semaine en tunnel ouvert en façade présentaient de la mortalité depuis un jour au moment de la réalisation des prélèvements, le génome viral a été détecté (gène M et gène H5) en zone de sortie du bâtiment et sur les zones humides du parcours. Concernant le lot A1, des prélèvements ont été réalisés sur le parcours qui n'avait jamais été utilisé par les animaux (confinés depuis leur arrivée car au stade de démarrage): sur abreuvoirs et sur la zone bétonnée de sortie de bâtiment. Du génome viral d'IA a été détecté par rRT-PCR gène M sur les abreuvoirs situés à 30 m du bâtiment.

### Deuxième visite

Lors de la seconde visite (trois à quatre semaines après la destruction du lot infecté), aucun génome viral n'a été détecté dans cinq des sept lots suivis à ce stade (Tableau 4). Les mesures appliquées avant cette seconde visite étaient variables d'un lot à l'autre. Pour les lots sans détection de génome viral, pour le bâtiment, la gamme des mesures appliquées allait d'aucune mesure jusqu'au nettoyage humide avec ou sans détergent et avec ou sans première désinfection et, sur les parcours, d'une désinfection par épandage de chaux avec ou sans nettoyage des abords du bâtiment et avec ou sans retournement du sol (Tableau 6). Pour le lot B1, un nettoyage humide avec détergent était en cours dans le bâtiment au moment de la seconde visite: l'ARN de virus IA a été détecté (gène M) dans les prélèvements réalisés sur les surfaces non nettoyées au moment du prélèvement (sol du sas également positif par rRT-PCR gène H5, surfaces touchées fréquemment dans le sas et murs du bâtiment). Pour le lot F1, un nettoyage humide avec détergent suivi de deux désinfections avaient été réalisés dans le bâtiment par l'éleveur, les abords du bâtiment avaient été nettoyés et désinfectés et le parcours retourné sur 10 cm de profondeur. De l'ARN de virus IA a été détecté par rRT-PCR sur les murs à l'intérieur et sur les abords extérieurs du bâtiment. Ces deux lots dans lesquels une détection d'ARN viral a été possible lors de la seconde visite n'avaient pas depuis la destruction du lot infecté été soumis à des températures extérieures supérieures à 13°C et le nombre de jours avec des températures maximales pouvant dépasser les 10°C

avaient été de six sur vingt, le temps avait été globalement humide (13 jours sur 20 avec pluie ou brouillard givrant, contre pour les cinq autres lots des températures maximales de 18°C, un nombre de jours avec des températures maximales dépassant les 10°C de 12 à 13 sur une durée de 26 à 29 jours, et une exposition à un temps sec de deux à trois jours consécutifs de temps avant la deuxième visite.

### Troisième visite

Lors de la troisième visite (dix semaines après la destruction du lot infecté), aucune détection d'ARN viral n'a été mise en évidence dans les prélèvements réalisés dans sept des huit lots étudiés (Tableau 4). Le seul prélèvement avec une détection d'ARN de virus IA par rRT-PCR gène M concernait le lot B1 et concernait des zones humides du parcours. Les mesures qui avaient été appliquées sur le parcours au moment de cette troisième visite étaient le nettoyage des abords du bâtiment, et l'épandage de chaux sur les abords et l'ensemble du parcours à raison de 100 g/m<sup>2</sup>. Lors de la première visite, des cadavres de canards en décomposition avaient été signalés sur les zones du parcours à proximité des abreuvoirs, qui étaient des zones très boueuses avec des flaques d'eau et une absence de végétation. Au moment de la troisième visite, des zones humides et non encore enherbées persistaient sur le parcours. Les conditions climatiques au moment de la troisième visite et la semaine précédant celle-ci étaient équivalentes pour les huit lots (Tableau 6).

### Mesures d'assainissement des bâtiments et parcours

Les mesures de nettoyage/désinfection mises en œuvre dans les lots suivis lors de la durée de l'étude étaient variées (Tableau 6), des mesures complémentaires ont pu être réalisées après la fin de l'étude. Dans les bâtiments, un nettoyage humide avec détergent suivi de deux désinfections a été réalisé dans six lots sur huit, un nettoyage sans détergent suivi d'une seule désinfection pour un lot et aucune mesure pour le dernier lot. Le circuit d'eau a été désinfecté spécifiquement pour quatre lots. Le matériel mobile a été nettoyé et désinfecté sans (n=2) ou après démontage (n=4) pour six lots sur huit. Les abords du bâtiment ont été nettoyés par pulvérisation d'eau à haute pression pour quatre lots sur huit. Pour les huit lots, de la chaux vive a été épandue manuellement (n=3) ou mécaniquement (n=5) sur les abords du bâtiment à la dose de 50 à 3000 g/m<sup>2</sup> selon les lots (dose inférieure à 500 g/m<sup>2</sup> pour 5 lots). Pour les six lots avec parcours, de la chaux vive a été épandue mécaniquement sur l'ensemble du parcours sans distinction de zonage à une dose uniforme variant de 50 à 100 g/m<sup>2</sup> selon les lots. Après l'application de chaux vive, sur les abords ou sur le parcours, aucun arrosage n'a été réalisé dans les huit lots. Il avait



plu pour les huit lots entre l'application de la chaux et la réalisation de la troisième visite. Dans deux lots sur les six avec parcours, un retournement du sol a été réalisé sur le parcours, sur respectivement 10 et 40 cm de profondeur.

## Discussion

Au vu des résultats obtenus lorsque les prélèvements sur les animaux ont été possibles dans le contexte de l'intervention, l'échantillonnage de 20 ou 30 animaux par lot permettait à la fois la détection de l'excrétion virale au niveau lot, la détection d'une séroconversion et d'estimer la prévalence de l'excrétion ou de la séroconversion intra-lot avec une précision inférieure ou égale à +/-20 %. Le protocole d'échantillonnage sur l'environnement était standardisé et reproductible d'un lot à l'autre.

Cette étude a montré un niveau important de contamination de l'environnement dans des foyers d'IAHP H5N8 au moment de la phase d'excrétion virale par les canards infectés, à la fois dans les bâtiments et sur les parcours. La fréquence de détection de génome viral d'influenza aviaire et les valeurs de Ct des analyses positives par rRT-PCR indiquent en effet que du matériel viral s'était déposé et était présent en quantité détectable dans les bâtiments et sur la plupart des parcours. La présence de génome viral ne signifie pas que le virus est viable. Des essais d'isolement sur les échantillons stockés pourraient permettre par la suite d'éclaircir ce point.

Un des facteurs influençant la contamination du milieu est l'excrétion virale par les oiseaux infectés : celle-ci peut être décrite qualitativement (voie respiratoire et/ou digestive) et quantitativement (durée d'excrétion et quantités excrétées). Cette étude a montré que sur six lots infectés présentant des signes cliniques, l'excrétion se faisait aussi bien par voie respiratoire que par voie digestive, et que la durée d'excrétion pour un lot de canards infectés pouvait atteindre au moins onze jours. Les données obtenues à partir de cette étude permettent de constater que la proportion d'animaux excréteurs était importante (supérieure à 30 %) dans les lots avec expression clinique. Par contre, les données ne permettent pas d'évaluer directement les quantités excrétées individuellement par les animaux. Néanmoins, l'hypothèse d'une excrétion virale individuelle quantitativement importante en moyenne est soutenue par les valeurs de Ct observées et mériterait d'être investiguée par des études complémentaires permettant une approche quantitative.

Les environnements les plus contaminés (en termes de proportion d'échantillons positifs) ont été détectés dans les bâtiments classiques. Cela pourrait être dû à une meilleure survie du virus dans les conditions plus stables qu'offrent un bâtiment classique par rapport à un tunnel ouvert soumis directement aux conditions climatiques extérieures. Cela pourrait également être lié à une plus grande dispersion des matières contaminées (aérosols, poussières issues de fientes, plumes etc.) vers l'extérieur dans le cas des tunnels, diminuant ainsi la charge virale dans le bâtiment en comparaison de la situation en bâtiment classique. Toutefois d'autres facteurs pourraient intervenir tels que les quantités virales excrétées par les lots qui dépendent du nombre d'oiseaux excréteurs et de leur densité.

Les facteurs climatiques tels que la température et l'hygrométrie, ainsi que l'exposition aux rayons ultraviolets, influencent la survie du virus influenza et sa détection dans le milieu extérieur (Stallknecht et al. 2009). Ces facteurs semblent avoir joué un rôle très important dans le maintien ou non de la détection du virus dans l'environnement. En effet, la baisse très nette de détection de l'ARN viral dans l'environnement (bâtiment et parcours) des lots, trois à quatre semaines après leur destruction, peut très probablement être reliée à la fois aux mesures de nettoyage et désinfection mises en œuvre, et aux conditions climatiques, en plus de l'effet du temps écoulé. On constate ainsi qu'avec ou sans mesures de nettoyage et de désinfection, aucune détection d'ARN viral n'a été réalisée à ce stade lorsque l'environnement avait été soumis plusieurs jours consécutifs à des températures supérieures

à 15°C, par temps sec et ensoleillé. Par contre, dans un lot ayant appliqué les mesures complètes de nettoyage et de désinfection, mais n'ayant pas été soumis à des températures supérieures à 13°C, ni à un temps sec, de l'ARN viral IA était encore détecté. Le rôle des conditions climatiques est probablement plus important pour ce qui concerne l'assainissement des parcours en comparaison de celui des bâtiments. Néanmoins, un défaut dans la gestion des parcours en vue de leur assainissement contribue très probablement au maintien du virus malgré des conditions climatiques défavorables à celui-ci, ainsi que semble l'indiquer la détection de génome viral sur des zones encore humides d'un parcours dix semaines après la destruction du lot infecté. Les mesures pour l'assainissement des parcours préconisées prévoient le drainage de toutes les zones humides (avis de l'Anses 2016-SA-0196).

La probabilité de détection du virus lorsqu'il y a une baisse de la charge virale environnementale diminue et si l'absence de détection signale une forte baisse de la charge virale, elle ne peut pas garantir l'absence du virus. Ainsi du génome viral a été détecté lors de la troisième visite sur un parcours alors qu'à la deuxième visite cela n'avait pas été le cas. Une amélioration du protocole d'échantillonnage, comme par exemple une augmentation de la répétition des échantillons, devrait permettre de mieux détecter la présence résiduelle de virus.

Deux cas de détection de génome viral sur parcours soulèvent des questions. Le premier concerne la détection de génome viral d'IA sur des abreuvoirs situés sur le parcours d'un lot n'étant jamais sorti sur parcours et présentant des signes cliniques depuis une journée lors des prélèvements. Le second concerne la détection de génome viral sur un parcours d'un lot de canards claustrés depuis sept jours et présentant des signes cliniques depuis une journée lors des prélèvements. Les contaminations ainsi détectées pourraient être le résultat d'une diffusion aéroportée via l'air expulsé du bâtiment, d'un transport via des véhicules passifs tels que les insectes ou de la microfaune sauvage, ou d'une contamination à partir d'une autre source telle que l'avifaune commensale infectée. Dans le cadre du second cas, l'hypothèse d'une excrétion précoce du virus par rapport à l'apparition de signes cliniques à l'échelle du lot doit également être envisagée.

Dans les lots étudiés, les mesures d'assainissement mises en œuvre sur les parcours étaient très variables et parfois éloignées des recommandations de l'avis de l'Anses 2016-SA-0196 relatif aux « procédés efficaces de désinfection des parcours en exploitations de volailles ». Cet avis, malgré ses limites liées au manque d'études sur le sujet, constitue la seule base de recommandations pertinentes en la matière disponible actuellement en France. Dans cet avis, il est recommandé dans le cas d'un foyer d'IA confirmé, concernant l'utilisation de chaux vive, d'épandre celle-ci uniformément à raison de 500 g/m<sup>2</sup> sur les zones à forte densité d'oiseaux seulement, d'arroser le sol immédiatement après épandage si celui-ci n'est pas humide, de laisser agir trois à quatre heures puis de retourner le sol. Le reste du parcours doit être fauché, débroussaillé et retourné si possible. Un vide sanitaire de six semaines doit ensuite être respecté. Le guide pratique de l'utilisation de la chaux pour la prévention et le contrôle de l'IA et autres maladies réalisé par l'association européenne de la chaux (European Lime association, 2009) recommande également pour le traitement du sol l'application de chaux vive en granulés à raison de 500 g/m<sup>2</sup> suivi d'un arrosage. Pour rappel, l'arrosage de la chaux vive permet de provoquer son extinction, ce qui entraîne une montée en température de la chaux et permet aussi par le mouillage une meilleure action sur le Ph du sol superficiel (augmentation du Ph). Lors de cette étude, il s'est avéré que l'épandage de chaux quand il a été réalisé n'avait pas été cantonné aux zones du parcours de forte fréquentation et que les doses employées étaient très en dessous des préconisations dans la plupart des cas (pour cinq lots sur huit les doses utilisées étaient inférieures ou égales à 100 g/m<sup>2</sup> quelle que soit la zone d'application). Aucun arrosage après épandage n'a été réalisé et peu de retournements effectués. L'information et la formation des acteurs en charge de diffuser ces recommandations ou de les appliquer semble un point crucial afin que les interventions des éleveurs soient réalisées de la façon la plus

efficace possible d'après les connaissances actuelles. À noter toutefois que l'ensemble de ces foyers ont fait l'objet de contrôles renforcés par les DDecPP pour s'assurer de la bonne mise en œuvre des opérations de nettoyage/désinfection de l'ensemble des installations et parcours (des recontrôles étant parfois réalisés en cas de non-conformités), associés à un dépistage des animaux lors de leur première remise en place.

## Conclusion

Notre étude a montré un niveau important de contamination de l'environnement dans des foyers d'IAHP H5N8 au moment de l'excrétion virale par des canards infectés, à la fois dans les bâtiments et sur les parcours. Elle a également montré que malgré la baisse très nette de la fréquence de détection du génome viral suite à la mise en œuvre de mesures de nettoyage et de désinfection, et suite à des conditions climatiques défavorables au virus, la présence de génome viral pouvait perdurer jusqu'à trois à quatre semaines dans le bâtiment en cas de non nettoyage ou en cas de conditions climatiques favorables au virus, et jusqu'à dix semaines sur le parcours sur des zones humides.

## Remerciements

Aux éleveurs ayant accepté de participer à cette étude, aux DDecPP des Landes et du Gers pour leur appui, et aux techniciens du Laboratoire des Pyrénées et des Landes pour la réalisation des analyses et leur disponibilité.

## Références bibliographiques

European Lime association, 2009. Guide pratique d'utilisation de la chaux pour la prévention et le contrôle de la grippe aviaire et autres maladies, 3<sup>e</sup> édition, janvier 2009.

[http://www.eula.eu/sites/default/files/2009%2010%2026%20Influenza\\_fr\\_web\\_01.pdf](http://www.eula.eu/sites/default/files/2009%2010%2026%20Influenza_fr_web_01.pdf)

Stallknecht DE, Brown JD. Tenacity of avian *influenza* viruses. Rev Sci Tech. 2009; 28(1):59–67.

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. Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A *Influenza* Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. Clin. Microbiol. 40, 3256–3260.

# Évaluation de la survie des virus Influenza aviaires H5N8 dans les lisiers d'élevages de palmipèdes gras

Sophie Le Bouquin (1), Audrey Schmitz (2), Marion Pertusa (3), Axelle Scoizec (1), Nathalie Rousset (3), Nicolas Etteradossi (2)

Auteur correspondant: sophie.lebouquin-leneveu@anses.fr

(1) Anses, Laboratoire de Ploufragan Plouzané, Unité Épidémiologie et bien-être en aviculture et cuniculture, Ploufragan, France

(2) Anses, Laboratoire de Ploufragan Plouzané, Laboratoire national de référence pour l'influenza aviaire et la maladie de Newcastle, Ploufragan, France

(3) Itavi, UMT Sanivol, Ploufragan, France

## Résumé

La gestion des effluents d'élevage, et plus particulièrement celle des lisiers, constitue un facteur important à prendre en compte pour préciser les voies de dissémination des virus influenza aviaires dans l'environnement et prévenir leur diffusion. Lors de l'épizootie d'influenza aviaire hautement pathogène de l'hiver 2016-2017 en France dans laquelle les élevages de canards étaient majoritairement infectés, la survie des virus influenza aviaire H5N8 dans le lisier était donc un élément crucial à évaluer. Pour cela, a été réalisé le suivi du vieillissement de lisiers prélevés dans cinq foyers IAHP H5N8. Cette étude a montré que les fosses à lisier pouvaient constituer un lieu de persistance des virus influenza aviaire avec la mise en évidence d'une durée de survie jusqu'à trois semaines pour des virus H5N8 et d'au moins sept semaines pour un autre virus influenza aviaire de sous-type 4.

## Mots-clés

Influenza aviaire, IAHP, H5N8, volailles, canard, lisier

## Abstract

**Evaluation of H5N8 avian influenza viruses' survival in manure from fatty web-footed bird farms**  
Manure management, and especially liquid manures, is a key factor that need to be explored for determining the avian influenza viruses dissemination routes into the environment and for preventing epizootics spread. The avian influenza H5N8 viruses' survival into liquid manure under field conditions was a crucial element to evaluate during the HPAI H5N8 winter 2016-2017 epizootics in France, which mostly affected duck farms. For that purpose, a follow up of the maturation of liquid manures issued from five IAHP H5N8 duck farm outbreaks, was performed. This study showed that liquid manure pits could represent sites for avian influenza viruses' persistency, as the survival duration reached three weeks for HPAI H5N8 viruses and at least seven weeks for another avian influenza virus of sub-type 4.

## Keywords

Avian influenza, HPAI, H5N8, Poultry, Duck, Manure

La gestion des effluents d'élevage constitue, au même titre que les mouvements d'animaux, un facteur important à prendre en compte pour préciser les voies de dissémination des virus influenza aviaires dans l'environnement et prévenir la diffusion de l'épizootie actuelle. Dans une enquête menée en 2008 par l'Anses de Ploufragan (Duvauchelle et al., 2013), les lisiers avaient été identifiés comme facteurs de contamination des élevages de canards reproducteurs par les virus IA. L'analyse de la littérature montre qu'il existe une grande hétérogénéité du comportement des virus IA avec des durées de survie dans le milieu naturel pouvant aller de quelques heures à quelques dizaines voire centaines de jours, en fonction des conditions environnementales (Davidson et al., 2010; Elving et al., 2012; Horm et al., 2012; Lu et al., 2003; Nazir et al., 2011). Parmi les facteurs avancés par ces différents auteurs pour expliquer cette variabilité figurent, outre la souche virale elle-même, la température, le pH, la salinité, la nature des supports, la présence de matière organique, l'humidité relative, l'exposition aux rayons UV, etc. Ainsi, une combinaison de facteurs favorables associant une température basse, un pH neutre, l'absence d'exposition aux UV et une protection par un milieu riche en matières organiques favorise de manière importante la persistance des particules virales et le maintien de leur infectiosité (Anses - Saisine 2016-SA-0027, 2016). De telles conditions sont susceptibles de se retrouver dans une fosse à lisier en période hivernale. La grande majorité des travaux publiés ont été réalisés en conditions expérimentales en simulant les conditions de terrain. Par ailleurs, aucune donnée concernant la survie des virus dans les effluents d'élevages de canards n'a, à notre connaissance, été publiée à ce jour.

En l'absence de données disponibles, trois modalités de gestion des lisiers ont été autorisées réglementairement<sup>(1)</sup> conduisant à un assainissement plus ou moins rapide :

- le traitement en usine agréée de production de biogaz par méthanisation équipée d'une unité d'hygiénisation,
- le traitement par chaulage permettant d'atteindre un pH entre 10 à 12 pendant sept jours,
- l'assainissement naturel sur site par stockage minimum de 60 jours après abattage des animaux.

L'épandage sans assainissement préalable ou l'enfouissement immédiat sont strictement interdits. Plusieurs paramètres sont à prendre en compte par l'éleveur afin de déterminer le mode de traitement des lisiers le mieux adapté à sa situation :

- le traitement par méthanisation se prête bien aux fosses en géotextile qui ne peuvent supporter le chaulage et aux fosses trop pleines pour être brassées. Sa facilité de mise en œuvre va dépendre de la proximité entre les usines de traitement et les élevages,
- le traitement par chaulage va permettre un assainissement rapide par alcalinisation. Ce mode de gestion ne convient généralement pas aux fosses géo-membranes (constituées d'une bâche étanche spécifique) qui ne supportent pas un tel pH. Il est adapté aux fosses en béton avec un niveau de remplissage compatible avec un brassage sans risque de débordement. Toutefois, la validation du couple

(1) Note de service DGAL/SASPP/2017-142 du 16/02/2017 : Mesures applicables suite à une suspicion ou à la mise en évidence de foyer IAHP en France\_6° mise à jour.

temps/pH reste à confirmer expérimentalement. La manipulation de la chaux est délicate car elle produit une volatilisation d'ammoniac et peut produire des résidus difficiles à éliminer en fond de cuve ; de ce fait, elle doit être réalisée par une entreprise spécialisée. L'obtention d'un pH homogène est conditionnée à un brassage correct de la fosse et sa mise en œuvre pratique est contraignante car il est nécessaire de suivre l'évolution du pH,

- enfin, l'assainissement naturel par stockage est une solution envisageable quel que soit le type de fosse, dès lors qu'une sécurisation du site est réalisée pour éviter tout risque de contamination. Néanmoins ce stockage long n'est pas forcément compatible avec les capacités actuelles des fosses. De plus, constituant un lieu résiduel de maintien de virus sur l'exploitation, il est incompatible avec un assainissement complet et rapide du site d'élevage.

Dès lors, la gestion de l'épizootie actuelle impose de disposer de connaissances plus précises sur la résistance des virus circulant et de vérifier l'efficacité des mesures de gestion retenues pour assainir les lisiers dans les élevages de canards reproducteurs et de canards gras. Début 2016, une étude a été mise en place par l'Anses de Ploufragan et l'Itavi<sup>(2)</sup>, afin d'estimer la persistance des virus IAHP dans les lisiers de canards à partir de lisiers contaminés expérimentalement et de lisiers contaminés naturellement, issus d'élevages infectés. À cette occasion, un état des lieux des équipements et des pratiques concernant la gestion du lisier en élevage de canards gras a été réalisé et des investigations complémentaires conduites dans quelques foyers ont permis de préciser si des mesures de gestion spécifiques avaient été mise en place.

Les résultats obtenus sur deux lisiers d'élevages de canards reproducteurs barbarie et pékin contaminés expérimentalement par un virus H5N9HP infectieux isolé en France au cours de l'épisode de l'hiver 2015-2016, suggèrent une durée de survie du virus infectieux inférieure à cinq semaines en l'absence de tout traitement. Cette période est réduite à moins de deux semaines dans les lisiers traités à pH 10 et 12 (Schmitz et al., 2017). Ces résultats sont cohérents avec la durée de stockage de 60 jours préconisée par la réglementation en cas d'assainissement naturel mais restent à conforter pour les fosses traitées par chaulage pour lesquelles la réglementation se base sur une durée de stockage de sept jours.

Afin de confronter ces résultats expérimentaux aux conditions de terrain, des prélèvements ont été réalisés dans cinq foyers de canards en gavage contaminés par des virus H5N8HP au cours de l'hiver 2016-2017.

## Matériels et méthodes

Une sélection de cinq élevages infectés (confirmation de présence de virus H5HP par le diagnostic officiel RT-PCR et séquençage du site de clivage) a été effectuée en concertation avec les DDecPP, sur la base du volontariat des éleveurs. Après une première prise de contact avec l'éleveur, une visite a été réalisée sur chaque site afin de compléter un questionnaire succinct sur les équipements de stockage de lisier et les pratiques de gestion associées (nombre de places en gavage, produits utilisés pour le nettoyage des salles, devenir du lisier, capacité et type de fosse). Dans chacun de ces élevages, deux litres de lisier ont été prélevés à l'aide d'une perche télescopique (idéalement 1 L en surface de la fosse et 1 L en profondeur prélevés à l'aide d'un récipient lesté équipé d'un clapet anti-retour). Ces prélèvements ont par la suite été mélangés pour chaque élevage puis transmis sous couvert du froid (+4°C) au laboratoire national de référence (LNR), dans un délai le plus court possible. Le passage par une étape intermédiaire de surgélation semblant interférer avec la survie du virus a été évité. Les lisiers prélevés ont ensuite été stockés à +4°C, température positive

(2) Étude réalisée dans le cadre de l'UMT Sanivol.

la plus favorable à la survie du virus. Chaque semaine, un prélèvement de chaque lisier a été réalisé, afin d'évaluer la persistance de virus infectieux. Pour cela, des analyses par ovoculture accompagnées de recherche génomique par RT-PCR temps réel gène M ont été réalisées. Après centrifugation des prélèvements reçus, les surnageants récoltés ont été pré-incubés avec un mélange d'antibiotiques puis ont été inoculés à des œufs embryonnés de neuf jours provenant de poules EOPS (exemptes d'organismes pathogènes spécifiques). Après cinq à six jours d'incubation, les liquides allantoïdiens ont été récoltés et leur activité hémagglutinante testée. Un second passage sur œufs a été réalisé en cas de résultats négatifs. La recherche de génome de virus d'IA a été réalisée sur les ARN extraits de 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).

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.

Toutes les manipulations de virus vivants ont été réalisées dans un laboratoire de niveau BSL3.

## Résultats et discussion

Les visites ont été réalisées entre le 5 janvier et le 8 février 2017, dans cinq élevages de canards en gavage du Sud-Ouest de la France (deux dans les Landes, deux dans le Gers et un dans les Pyrénées Atlantique). Les principales caractéristiques de ces élevages sont présentées dans le [tableau 1](#). En moyenne, la visite a eu lieu douze jours après le départ des animaux, à l'exception de l'élevage 2, dans lequel les animaux étaient encore présents le jour des prélèvements de lisier. Tous les élevages sont équipés de fosses géotextiles, sauf un, équipé d'une fosse bétonnée. Pour quatre élevages, le nettoyage et la désinfection étaient en cours au jour de la visite. Les fosses ont donc reçu les eaux de lavage de la salle de gavage dans lesquelles des produits détergents et/ou désinfectants ont pu être déversés. Seule la fosse de l'élevage 2 dans lequel les animaux étaient encore présents, n'avait rien reçu. Le stockage sur place était la méthode d'assainissement pratiquée sur tous les sites. L'un d'entre eux a recours partiellement aux services d'une usine de méthanisation.

L'analyse des lisiers contaminés naturellement montre une grande diversité de virus viables rencontrés ([Tableau 2](#)). Des virus H5HP ont été retrouvés dans deux lisiers. Un virus H4 a aussi été mis en évidence ainsi que plusieurs paramyxovirus (PMV1 et PMV6) dans deux élevages.

Les analyses sont encore en cours afin de déterminer la viabilité des virus identifiés et l'évolution de leur infectiosité dans le temps. Néanmoins à ce stade, les résultats mettent en évidence la présence prolongée de virus viables, dont des virus IAHP non H5 et des paramyxovirus PMV, plus de deux mois après l'abattage des animaux. La survie de virus H5N8 HP dans ces lisiers est observée jusqu'à trois semaines après l'abattage des animaux, soit trois semaines après la dernière émission de virus dans la fosse. Le virus H5N8 HP n'a pas été retrouvé dans la fosse de trois élevages, dont celle de l'élevage 2 détenant encore des animaux et n'ayant reçu aucun traitement susceptible d'avoir un effet assainissant (nettoyage et désinfection pas démarrés). Bien que les prélèvements aient été réalisés en période hivernale, période la plus favorable au maintien du virus, l'ensemble des conditions optimales à la survie du virus n'ont pas forcément été réunies, contrairement au protocole sur le lisier contaminé artificiellement, réalisé dans des conditions optimisées. Ceci souligne aussi la difficulté de l'échantillonnage dans les conditions de terrain. Malgré la précaution prise consistant à brasser la fosse préalablement à la prise des échantillons, l'homogénéité du lisier ne peut pas être garantie. Il est aussi possible qu'un phénomène de dilution dans la fosse ne permette pas systématiquement de

**Tableau 1. Principales caractéristiques des cinq élevages de gavage de canards visités (France 2017)**

Élevage	Nb places	Délai confirmation foyer/prélèvement (j)	Délai abattage/prélèvement (j)	Type de fosse	Volume de la fosse (m <sup>3</sup> )	Modalités de traitement fosse	Devenir du lisier
1	714	7	6	Béton Ouvverte	Grande 400 + petite 75	Détergent + désinfectant	Assainissement naturel + méthanisation
2	900	1	0	Géotextile Fermée	300	Rien au moment du prélèvement	Traitement contre odeur - assainissement naturel - épandage + enfouissement sur l'exploitation
3	1000	31	24	Géotextile fermée	800	Détergent + désinfectant (traitement réalisé par une entreprise)	Traitement contre odeur - Lisier stocké depuis le 9/09/2016 - assainissement naturel- épandage sur champs à proximité du site
4	864	21	15	Géotextile Fermée (mais une partie découverte)	400	Détergent + désinfectant (double N et D réalisé par une entreprise)	Lisier stocké depuis 11/2016 - assainissement naturel - épandage sur champs à proximité du site (enfouisseur à disque)
5	1904	16	13	Géotextile Ouvverte	300	Détergent mais pas de désinfectant	Lisier stocké depuis 10/2016 - jamais de vidange complète de la fosse - épandage avec tonne à lisier sur des parcelles en jachère/pas d'enfouissement

**Tableau 2. Résultats par ovoculture des suivis de cinq lisiers contaminés dans le temps (France 2017)**

N° lisier	Semaines après abattage							
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
1	---	Pos <sup>A</sup> H5HP	Nég <sup>A</sup>	Nég	Nég	---	---	---
2	Pos H4 <sup>B</sup>	Pos	Pos	Pos H4	Pos	Pos	Pos	---
3	---	---	---	Pos PMV1 <sup>C</sup>	Pos	Pos	Pos	Pos
4	---	---	Pos H5HP	Pos PMV6	Pos PMV6	Pos PMV6	Pos	Pos
5	---	---	Pos PMV1	Pos	Pos	---	---	---

<sup>A</sup> Pos: positif; Nég: négatif

<sup>B</sup> H4: virus IA de sous-type H4

<sup>C</sup> PMV: Paromyxovirus

retrouver le virus, bien qu'il soit présent. Le lisier, s'il peut représenter un facteur de diffusion qui n'est pas à négliger (isolement de virus jusqu'à trois semaines), n'est pas un indicateur suffisamment fiable de la contamination d'un élevage puisque dans plus de la moitié de nos lisiers issus d'animaux contaminés H5N8 HP, le virus infectieux n'a pu être retrouvé dès le premier passage.

En conclusion, si les résultats obtenus à partir de lisiers naturellement contaminés n'ont pas permis de mettre en évidence une durée de survie des virus H5N8 HP infectieux supérieure à trois semaines, la persistance dans un lisier d'un autre virus influenza de sous-type H4 est démontrée sur une durée de sept semaines minimum. Cette étude conforte donc les préconisations de gestion des effluents proposées par la réglementation, à savoir un stockage naturel de 60 jours. Aucun des foyers n'ayant utilisé le chaulage, l'efficacité de ce dispositif n'a pu être testée sur le terrain.

De plus, ces résultats corroborent ceux obtenus dans le premier volet de l'étude sur les lisiers, consistant à étudier la persistance d'un virus H5N9 HP représentatif de l'épisode français de l'hiver 2015-2016 dans des lisiers d'élevages de canards en conditions expérimentales (contamination expérimentale et vieillissement artificiel): les résultats obtenus sont similaires pour deux types de production de canards

reproducteurs barbarie et pékin, suggérant une durée de survie du virus infectieux inférieure à cinq semaines, en l'absence de tout traitement.

Le volet expérimental à partir de lisier contaminé artificiellement, dans lequel l'ensemble des paramètres sont contrôlés, semble mieux adapté pour définir un protocole opératoire de gestion des effluents d'élevage puisqu'on se place dans les conditions optimales de sa survie. Face à la grande diversité d'équipements et de pratiques rencontrées sur le terrain, il sera ensuite nécessaire de le tester en élevage afin de pouvoir délivrer des recommandations pratiques et claires en cas de foyers.

## Remerciements

Les auteurs remercient les éleveurs ayant accepté de participer à l'étude, le laboratoire des Pyrénées et des Landes ainsi que les DDecPP des départements concernés.

## Références bibliographiques

Anses - Saisine 2016-SA-0027, 2016. Avis de l'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'évaluation des conditions d'assainissement des bâtiments d'élevage de volailles vis-à-vis du risque d'influenza aviaire.

Davidson, I., Nagar, S., Haddas, R., Ben-Shabat, M., Golender, N., Lapin, E., Altory, A., Simanov, L., Ribshtein, I., Panshin, A., Perk, S., 2010. Avian influenza virus H9N2 survival at different temperatures and pHs. *Avian Dis* 54, 725-728.

Duvauchelle, A., Huneau-Salaun, A., Balaine, L., Rose, N., Michel, V., 2013. Risk factors for the introduction of avian influenza virus in breeder duck flocks during the first 24 weeks of laying. *Avian Pathol* 42, 447-456.

Elving, J., Emmoth, E., Albihi, A., Vinneras, B., Ottoson, J., 2012. Composting for avian influenza virus elimination. *Appl Environ Microbiol* 78, 3280-3285.

Horm, V.S., Gutierrez, R.A., Nicholls, J.M., Buchy, P., 2012. Highly pathogenic influenza A(H5N1) virus survival in complex artificial aquatic biotopes. *PLoS one* 7, e34160.

Lu, H., Castro, A.E., Pennick, K., Liu, J., Yang, Q., Dunn, P., Weinstock, D., Henzler, D., 2003. Survival of avian influenza virus H7N2 in SPF chickens and their environments. *Avian Dis* 47, 1015-1021.

Nazir, J., Haumacher, R., Ike, A.C., Marschang, R.E., 2011. Persistence of avian influenza viruses in lake sediment, duck feces, and duck meat. *Appl Environ Microbiol* 77, 4981-4985.

Schmitz, A., Rousset, N., Le Bouquin, S., Ogor, K., Le Bras, M.-O., Martenot, C., Pertusa, M., Daniel, P., Guillou-Cloarec, C., Le Prioux, A., Allée, C., Guillemoto, C., Niqueux, E., Briand, F.-X., Morin, H., Richard, A., Etteradossi, N., 2017. Gestion des lisiers de palmipèdes contaminés par les virus influenza aviaires H5HP: recensement des pratiques et évaluation expérimentale de la survie du virus. In: Douzièmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Tours, 5 et 6 avril 2017, 188-192.

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. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 40, 3256-3260.

# Bulletin épidémiologique Santé animale - alimentation

Octobre 2017

## Fièvre charbonneuse en Moselle au cours de l'été 2016 : investigations épidémiologiques sur l'origine de la contamination et l'ampleur de l'épisode

Aurélien Courcou (1), Guillaume Girault (2), Christiane Mendy (2), Moulay Ali Cherfa (2), Nora Madani (2), Claire Ponsart (2)

\*Auteur correspondant : aurelie.courcou@anses.fr

(1) Université Paris-Est, Anses, Laboratoire de santé animale, Unité Epidémiologie, Maisons-Alfort, France

(2) Université Paris-Est, Anses, Laboratoire de santé animale, Unité Zoonoses bactériennes, Maisons-Alfort, France

### Résumé

Durant l'été 2016, un épisode de fièvre charbonneuse d'ampleur inhabituelle pour la France a touché la Moselle : de mi-juillet à début septembre, une trentaine de bovins de huit élevages sont morts au pâturage, le plus souvent subitement. La fièvre charbonneuse a été suspectée le 29 juillet et confirmée le 5 août par le laboratoire national de référence Charbon. Au total, six communes d'une surface totale de 68 km<sup>2</sup> ont été touchées. La DGAL a sollicité l'appui scientifique et technique de l'Anses pour mener des investigations épidémiologiques afin d'essayer de déterminer l'origine de la contamination des animaux et de prévenir les risques de diffusion de l'infection. Il s'est avéré que la zone touchée était une zone historiquement contaminée. Les conditions météorologiques de l'année 2016 (fortes précipitations au printemps et sécheresse en fin d'été) et la survenue d'inondations ont sans aucun doute favorisé la remontée des spores bactériennes présentes dans le sol. Cet épisode de fièvre charbonneuse s'inscrit donc dans un schéma classique de réapparition de l'infection. Il faut noter que la suspicion de l'infection et donc la mise en place de mesures optimales de gestion des cadavres sont intervenues tardivement (13 jours après la mort du premier bovin). La sensibilisation vis-à-vis de la fièvre charbonneuse de l'ensemble des professionnels paraît donc indispensable pour éviter de nouveaux épisodes de ce type à l'avenir.

### Mots clés

Fièvre charbonneuse, *Bacillus anthracis*, Moselle, bovins, environnement

### Abstract

#### ***Anthrax in Moselle during the summer 2016: investigations to identify the origin of the infection and understand the extent of the outbreak***

*During the summer 2016, an outbreak of anthrax being unusually large for France was reported in the French département of Moselle: between mid-July and early September, around thirty bovines from eight herds were found dead on pasture. A suspicion of anthrax was reported on July the 29th and confirmed on August the 5th by the National Reference Laboratory. Six municipalities covering a surface area of 68 km<sup>2</sup> were affected. Upon request from the French Ministry for Agriculture, outbreak investigations were conducted by the ANSES. The area had a history of anthrax. The unusual weather conditions in 2016 (heavy rains in the spring and hot and dry weather at the end of the summer) as well as the occurrence of floods undoubtedly helped to move up the spores located in the soil of contaminated pastures. This outbreak of anthrax seems therefore a classic one. However, the suspicion of infection (and therefore the implementation of appropriate measures of carcass disposal) was delayed (suspicion reported 13 days after the first death of cattle). Increasing awareness of all the professionals is therefore essential to prevent outbreaks of this size in the future in France.*

### Keywords

*Anthrax, Bacillus anthracis, Moselle, Cattle, Environment*

La fièvre charbonneuse est une zoonose de répartition mondiale due à *Bacillus anthracis*. Elle touche principalement les herbivores sauvages et domestiques chez lesquels elle est généralement fatale (mort brutale fréquente). La bactérie a la capacité de sporuler lorsqu'elle est hors de l'hôte (WHO 2008). Les spores sont très résistantes dans le milieu extérieur et peuvent persister plusieurs dizaines d'années dans le sol. Les animaux se contaminent principalement en ingérant des spores au pâturage (ingestion d'herbe ou de terre contaminée). La spore pouvant également survivre dans le foin, une contamination des animaux à l'étable est possible via des fourrages contaminés. Le cycle d'infection se fait essentiellement entre herbivores de manière indirecte (anazoote), le sol contaminé par les spores étant le réservoir de l'infection. Suite à l'ingestion, les spores se transforment par germination en bactéries, qui se multiplient dans l'hôte et produisent des facteurs de virulence, dont des toxines. Lors de forme aigue, l'animal infecté meurt rapidement. Dans tous les cas, de grandes quantités de spores se forment suite à la mort de l'animal, contaminant le sol et entretenant ainsi le cycle d'infection de la fièvre charbonneuse dans les pâtures contaminées, appelées « champs maudits ». Les eaux souterraines et de ruissellement peuvent également être contaminées par des spores. Les facteurs environnementaux, notamment météorologiques et pédologiques, jouent un rôle prépondérant dans ce cycle : ils impactent la sporulation, la survie des spores dans le sol ainsi que la remontée des spores en surface, et donc la contamination des animaux.

Chez l'Homme, trois formes de fièvre charbonneuse sont décrites : cutanée (dont le charbon d'injection (usage de drogues) est une forme dérivée), intestinale et pulmonaire (WHO 2008). Les trois formes sont potentiellement mortelles en l'absence d'un traitement adapté et efficace administré rapidement. La forme cutanée, la plus fréquente fait suite à l'entrée de spores ou de bactéries sous leur forme végétative, au niveau une lésion cutanée. Cette voie d'infection est le plus souvent liée à la manipulation sans précaution d'animaux morts ou de produits d'origine animale contaminés. Certaines activités professionnelles sont donc plus à risque : éleveurs, vétérinaires, personnel des équarrissages, des abattoirs ou des mégisseries, personnel des travaux publics ou encore des laboratoires vétérinaires.

En France, les épisodes de fièvre charbonneuse en élevage sont peu fréquents mais réguliers : 69 foyers ont été notifiés chez des animaux domestiques (bovins principalement) entre 2001 et 2013 (Girault et al. 2014). Le dernier foyer notable datait de l'été 2013 : douze bovins d'une même pâture de Haute-Marne étaient morts en l'espace de trois semaines (Girault et al. 2014). Les cas autochtones de fièvre charbonneuse chez l'Homme sont rarissimes mais néanmoins rapportés : entre octobre 2001 et 2016, sept cas humains (dont cinq autochtones), tous cutanés, ont été déclarés en France (Mailles, comm. pers.). Au mois d'août 2016, plusieurs foyers de fièvre charbonneuse ont été notifiés en Moselle : au 23 août, on dénombrait six exploitations bovines touchées localisées sur quatre communes, et un total de 25 bovins morts. La DGAL a alors sollicité l'appui scientifique et technique de l'Anses pour mener des investigations épidémiologiques dans les élevages concernés, afin d'essayer de déterminer l'origine de la contamination des animaux et de prévenir les risques de diffusion de l'infection. Cet article présente une synthèse des résultats de ces investigations.

## Description de l'épisode

### Chronologie des événements

La chronologie des événements est présentée dans le [tableau 1](#). L'infection a été confirmée par le laboratoire national de référence Charbon (LNR - Anses Maisons-Alfort) le 5 août 2016 dans trois élevages bovins pâturant sur les communes de Saint-Jean-de-Bassel et de Berthelming. La fièvre charbonneuse avait été suspectée pour la première fois le 29 juillet par le vétérinaire d'une des exploitations touchées (élevage 1). A cette date, dix animaux étaient morts (4 au sein de l'élevage 1, 5 au sein de de l'élevage 2 et 1 au sein de l'élevage 3).

Par la suite, cinq autres exploitations bovines ont été confirmées infectées, la dernière en date du 7 septembre 2016. Au total, six communes et dix pâtures ont donc été concernées, les deux communes les plus éloignées étant distantes d'une quinzaine de kilomètres. Les deux derniers élevages confirmés infectés n'ont pas été visités au cours des investigations épidémiologiques (confirmation de l'infection contemporaine ou postérieure aux visites de terrain). Les résultats présentés dans cet article portent plus spécifiquement sur les six premiers élevages déclarés infectés. Au total, au sein de ces six élevages, 30 animaux (respectivement 9, 7, 5, 4, 1 et 4 dans les élevages 1 à 6) répartis sur huit pâtures et cinq communes, sont morts entre le 16 juillet et le 27 août, dont neuf pour lesquels un diagnostic de certitude de fièvre charbonneuse a été posé par le LNR. Les suspicions et confirmations de l'infection ont entraîné la mise en place d'une antibiothérapie dans six des huit lots d'animaux touchés puis la vaccination contre la fièvre charbonneuse dans les élevages concernés à partir du 13 août. La vaccination préventive obligatoire dans les communes touchées et avoisinantes a débuté le 31 août. Aucune mortalité particulière n'a été rapportée au sein de la faune sauvage.

### Présentation clinique et lésionnelle

Pour 24 des 30 bovins morts, la mort est survenue subitement sans signe clinique détecté au préalable. Pour les six autres, les signes rapportés étaient apathie, difficultés à se déplacer, fièvre, difficultés respiratoires ou toux, et meuglements importants. Sur les animaux ayant fait l'objet de prélèvements sanguins, les vétérinaires ont fait mention d'un sang facile à prélever, non coagulé (au moins trois animaux sur les neuf prélevés). Par ailleurs, cinq autopsies ont été réalisées avant la confirmation de l'infection, la quatrième (et première dans l'élevage 1) ayant conduit à la suspicion de fièvre charbonneuse. Le vétérinaire ayant pratiqué cette autopsie a rapporté une absence de rigidité cadavérique, et une rate noire et hypertrophiée.

### Liens épidémiologiques entre les huit élevages touchés

La fièvre charbonneuse n'étant pas une maladie contagieuse, il est tout-à-fait possible d'avoir plusieurs élevages touchés sur une zone

**Tableau 1.** Chronologie de l'épisode de fièvre charbonneuse de 2016 en Moselle

Date	Événement
16/07	1 <sup>er</sup> bovin mort dans l'élevage 1 (Berthelming)
17/07	1 <sup>er</sup> bovin mort dans l'élevage 2 (Saint-Jean-de-Bassel)
28/07	1 <sup>er</sup> bovin mort dans l'élevage 3 (Saint-Jean-de-Bassel)
29/07	5 <sup>ème</sup> bovin mort dans l'élevage 1 et 1 <sup>ère</sup> autopsie dans cet élevage => suspicion de fièvre charbonneuse
31/07	6 <sup>ème</sup> bovin mort dans l'élevage 1 et 4 <sup>ème</sup> autopsie dans cet élevage => prélèvement et envoi au LNR Charbon
02/08	2 <sup>ème</sup> bovin mort dans l'élevage 3 => prélèvement et envoi au LNR Charbon
05/08	Confirmation de l'infection sur les 3 animaux prélevés (élevages 1 à 3). Au total, on dénombre à cette date 20 bovins morts sur 4 pâtures appartenant aux élevages 1 à 3 (Berthelming, Saint-Jean-de-Bassel et Gosselming)
13/08	Début de la vaccination dans les élevages touchés
16/08	Confirmation de l'infection dans l'élevage 4 (Gosselming)
18/08	Confirmation de l'infection dans l'élevage 5 (Langatte) et sur une seconde parcelle de l'élevage 4 (Saint-Jean-de-Bassel)
23/08	Confirmation de l'infection dans l'élevage 6 (Langatte)
31/08	Début de la vaccination préventive obligatoire des bovins et ovins pâturant sur les communes touchées et avoisinantes (15 communes concernées)
01/09	Confirmation de l'infection dans l'élevage 7 (Langatte)
07/09	Confirmation de l'infection dans l'élevage 8 (Bébing)
Bilan	8 élevages, 10 pâtures et 6 communes concernés. Au moins 32 bovins morts. Plus de 11 000 animaux vaccinés dont une majorité de bovins.



géographique assez large, sans qu'il y ait de lien entre ces élevages. Néanmoins, nous avons souhaité étudier les liens entre pâtures et élevages touchés, afin de promouvoir d'éventuelles mesures de prévention de contaminations secondaires.

Tout d'abord, il faut noter une très forte proximité géographique entre les quatre pâtures touchées à Saint-Jean-de-Bassel et Berthelming (élevages 1 à 4 - pâtures mitoyennes ou au maximum à quelques centaines de mètres). De plus, des liens concernant le matériel et le personnel ont été mis en évidence entre les élevages et les pâtures concernées : même matériel de fauchage utilisé à quelques jours d'intervalle sur les deux pâtures touchées d'un même élevage, utilisation du manitou d'un élevage pour déplacer les premiers animaux morts d'un autre élevage, salarié intervenant dans deux élevages, appartenance à la même Cuma pour trois élevages, même clinique vétérinaire pour six élevages, etc. Néanmoins, le rôle de ces liens ne nous a pas semblé majeur dans l'expansion de l'épisode de fièvre charbonneuse.

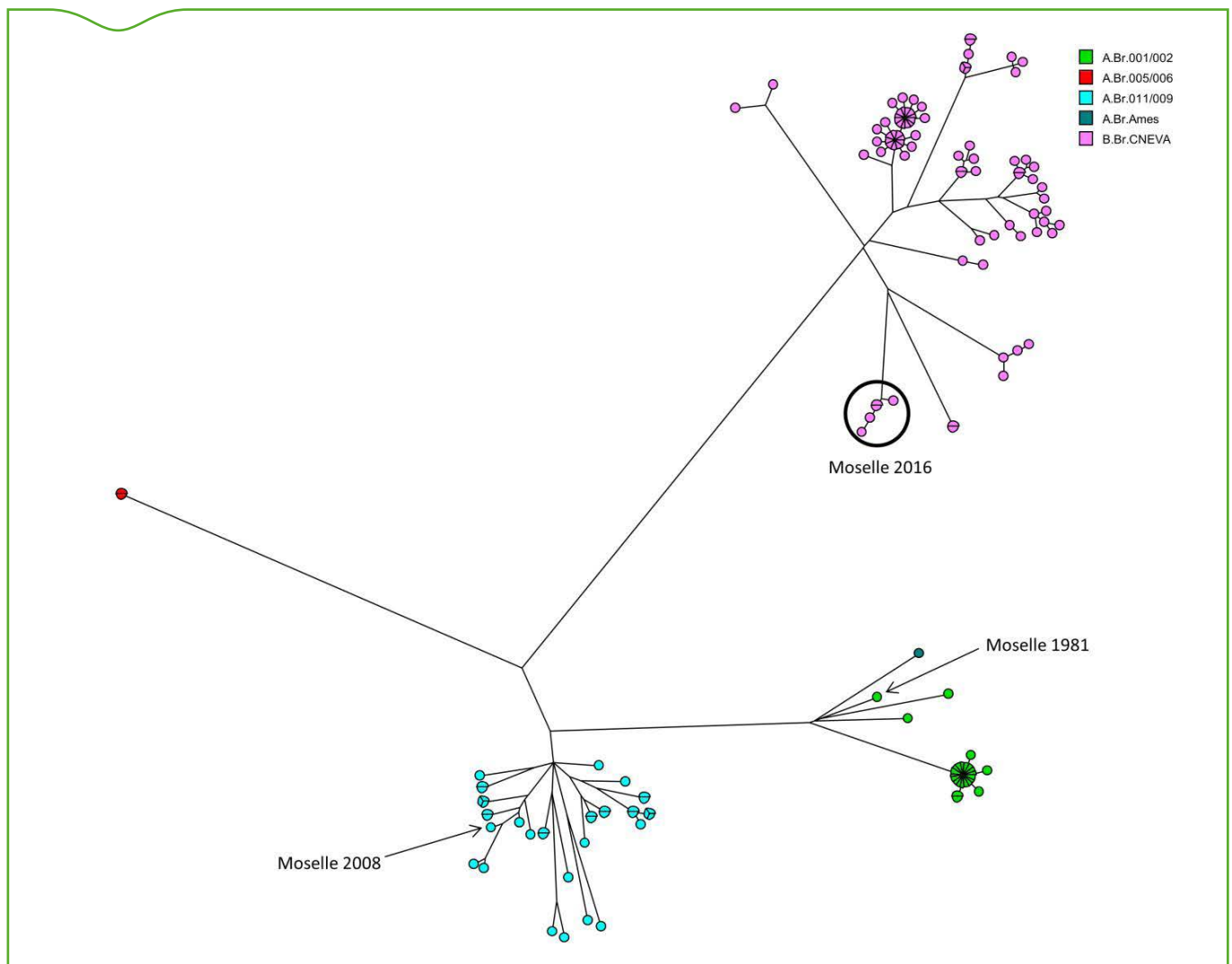
En effet, il est théoriquement possible que le matériel ou les personnes aient transporté de manière passive des spores entre pâtures différentes. Néanmoins, la transmission de l'infection entre pâtures ou entre élevages par du matériel d'élevage n'a, à notre connaissance, pas été établie et il semble peu probable que le matériel de fauchage ait transporté suffisamment de spores pour pouvoir contaminer une

pâturage à distance. Seul le matériel ayant été en contact avec un animal mort de fièvre charbonneuse (comme par exemple le matériel utilisé pour transporter et/ou autopsier les animaux morts) pourrait être suffisamment contaminé.

### Biologie moléculaire

Au cours de cet épisode, douze souches de *Bacillus anthracis* ont été isolées au LNR. Cinq souches ont été sélectionnées pour des analyses de séquençage du génome total. Le choix des souches a été fait en maximisant la distance entre les exploitations concernées.

La comparaison des séquences de ces cinq souches montrent qu'elles sont semblables et appartiennent toutes, comme un grand nombre de souches françaises, à une même sous-lignée appelée B.Br CNEVA. Cependant, ces souches sont différentes des souches isolées auparavant dans le département (dont la souche isolée lors de l'épisode de Grostenquin de 2008) : elles se regroupent dans une branche comprenant des souches isolées en Suisse et en Pologne. C'est la première fois que sont isolées en France des souches appartenant à cette branche (Figure 1). Néanmoins, les souches présentes en Moselle étant très mal connues (seules deux souches séquencées avant celles-ci), l'interprétation de ces résultats de séquençage est difficile. Il est fort possible que ces souches soient présentes en Moselle depuis un certain temps, sans jamais avoir été détectées jusqu'à présent.



**Figure 1.** Arbre phylogénétique des souches de *Bacillus anthracis* isolées majoritairement en France. Les différentes sous-lignées de *B. anthracis* caractérisées par SNP canoniques sont représentées selon un code couleur. Les souches de l'épisode de fièvre charbonneuse observé en Moselle en 2016 sont entourées par un cercle noir. Les souches isolées dans la même région en 1981 et 2008 sont indiquées par une flèche. Ces trois épisodes sont bien différenciés par l'analyse des SNP sur génome complet, les souches incriminées appartenant à trois sous-lignées différentes

## Éléments ayant pu favoriser la survenue de cet épisode de fièvre charbonneuse

### Historique de fièvre charbonneuse dans la zone

La zone touchée en 2016 a connu par le passé plusieurs épisodes de fièvre charbonneuse. D'après les documents retrouvés aux archives départementales de Moselle, un épisode important de fièvre charbonneuse a eu lieu en 1921. Douze communes de Moselle, parmi lesquelles Saint-Jean-de-Bassel, ont été touchées par de nombreuses mortalités de bovins durant l'été et l'automne. Trois personnes ayant manipulé de la viande de bêtes charbonneuses sont décédées. Par la suite, différents cas de fièvre charbonneuse ont été rapportés dans le département, dont à Saint-Jean-de-Bassel (1953) et Berthelming (1946 et 1954), deux des six communes touchées en 2016. De plus, un des éleveurs rencontrés a rapporté la présence de fièvre charbonneuse sur son site d'exploitation situé à Saint-Jean-de-Bassel dans les années 1960.

Entre 1990 et 2016, un seul cas de fièvre charbonneuse a été notifié en Moselle et ce, à Grostenquin en 2008 (Grostenquin se situant à 27 km à vol d'oiseau au nord-ouest de Saint-Jean de Bassel). Ce cas avait été découvert suite à la détection de trois cas humains de charbon cutané, les trois personnes infectées ayant dépecé et éviscéré la carcasse de la bête charbonneuse (Mailles *et al* 2008). Les circonstances de découverte du cas de 2008 et les entretiens avec les éleveurs incitent à penser à un sous-diagnostic et donc une sous-déclaration des cas de fièvre charbonneuse. Si un seul animal meurt au pâturage, le vétérinaire n'est pas forcément appelé. S'il est appelé, une suspicion de fièvre charbonneuse n'est pas forcément émise. Ainsi, l'animal peut partir à l'équarrissage sans que la cause de la mort ait été déterminée.

### Conditions météorologiques et remontée de nappes phréatiques

Les années 2015 et 2016 ont connu en Moselle des conditions météorologiques particulières. L'année 2015 a été chaude et sèche comme dans le reste de la France. En 2016, les mois d'avril, mai et juin ont, au contraire, été caractérisés par de fortes précipitations (cumuls quasiment une fois et demie supérieurs à la normale). Ces nombreux passages pluvieux ont provoqué crues et inondations, y compris sur les pâtures touchées : sept des huit pâtures ont été qualifiées de particulièrement humides, boueuses ou inondées par les éleveurs concernés, et cinq des huit pâtures se situent dans des zones où la sensibilité aux remontées de nappes phréatiques - et donc aux inondations - est moyenne à forte (Bureau de recherches géologiques et minières, données du 15/12/2011, <http://www.inondationsnappes.fr>). Les mois de juillet et août 2016 ont de nouveau été marqués par une pluviométrie déficitaire.

Ces conditions météorologiques et environnementales sont connues pour être associées à la survenue de cas de fièvre charbonneuse. Ainsi, en 2006 dans l'Ouest du Canada, une étude cas-témoins a permis d'identifier quatre facteurs de risque de fièvre charbonneuse : une herbe de courte longueur, une densité au pâturage de plus de deux animaux à l'hectare, la survenue d'inondations et des pâtures humides (Epp *et al*. 2010). Ces deux dernières caractéristiques ont été observées au printemps-été 2016 dans quasiment toutes les pâtures touchées de Moselle, de même que l'alternance de fortes précipitations et de sécheresse décrite comme une des conditions météorologiques classiquement associées à la fièvre charbonneuse (WHO 2008).

### Caractéristiques des sols

D'après la littérature, les épisodes de fièvre charbonneuse sont fréquemment associés à des sols riches en matière organique, en calcium et ayant un pH plutôt alcalin (FAO 2016). Dans la zone touchée, le pH est plutôt acide. Par contre, les teneurs en matière

organique sont modérées et les teneurs en calcium total sont élevées, ce qui peut constituer des facteurs favorables à la survie des spores de *Bacillus anthracis* (Dragon *et al*. 1995).

### Réalisation de travaux d'aménagement

Une des pâtures touchées a fait l'objet de travaux dans le mois précédent les mortalités (tuyaux de drainage posés en juillet et mortalités à partir du 10 août). Le creusement de la tranchée pourrait avoir entraîné la remontée de spores de *Bacillus anthracis* présentes dans le sol. Ce mécanisme n'a pas été mis en évidence pour les autres pâtures touchées.

### Gestion des suspicions et des premiers cas

La suspicion de fièvre charbonneuse a été tardive : onze bovins sont morts (dont 4 autopsiés) sur une période de dix jours au sein de trois exploitations avant qu'une suspicion ne soit officiellement portée. Différentes hypothèses avaient d'abord été explorées par le vétérinaire des élevages 2 et 3 (entérototoxicité, empoisonnement, etc.).

En l'absence de suspicion de fièvre charbonneuse, la gestion des cadavres des premiers cas n'a pas été optimale. Cinq autopsies ont été réalisées en pâture. Les cadavres des animaux morts avant la confirmation de l'infection ont le plus souvent été déplacés (transportés sur les places d'équarrissage situées près des bâtiments d'élevage). Dans certains cas, les cadavres sont restés en pâture sans protection particulière (et donc accessible aux autres animaux présents) plus longtemps que souhaité, plusieurs éleveurs s'étant plaints du délai du passage du camion d'équarrissage (régulièrement de plus de 3 jours ouvrés en début d'épisode, avant la confirmation de l'infection) ou ont été tirés au sol sur toute la longueur de la pâture. Ces éléments ont pu provoquer une forte contamination des sols et favoriser la contamination des animaux du reste des lots.

### Rôle des insectes

Dans la littérature, les insectes sont fréquemment cités lors d'épisodes de fièvre charbonneuse (Hugh-Jones & Blackburn 2009, WHO 2008). Deux mécanismes sont décrits : les mouches nécrophages (par exemple les *Calliphoridae*, mouches vertes et bleues) auraient un rôle amplificateur de cas tandis que les insectes hématophages tels que les tabanidés pourraient propager la bactérie à distance.

Au cours de nos investigations, seul un éleveur a rapporté une abondance importante de taons en 2016, les autres éleveurs ayant affirmé n'avoir pas rencontré de problèmes particuliers avec les insectes cette année-là. A noter que les bovins touchés n'étaient pas protégés contre les piqûres d'insectes au moment de la survenue des cas. Néanmoins, l'importance que pourraient avoir joué ces insectes n'est pas possible à déterminer. Notre impression est que ce mode de propagation n'a probablement pas été déterminant, si tant est qu'il ait existé.

### Épandage de *Bacillus thuringiensis* en forêt

Début mai 2016, l'Office national des forêts (ONF) a procédé à l'épandage par hélicoptère de FORAY® 48B, un insecticide biologique présentant une activité spécifique sur les chenilles processionnaires du pin et du chêne, sur certaines forêts domaniales de Moselle dont celles de la zone touchée. Le FORAY® 48B contient les principes actifs (spores et cristaux) de *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki*, bactérie faisant partie d'un groupe de huit espèces de *Bacillus* nommé « groupe *Bacillus cereus* », tout comme *Bacillus anthracis*. En raison de cette parenté, certaines personnes ont émis l'hypothèse que le produit épandu ait été contaminé par *Bacillus anthracis* ou que le *Bacillus thuringiensis* « ait muté » en *Bacillus anthracis*. D'un point de vue épidémiologique, aucun élément n'était en faveur d'un lien entre l'épandage de FORAY® 48B et la survenue des cas de fièvre charbonneuse (pas de cas rapporté dans la faune sauvage, délai entre épandage et survenue des cas trop long, etc.). Néanmoins, pour s'assurer de l'absence de contamination

des cuves, des prélèvements sur les fonds des neuf cuves qui étaient toujours entreposées par l'ONF ont été effectués et analysés au CEA de Marcoule par phylo-peptidomique, une méthode permettant d'identifier rapidement l'ensemble des agents biologiques pathogènes présents dans un mélange. Seul *Bacillus thuringiensis* a été détecté dans les neuf échantillons de FORAY® 48B analysés. *Bacillus anthracis* n'a été détecté dans aucun des prélèvements.

## Conclusions et recommandations

La zone de Moselle touchée en 2016 par la fièvre charbonneuse est une zone historiquement contaminée : des mortalités de bovins dues à cette maladie sont régulièrement notifiées depuis au moins une centaine d'années. De plus, la zone a subi une forte sécheresse en 2015 suivie d'une alternance de fortes précipitations et de sécheresse en 2016. La survenue de cas de fièvre charbonneuse en Moselle au cours de l'été 2016 s'inscrit donc dans un schéma classique de réapparition de l'infection.

Le nombre d'animaux et d'élevages touchés (plus de 30 animaux morts au sein de huit élevages) et l'étendue géographique de la zone concernée (une quinzaine de kilomètres du nord au sud sur 4-5 km d'est en ouest) peuvent à première vue sembler étonnants si l'on compare cet épisode aux cas de fièvre charbonneuse habituellement décrits en France. Néanmoins, l'ampleur de l'épisode de Moselle n'est pas hors normes : en 2008, 21 exploitations réparties sur dix communes avaient subi des mortalités de bovins dues à la fièvre charbonneuse dans le Doubs (Calavas et al. 2009). A l'étranger également, de récents épisodes de fièvre charbonneuse (en Italie en 2004 – Fasanella et al. 2010, aux Etats-Unis en 2005 – Mongoh et al. 2008 ou au Canada en 2006 - Himsworth & Argue 2008) ont touché des zones de plusieurs centaines de km<sup>2</sup> et ont tué des dizaines (voire des centaines) d'animaux.

Néanmoins, le nombre d'animaux morts au sein de chaque pâture aurait pu être réduit par la mise en place précoce de mesures de contrôle appropriées, notamment de mesures de gestion des cadavres. En effet, le délai ayant précédé la suspicion de l'infection est sans doute un élément ayant fortement favorisé l'ampleur de l'épisode. La sensibilisation des professionnels vis-à-vis de la fièvre charbonneuse (vétérinaires praticiens, éleveurs et directions départementales des services vétérinaires) sur l'ensemble du territoire national paraît donc indispensable pour éviter la survenue de nouveaux épisodes de cette ampleur à l'avenir. Une ou plusieurs morts subites au pâturage doivent amener éleveurs et vétérinaires à suspecter la fièvre charbonneuse, même dans les zones où l'infection n'a pas été notifiée depuis longtemps (voire même si elle n'a jamais été notifiée de mémoire d'homme).

Suspecter et confirmer l'infection rapidement permet en effet la mise en œuvre de mesures permettant de limiter la mortalité animale et l'étendue de l'infection (FAO 2016) : vacciner les animaux sensibles des élevages touchés et des élevages environnants, restreindre et retracer les mouvements des animaux des pâtures touchées (et de leurs produits le cas échéant), mettre en place une antibiothérapie adaptée sur les animaux atteints, gérer de manière adéquate les cadavres, désinfecter le matériel d'élevage contaminé, renforcer la surveillance

et la vigilance dans les zones voisines afin de détecter rapidement de nouveaux cas, etc. La communication est également un point crucial pour obtenir la confiance des acteurs : mettre à disposition des éleveurs, des vétérinaires et du grand public une information claire, précoce et concertée entre professionnels de la santé animale et de la santé humaine est indispensable pour obtenir l'adhésion de tous aux mesures de gestion mises en œuvre.

## Remerciements

Les auteurs remercient les éleveurs interviewés ainsi que la direction départementale de la protection des populations de Moselle, la direction régionale de l'Agriculture, l'Alimentation et la Forêt Grand Est, l'hydrogéologue agréée pour la Moselle, l'Office national des forêts de Moselle, la Mission des urgences sanitaires de la direction générale de l'Alimentation, le réseau Sagir de l'Office national de la chasse et de la faune sauvage, le Laboratoire d'hydrologie de l'Anses à Nancy, le Laboratoire Innovations technologiques pour la détection et le diagnostic (Li2D) du Commissariat à l'énergie atomique de Marcoule ainsi que les sociétés Valent BioSciences Corp. et Sumitomo Chemical Agro Europe SAS pour le temps qu'ils nous ont accordé et la qualité des échanges.

## Références bibliographiques

- Blackburn J., Van Ert M., Mullins J., Hadfield T., Hugh-Jones M. 2014. The Necrophagous Fly Anthrax Transmission Pathway: Empirical and Genetic Evidence from Wildlife Epizootics. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 14 (8): 576-583.
- Calavas D., Sala C., Vaissaire J., Condé J., Thien-Aubert H., Hessemann M., Woronoff-Rehn N. 2009. Retour d'expérience sur un épisode de fièvre charbonneuse chez les bovins dans le Doubs au cours de l'été 2008. *Bull Epid Santé Anim Alim.* 32:1-6.
- Dragon D. C., Rennie R. P. 1995. The ecology of anthrax spores: Tough but not invincible. *Can Vet J* 1995; 36: 295-301.
- Epp T., Waldner C., Argue C.K. 2010. Case-control study investigating an anthrax outbreak in Saskatchewan, Canada — Summer 2006. *Can Vet J.* 51:973-978.
- FAO. 2016. Anthrax outbreaks : a warning for improved prevention, control and heightened awareness. *EMPRES Watch*, Vol. 37.
- Fasanella A., Garofolo G., Galante D., Quaranta V., Palazzo L., Lista F., Adone R., Hugh Jones M. 2010. Severe anthrax outbreaks in Italy in 2004: considerations on factors involved in the spread of infection. *New microbiologica*, 33:83-86.
- Girault G., Kuhse S., Vin H., Marchal-Nguyen R., Laoucau K., Derzelle S. 2014. Fièvre charbonneuse en 2013 : un foyer en Haute-Marne rappelle que cette zoonose est toujours d'actualité. *Bull Epid Santé Anim Alim.* 63:6-9.
- Himsworth C.G., Argue C.K. 2008. Cross-Canada Disease Report - Anthrax in Saskatchewan 2006: An outbreak overview. *Can Vet J.* 49:235-237.
- Hugh-Jones M., Blackburn J. 2009. The ecology of *Bacillus anthracis*. *Molecular Aspects of Medicine* 30:356-367.
- Mailles A, Alauzet C, Mock M, Garin-Bastuji B, Veran Y. 2010. Cas groupés de charbon cutané humain en Moselle – Décembre 2008. Rapport de l'Institut de veille sanitaire, février 2010.
- Mongoh M.N., Dyer N.W., Stoltenow C.L., Khaitsa M.L. 2008. Risk Factors Associated with Anthrax Outbreak in Animals in North Dakota, 2005: A Retrospective Case-Control Study. *Public Health Reports*, 123:352-359.
- WHO. 2008. Anthrax in humans and animals – 4th ed. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.

# Bulletin épidémiologique Santé animale - alimentation

Octobre 2017

## Réseau national de surveillance des virus influenza A chez le Porc (Résavip) Bilan de fonctionnement et résultats de la surveillance menée en 2016

Emmanuel Garin (1)\*, Séverine Hervé (2), Nicolas Rose (3), Caroline Locatelli (4), Ludovic Lecarpentier (5), David Ngwa-MBot (6), Sébastien Wendling (7), Laure Bournez (8)\*, Didier Calavas (9)\* et Gaëlle Simon (2)

Auteur correspondant : emmanuel.garin@coopdefrance.coop

(1) Coop de France, Paris, France

(2) Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Virologie immunologie porcines, Laboratoire national de référence Influenza porcin, Ploufragan, France

(3) Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Epidémiologie et bien-être du porc, Ploufragan, France

(4) Adilva, Paris, France

(5) SNGTV, Paris, France

(6) GDS-France, Paris, France

(7) DGAL, Bureau de la santé animale, Paris, France

(8) Anses, Direction des laboratoires, Unité de coordination et d'appui à la surveillance, Maisons-Alfort, France

(9) Anses, Coordonnateur Plateforme ESA

\* Membre de l'équipe opérationnelle de la Plateforme ESA

### Résumé

En 2016, 309 visites d'élevage (267 élevages différents) ont été réalisées dans le cadre de Résavip dans douze (anciennes) régions et 28 départements. Ce nombre a augmenté d'environ 10 % par rapport aux trois dernières années. Le suivi des indicateurs de fonctionnement montre que les étapes clés du fonctionnement du réseau se sont améliorées depuis 2015. Cependant, il est à noter que dans certaines régions n'ayant toujours pas eu (ou très peu) de visites, aucune réunion annuelle avec les acteurs régionaux n'a eu lieu.

Les visites ont permis de détecter des virus influenza porcins de type A (VIPs) dans presque la moitié des cas (44,7 %). Un peu moins des trois quarts (71 %, 98/138) des virus détectés ont pu être sous-typés. Comme les années précédentes, les VIPs majoritairement identifiés par Résavip étaient les virus enzootiques H1<sub>N1</sub> (66,3 %, 65/98) et H1<sub>hu</sub>N2 (12,2 %, 12/98). Le premier a été détecté sur une grande partie du territoire, tandis que le deuxième a été détecté dans des élevages de l'Ouest et pour la première fois dans le Nord. Les autres virus enzootiques à l'échelle européenne et/ou française (H1N1pdm, H1<sub>hu</sub>N2<sub>Δ146-147</sub> et H3N2), un virus réassortant rH1<sub>av</sub>N2 et des mélanges viraux ont été détectés de façon sporadique (entre 1 et 7 % des virus identifiés). À noter qu'une grande diversité virale a été observée dans les Hauts-de-France en 2016.

### Mots-clés

Porc, virus influenza de type A, virus influenza porcin, virus réassortant, grippe, Résavip, surveillance

### Abstract

**National network for surveillance of type A influenza virus in swine (Résavip) – Review of operations and surveillance results for 2016**

In 2016, 309 farm visits were performed, covering 267 different farms, as part of Résavip in the twelve (former) regions of France and 28 departments. This number increased by about 10% compared to the previous three years. Assessment of the performance indicators shows that the key steps in the network's functioning have improved since 2015. However, we should mention that in certain regions with few or no visit, no annual meeting was held with the regional stakeholders.

The visits detected type A swine influenza viruses (SIVs) in almost half of the cases studied (44.7%). A little less than three quarters (71%, 98/138) of the detected viruses could be subtyped. Like in previous years, the SIVs most commonly identified by Résavip were enzootic H1<sub>N1</sub> virus (66.3%, 65/98) and H1<sub>hu</sub>N2 virus (12.2%, 12/98). H1<sub>N1</sub> was detected in regions across mainland France, while H1<sub>hu</sub>N2 was found on farms in the West of the country and for the first time in the North. The other enzootic viruses at the European and/or French level (H1N1pdm, H1<sub>hu</sub>N2<sub>Δ146-147</sub> and H3N2), a reassortant rH1<sub>av</sub>N2 virus, and viral mixtures were detected sporadically (between 1% and 7% of identified viruses). Importantly, high viral diversity was observed in the Hauts-de-France region in 2016.

### Keywords

Pig, type A influenza virus, swine influenza virus, reassortant virus, flu, Résavip, surveillance

Le réseau national de surveillance des virus influenza circulant chez le Porc en France métropolitaine (Résavip) a été mis en place en avril 2011. Ce réseau permet d'avoir une bonne connaissance des virus influenza porcins (VIP) présents en France métropolitaine et de mieux connaître leur répartition géographique. Afin de suivre son activité et de cibler des actions visant à l'améliorer, des indicateurs de fonctionnement de Résavip, définis dans le cadre du groupe de suivi virus influenza porcins (GS-VIP) de la Plateforme ESA, ont été mis en place aux niveaux national et régional en 2015. Ces indicateurs prennent en compte les étapes clés du dispositif regroupées en différentes phases caractéristiques des réseaux de surveillance : la collecte des données, le retour d'information vers les différents acteurs et le pilotage. Cet article présente le premier bilan de ces indicateurs et les principaux résultats de la surveillance menée par Résavip en 2016, en comparaison de ceux obtenus les années précédentes, de 2011 à 2015 (Hervé *et al.*, 2014; Garin *et al.*, 2015; Garin *et al.*, 2016).

## Bilan du fonctionnement

La majorité des indicateurs ont un objectif chiffré (Figure 1) tandis que quelques autres, qui sont indépendants du réseau (délai postal ou qualité biologique des prélèvements), n'en ont pas. Pour ces derniers, c'est le suivi de leur évolution annuelle qui est pris en compte.

Bien que certains indicateurs n'atteignent pas les objectifs fixés, ils en sont très proches. Par exemple, le retard observé dans la transmission trimestrielle des bases de données régionales à l'échelon national est peu important et n'a donc pas influencé le suivi des résultats ni la rédaction des bilans trimestriels. Les indicateurs de suivi des délais d'envoi des prélèvements du vétérinaire volontaire au laboratoire départemental agréé et de réalisation des analyses de première et de deuxième intentions, respectivement par les LDA et le LNR-IP, très stables par rapport aux deux dernières années, sont jugés satisfaisants. Globalement, la situation s'est améliorée par rapport à 2014 et 2015,

et les manques observés n'ont pas impacté le fonctionnement global du réseau. Il a fallu cependant maintenir la sensibilisation auprès de quelques animateurs régionaux.

Les indicateurs permettant de suivre la qualité du retour d'information des unités centrales régionales et nationale vers les différents acteurs sont tout à fait satisfaisants, puisque l'ensemble des bilans sont transmis par les animateurs régionaux et l'animateur national aux acteurs suivant les modalités prévues, à l'exception de deux régions pour lesquelles seul un bilan semestriel a été réalisé par les animateurs régionaux. Au niveau régional, cet indicateur s'est amélioré par rapport aux deux dernières années. S'agissant d'un réseau de surveillance événementielle, ce retour d'information est fondamental pour assurer le maintien de l'implication des acteurs, notamment celle des vétérinaires dont l'intervention est bénévole.

L'évaluation du pilotage du réseau se base sur la réalisation des réunions prévues. Ces réunions permettent également de faire un retour d'information et de sensibiliser les acteurs locaux. Bien que dans certaines régions plusieurs réunions ont eu lieu, il faut souligner que dans un tiers d'entre elles, notamment celles n'ayant pas eu de prélèvements (ou très peu), aucune n'a été organisée.

## Bilan de la surveillance

La réorganisation administrative des régions françaises de métropole, opérée par l'État fin 2015, n'a pas engendré de modification de l'organisation régionale de Résavip en 2016. Comme les années précédentes, cette organisation se basait donc sur vingt régions<sup>(1)</sup> (Basse et Haute Normandie regroupées en une seule région, la Normandie, et absence de réseau en Languedoc-Roussillon). Les résultats de la surveillance obtenus en 2016 sont donc présentés suivant cet agencement.

(1) Note de service DGAI/SDSPA/2015-38 précisant l'organisation de Résavip

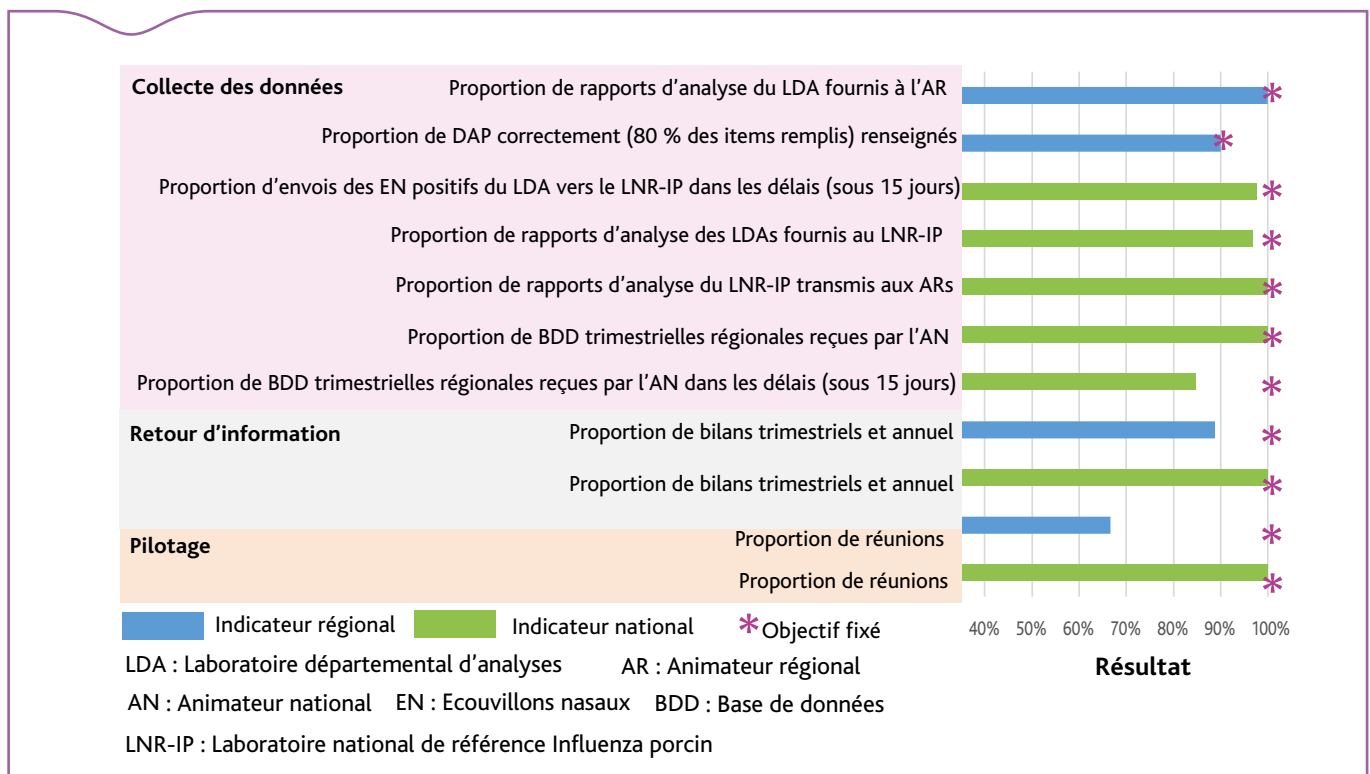


Figure 1. Indicateurs de fonctionnement de Résavip ayant un objectif défini. LDA: Laboratoire départemental d'analyses, AR: Animateur régional, AN: Animateur national, EN: Ecouvillons nasaux, BDD: Base de données, LNR-IP: Laboratoire national de référence Influenza porcine, DAP: Document d'accompagnement de prélèvement

## Élevages visités

En 2016, 309 visites ont été réalisées dans 267 élevages, situés dans douze régions et 28 départements, par 78 vétérinaires volontaires (Figure 2). Le nombre de régions investiguées est similaire aux trois années précédentes mais le nombre de départements concernés a légèrement augmenté. Le nombre de visites a augmenté d'environ 10 % (276 en 2013, 271 en 2014 et 286 en 2015), bien qu'une baisse de presque 10 % des visites réalisées en Bretagne ait également été enregistrée. Le nombre de visites a en effet plus que doublé en Aquitaine, dans le Nord-Pas-de-Calais et en Normandie. Vingt-quatre élevages ont été visités chaque mois en moyenne, comme précédemment (23 visites par mois en moyenne en 2013, 2014 et 2015) (Hervé *et al.*, 2014; Garin *et al.*, 2015; Garin *et al.*, 2016).

Comme les années précédentes, la Bretagne, la Normandie et les Pays de la Loire sont les régions dans lesquelles il y a eu le plus de visites. Elles représentent respectivement 65,1 % (201/309), 11,7 % (36/309) et 7,4 % (23/309) des visites.

Deux-cent-trente-cinq élevages (76,1 % des visites) ont été visités une seule fois, tandis que 24 élevages ont été visités deux fois et sept l'ont été trois fois. Ces derniers représentaient respectivement 15,5 et 6,8 % des visites. Cette répartition est très similaire à celle de 2015. À noter que, contrairement aux deux dernières années, un élevage a été visité plus de trois fois.

Parmi les 309 visites, environ les trois quarts (73,5 %, 227/309) faisaient suite à un appel de l'éleveur pour un syndrome grippal, environ 23 % (70/309) ont été réalisées lors d'une visite de routine et 4,5 % (12/309) ont eu lieu sans que le contexte ne soit précisé. Comme pour les années précédentes, ces visites ont été effectuées principalement dans des élevages de type naisseur-engraisseur (NE) (70 %) mais aucune visite n'a été effectuée en 2016 dans des élevages de type post-sevreur, contrairement aux années précédentes. Les quatre types d'animaux ciblés (porcs en croissance, cochettes en quarantaine, truies gestantes et truies en maternité) ont été prélevés dans des proportions similaires aux années précédentes. Les prélèvements ont ainsi été principalement effectués sur des porcs en croissance (87,4 %). Dans moins de la moitié des cas (42 %), les animaux écouvillonnés avaient une température

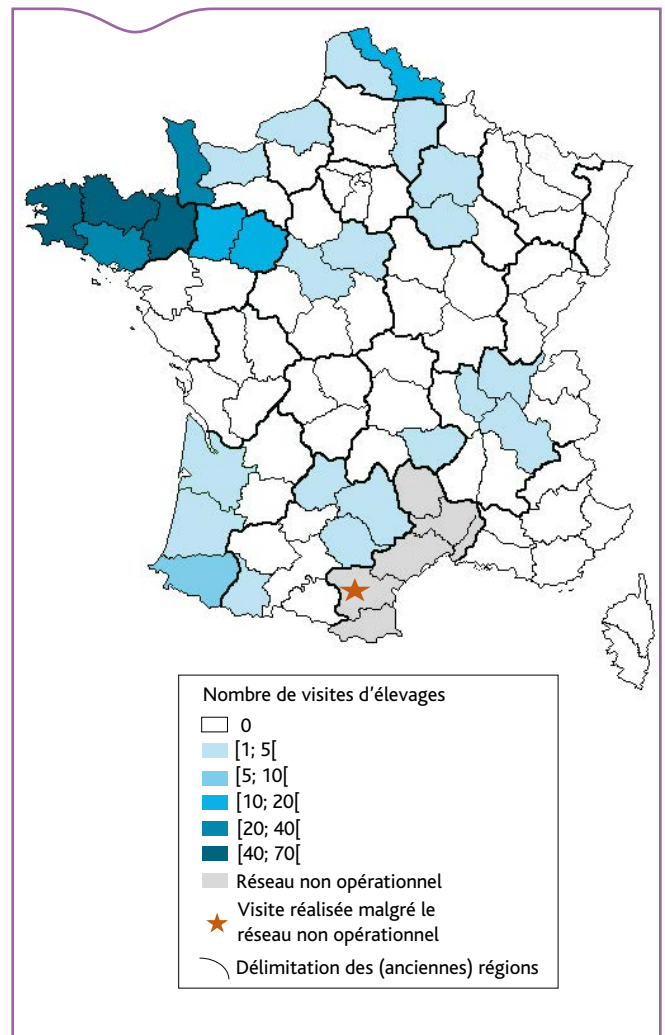


Figure 2. Répartition départementale des visites d'élevages réalisées dans le cadre de Résavip en 2016 (n=309)

## Encadré. Objectifs et organisation générale de Résavip

### Objectifs du réseau

Résavip poursuit trois objectifs: i) améliorer les connaissances virologiques et épidémiologiques sur les virus influenza porcins (VIP) affectant les élevages porcins, ii) assurer un suivi continu de ces VIP, pour être réactif et avoir une action ciblée en cas de besoin et iii) pouvoir communiquer de manière appropriée grâce à l'acquisition de connaissances fiables, notamment en cas de nouvel épisode sanitaire d'importance ou d'émergence de nouvelles souches virales. En effet, les VIP ont un impact sanitaire et économique important en santé animale (Fablet *et al.*, 2013) et peuvent aussi avoir un impact en santé humaine de par leur potentiel zoonotique (Simon, 2010).

Pour répondre à ces objectifs, la surveillance est de type événementiel (passif) et permet d'approcher la diversité et la dynamique des VIP sur le territoire métropolitain. Elle vise également à détecter, le plus rapidement possible, de nouveaux variants.

### Organisation générale

Une suspicion clinique de grippe est établie suite à l'observation d'un syndrome grippal (hyperthermie, abattement, prostration, apathie, étournelements ou toux) dans un groupe d'animaux au cours d'une visite dans un site d'élevage porcin. Lors d'une telle suspicion, le vétérinaire participant au réseau effectue un écouvillonnage nasal individuel sur trois porcs d'une même bande, présentant si possible une température rectale égale ou supérieure à 40,5°C. Le site d'élevage, ci-après dénommé élevage, est identifié par un indicatif de marquage unique et est considéré comme un « cas » positif (atteint de grippe au moment de la visite) si au moins un des trois écouvillons contient du génome de virus influenza A. Les virus détectés sont ensuite soumis à d'autres analyses pour identification du sous-type et du lignage d'appartenance.

Le dispositif a la particularité d'être un réseau de surveillance d'un danger sanitaire non réglementé et d'être organisé au niveau national, avec un déploiement opérationnel en région. Chaque animateur régional (AR) gère une base de données et des kits de prélèvement en lien avec le service régional de l'alimentation (SRAL) et l'un des laboratoires départementaux d'analyses agréés (LDA) par la DGAL. Il distribue les kits à des vétérinaires volontaires (VV) ayant recueilli l'accord de l'éleveur pour investiguer des suspicions de grippe, tout en garantissant son anonymat (levé en cas de besoin).

Les prélèvements trouvés positifs en analyse de première intention (RT-PCR gène M) par le LDA sont ensuite adressés au laboratoire national de référence Influenza porcin (LNR-IP), aux fins d'identification du sous-type et du lignage d'appartenance des virus détectés. Le réseau est coordonné au niveau national par Coop de France.

L'implication des AR et VV est bénévole et le financement des kits de prélèvements et des analyses de laboratoires de 1<sup>re</sup> intention est supporté par la DGAL. Celui lié aux analyses de 2<sup>e</sup> intention est pris en charge par l'Anses. Les analyses de laboratoires sont donc gratuites pour l'éleveur et les actes liés à l'écouvillonnage ne lui sont pas facturés.

Les virus influenza porcins constituent une des thématiques de la Plateforme ESA. Le groupe de suivi dédié (GS-VIP) assure un appui scientifique et technique au réseau.

Pour plus de détails sur le fonctionnement de Résavip, consulter le *Bulletin Épidémiologique* 63 de septembre 2014 (<http://bulletinepidemiologique.mag.anses.fr/sites/default/files/BEP-mg-BE63-art3.pdf>).

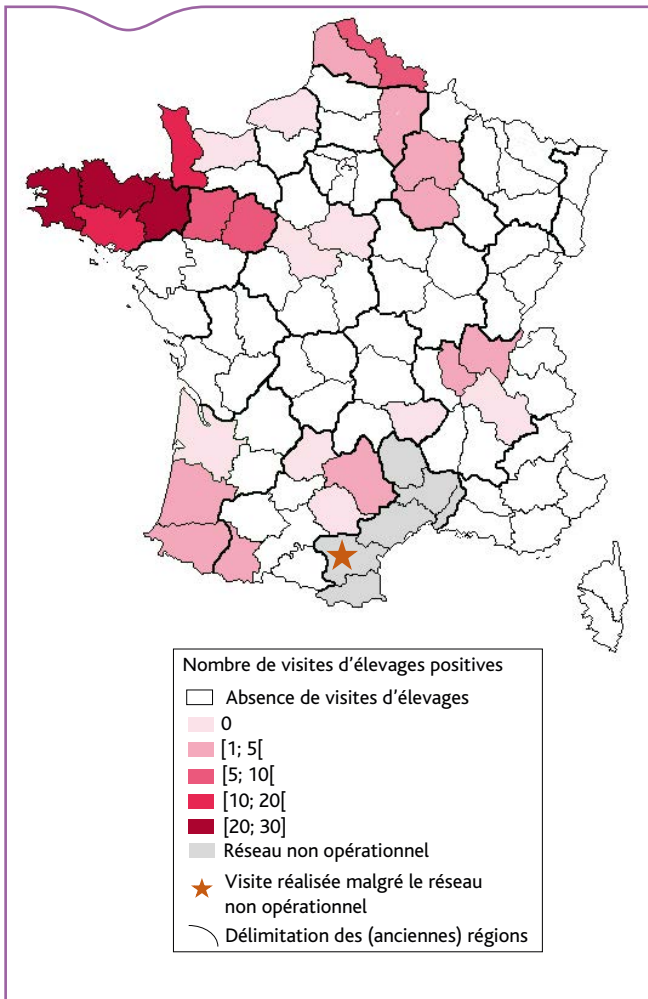


Figure 3. Répartition géographique des visites d'élevages ayant permis de détecter des VIPs dans le cadre de Résavip en 2016 (n=138)

Tableau 1. Distribution des VIPs détectés en 2016 en fonction de leur nature (sous-type et lignage génétique) (n=138)

Sous-type viral	Lignage génétique	Nombre de cas	Proportion (%)
H1N1	H1 <sub>av</sub> N1	65	47,1
	rH1 <sub>hu</sub> N1	0	0
	H1N1pdm	8	5,8
H1N2	H1 <sub>hu</sub> N2	12	8,7
	H1 <sub>hu</sub> N2v	2	1,4
	rH1 <sub>av</sub> N2	1	0,7
H3N2	H3N2	1	0,7
Mélanges	H1 <sub>av</sub> /H1 <sub>hu</sub> /N2	1	0,7
	H1 <sub>av</sub> /H1 <sub>hu</sub> /N1	2	1,4
	H1 <sub>av</sub> /H1 <sub>hu</sub> /N1/N1pdm	1	0,7
	H1 <sub>av</sub> /H1pdm/N1/N1pdm	1	0,7
	H1 <sub>av</sub> /H1pdm/N1pdm	1	0,7
	H1 <sub>av</sub> /H1 <sub>hu</sub> /N1/N2 (H1 <sub>av</sub> N1+H1 <sub>hu</sub> N2)	2	1,4
	H1pdm/H1 <sub>hu</sub> /N1pdm/N2 (H1 <sub>hu</sub> N2+H1N1pdm)	1	0,7
<b>Sous-total</b>		<b>98</b>	<b>71</b>
Virus non identifiés	Sous-types indéterminés (H?N?) et partiellement indéterminés (ex: H?N1, H?N2, H1 <sub>av</sub> N?, H1 <sub>hu</sub> N?)	40	29
<b>Total</b>		<b>138</b>	<b>100</b>

rectale supérieure à 40,5°C (spécification du protocole). Cette valeur est semblable à celles de 2013 (49 %) et 2014 (47 %) tandis qu'elle était de 53 % en 2015. Cependant, 91,8 % des animaux avaient une température supérieure à 40°C (89,5 % en 2013, 81,2 % en 2014 et 87,6 % en 2015). Environ un tiers (31,3 %) des élevages visités suivait un programme de vaccination contre la grippe appliqué aux cochettes et/ou aux reproducteurs.

### Élevages positifs

Un peu moins de la moitié (44,7 %) des visites ont permis de détecter la présence de VIP. Cette valeur est légèrement inférieure à celles obtenues précédemment (48,4 % en moyenne). Ces 138 visites « positives » se sont réparties tout au long de l'année, dans 127 élevages de tous types (excepté de type post-sevreur) situés dans 19 des 28 départements investigués (12 régions) (Figure 3). Parmi ces visites, 35 cas (25,4 %) correspondaient à des visites multiples (mêmes élevages visités plusieurs fois) avec la répartition suivante: quatorze élevages ont été trouvés positifs une fois (14 cas), neuf élevages deux fois (18 cas), et un élevage trois fois (3 cas). La grippe était qualifiée de récurrente dans 48,1 % des cas (62/129). Cette proportion est légèrement supérieure aux trois années précédentes (42,2 %). C'est le même constat pour l'intensité des signes cliniques, jugée élevée dans 29,5 % des cas, contre 23,1 % en 2013, 21,7 % en 2014 et 23,7 % en 2015.

### Virus identifiés et répartition géographique

Les VIPs détectés ont été identifiés dans 71 % (98/138) des cas (Tableau 1). À l'inverse, 29 % (40/138) des virus n'ont été que partiellement ou pas sous-typés, ce qui représente une hausse de 5 à 7 % des sous-typages infructueux par rapport aux années précédentes. Le succès des analyses de seconde intention dépend notamment des sensibilités des diverses méthodes de détection et de caractérisation moléculaire, ainsi que des isollements viraux lorsque les génomes viraux sont présents en quantités limitantes dans les échantillons biologiques. En 2016, davantage de souches non typables directement à partir des surnageants d'écouillons nasaux n'ont pas pu être amplifiées en culture cellulaire, comparativement aux années précédentes. Ceci pourrait être lié à la qualité des prélèvements réceptionnés par le LNR-IP. L'absence de viabilité des particules virales n'est pas liée à une quelconque dérive dans les délais d'acheminement entre les différents acteurs.

Parmi les virus identifiés, le virus *avian-like swine* H1<sub>av</sub>N1 est celui qui, comme les années précédentes, a été le plus fréquemment détecté (66 %, 65/98) (Figure 4). Le virus *human-like reassortant swine* H1<sub>hu</sub>N2 a été détecté dans 12 % (12/98) des cas, en Bretagne et dans le Nord-Pas-de-Calais. Les deux autres virus enzootiques européens ont été identifiés de façon sporadique: le virus *human-like reassortant swine* H3N2 a été détecté une seule fois en Nord-Pas-de-Calais (département du Nord), le virus H1N1pdm a été identifié dans huit cas situés dans le Sud-Ouest, le Grand-Ouest et l'Est du pays. Ces différents types de virus sont considérés comme enzootiques à l'échelle européenne dans la population porcine (Simon *et al.*, 2014). Le virus *human-like reassortant swine* H1<sub>hu</sub>N2<sub>Δ146-147</sub> a quant à lui été détecté une fois en Bretagne et en Normandie alors qu'il représentait 12 % (13/109) des cas en 2015.

En 2016, un seul virus rH1<sub>av</sub>N2 a été identifié dans le Nord-Pas-de-Calais. Neuf mélanges viraux (9 %, 9/98) ont été détectés en Aquitaine, en Bretagne, en Normandie et dans le Nord-Pas-de-Calais. C'est la première fois qu'autant de mélanges viraux sont détectés par Résavip.

## Conclusion

Comme les années précédentes, la surveillance événementielle menée par Résavip en 2016 montre que des syndromes grippaux ont lieu tout au long de l'année et touchent toutes les catégories d'animaux et tous les stades physiologiques. Les caractéristiques des animaux prélevés sont similaires depuis 2011. L'augmentation de 10 % du nombre de

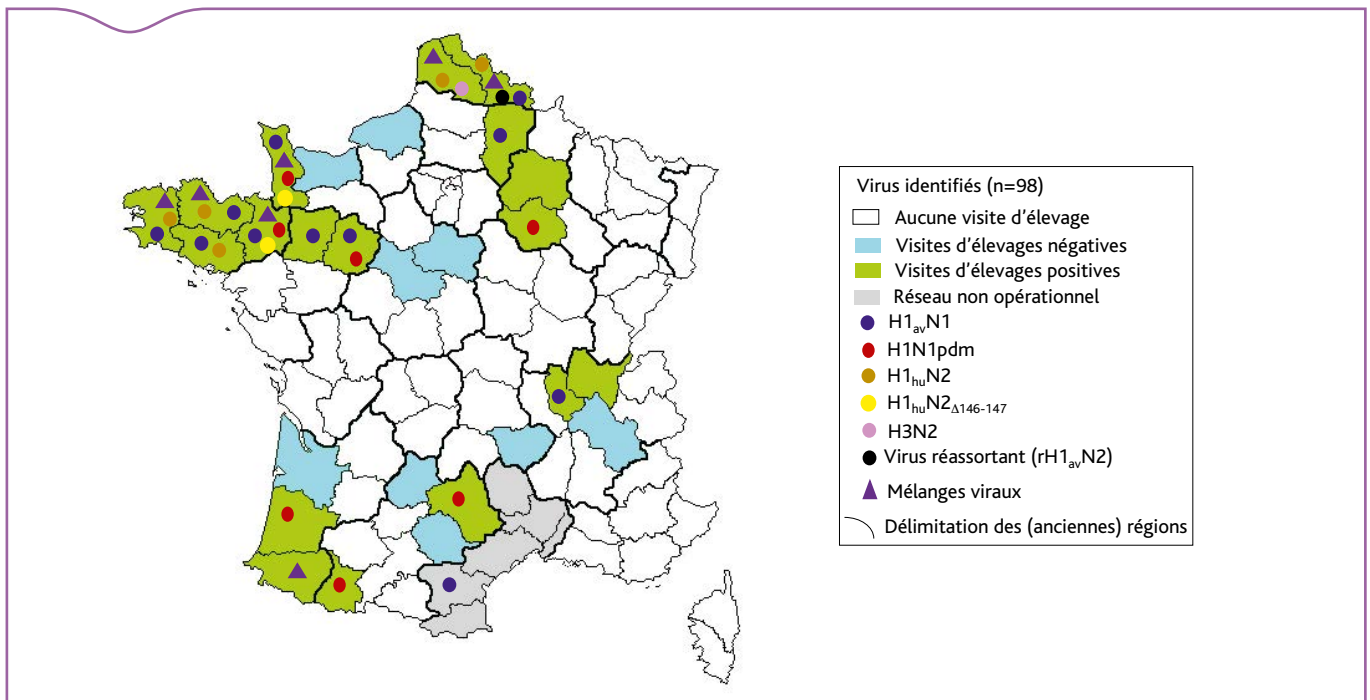


Figure 4. Répartition géographique des VIPs identifiés par Résavip en 2016

visites pourrait être liée à une meilleure réactivité du réseau et/ou à des syndromes grippaux plus intenses ou plus fréquents par rapport aux années précédentes. Cependant, il faut noter que la proportion d'élevages positifs a un peu diminué (par rapport à 2014 et 2015). Cela pourrait être lié à l'augmentation de la proportion de porcs prélevés avec une température inférieure à 40,5°C.

En 2016 comme depuis plusieurs années, le virus H1<sub>av</sub>N1 est celui qui a été le plus fréquemment identifié, suivi du virus H1<sub>hu</sub>N2. Les virus H3N2, H1N1pdm, H1<sub>hu</sub>N2<sub>Δ146-147</sub> ont été détectés de façon sporadique. Des situations nouvelles ont été observées dans le cadre du réseau. En effet, les virus H1<sub>hu</sub>N2 et rH1<sub>av</sub>N2 ont été identifiés pour la première fois en Nord-Pas-de-Calais. Également, le virus H1N1pdm a été détecté en Champagne-Ardenne ainsi qu'en Bretagne en mélange avec le virus H1<sub>hu</sub>N2. Plusieurs autres mélanges viraux ont été identifiés de façon occasionnelle dans diverses régions, mais de manière plus fréquente qu'au cours des années précédentes, illustrant une fois encore les co-circulations virales favorables à l'apparition de nouveaux virus réassortants. Les souches virales détectées depuis la mise en place du réseau peuvent avoir un impact sanitaire et économique plus ou moins important dans les élevages où elles circulent, mais ne constituent pas un risque collectif significatif pour le cheptel français. À ce jour, ces souches ne présentent pas non plus, *a priori*, de risque plus élevé que d'ordinaire pour la santé humaine.

Après cinq ans d'activité, l'implication et la réactivité des acteurs de Résavip se sont encore améliorées et permettent d'assurer une activité dynamique. Cependant, certaines actions de sensibilisation collectives ou individuelles devront être mises en œuvre afin de continuer à améliorer le fonctionnement. En effet, les départements visités représentaient 55,7 % des élevages porcins métropolitains<sup>(2)</sup> et l'absence (ou le très faible nombre) de prélèvements dans certaines régions, depuis plus de cinq ans, limite toujours les connaissances produites par le réseau. Des améliorations fonctionnelles (identifiées grâce à une enquête auprès des acteurs locaux) liées en particulier à la gestion des kits de prélèvements, pourraient être mises en place courant 2017 afin d'améliorer l'activité notamment dans les régions

n'ayant pas (ou peu) eu de prélèvements. Enfin jusqu'à présent, les indicateurs régionaux sont calculés de façon anonyme et globalisée. Un tableau de bord régional pourrait être mis en place ce qui permettrait à chaque acteur de mieux suivre son activité.

## Remerciements

Tous les acteurs de Résavip (animateurs régionaux, éleveurs, vétérinaires volontaires, laboratoires d'analyses vétérinaires agréés, SRAL et le personnel du LNR-IP) sont remerciés pour leur implication.

## Références bibliographiques

- Fablet C., Simon G., Dorenlor V., Eono F., Gorin S., Quéguiner S., Madec F., Rose N., 2013. Different herd level factors associated with H1N1 or H1N2 influenza virus infections in fattening pigs. *Prev. Vet. Med*, 112, 257-265.
- Garin E., Hervé S., Rose N., Locatelli C., Lecarpentier L., Ngwa-Mbot D., Wendling S., Bournez L., Calavas D., Simon G., 2016. Réseau national de surveillance des virus *influenza* chez le porc (Résavip) – Bilan de la surveillance menée en 2015. *Bull Epid Santé Anim Alim*, 75, 16-19.
- Garin E., Hervé S., Rose N., Marcé C., Simon G., 2015. Réseau national de surveillance des virus *influenza* chez le porc (Résavip) – Bilan de la surveillance menée en 2014. *Bull Epid Santé Anim Alim*, 72, 31-34.
- Hervé S., Garin E., Rose N., Marcé C., Simon G., 2014. Réseau national de surveillance des virus *influenza* chez le porc (Résavip) – Résultats des trois premières années de fonctionnement. *Bull Epid Santé Anim Alim*, 63, 10-14.
- Simon G., 2010. Le porc, hôte intermédiaire pour l'apparition de virus *influenza* réassortants à potentiel zoonotique. *Virologie* 14, 407-422.
- Simon G., Hervé S., Rose N., 2013. Epidémiologie de la grippe chez le porc en France entre 2005 et 2012 : Dispositifs, virus détectés et données épidémiologiques associées. *Bull Epid Santé Anim Alim*, 56, 17-22.
- Simon G., Larsen L.E., Dürrwald R., Foni E., Harder T., Van Reeth K., Markowska-Daniel I., Reid S.M., Dan A., Maldonado J., Huovilainen A., Billinis C., Davidson I., Agüero M., Vila T., Hervé S., Breum S.Ø., Chiapponi C., Urbaniak K., Kyriakis C.S., ESNIIP3 consortium, Brown I.H., Loeffen W., 2014. European surveillance network for *influenza* in pigs: surveillance programs, diagnostic tools and swine *influenza* virus subtypes identified in 14 European countries from 2010 to 2013. *PLoS One*, 9(12):e115815.

(2) Source BD Porc 2016



**Directeur de publication:** Roger Genet

**Directeur associé:** Patrick Dehaumont

**Comité de rédaction:** Didier Boisseleau, Anne Brisabois, Corinne Danan, Benoît Durand, Françoise Gauchard, Pascal Hendrikx, Paul Martin, Elisabeth Repérant, Sylvain Traynard

**Rédacteur en chef:** Didier Calavas

**Rédactrice en chef adjointe:** Anne Bronner

**Éditeur scientifique:** Julien Cauchard

**Responsable d'édition:** Fabrice Coutureau

**Assistante d'édition:** Céline Leterq

**Anses** - [www.anses.fr](http://www.anses.fr)

14 rue Pierre et Marie Curie

94701 Maisons-Alfort Cedex

**Courriel:** [bulletin.epidemio@anses.fr](mailto:bulletin.epidemio@anses.fr)

**Conception et réalisation:** Parimage

**Crédits photos:** Anses, Parimage

**Impression:** Bialec

23 Allée des Grands Pâquis - 54180 Heillecourt

**Tirage:** 3 500 exemplaires

**Dépôt légal à parution/ISSN 1630-8018**

