

Alors que la grippe aviaire est devenue un grand sujet d'actualité en cette fin d'année 2005 et que les compétences dans ce domaine en particulier en matière d'appui scientifique et technique et d'évaluation des risques ont été largement mobilisés, l'article ci-après rappelle que les dispositifs de surveillance et les moyens qui leurs sont associés sont et doivent être indépendants de ces contingences et doivent s'inscrire dans une logique de production de connaissances sur le long terme. Il est d'ailleurs très intéressant et très important de pouvoir disposer de

tels résultats aujourd'hui, afin de mettre en perspective les données publiées à travers le monde ces derniers mois. Le travail des gestionnaires du risque en sera d'autant facilité.

Des données actualisées sur la grippe aviaire sont consultables sur les sites Internet : www.afssa.fr et www.agriculture.gouv.fr. Un numéro vert 0 825 302 302 (0,15 € la minute) «Info/grippe aviaire» a également été mis en place par le ministère de la Santé.

RÉSULTATS DE L'ENQUÊTE INFLUENZA RÉALISÉE EN FRANCE DANS LES ÉLEVAGES DE VOLAILLES EN 2004

Véronique Jestin (1) et Joel Francart (2)

(1) Laboratoire National de Référence pour l'*influenza* aviaire et la maladie de Newcastle (LNR), Unité Virologie Immunologie Parasitologie aviaires et cunicoles, Afssa-site de Ploufragan

(2) Bureau de la santé animale, DGAL

L'*influenza* aviaire (AI) est une infection des oiseaux par des *Influenzavirus* de type A, pouvant appartenir à tous les sous-types actuellement connus (associant une multitude de combinaisons des 16 « espèces » d'hémagglutinines : H1-16 et des 9 « espèces » de neuraminidase : N1-9 répertoriées). Cette infection peut être inapparente, comme c'est généralement le cas chez les oiseaux sauvages aquatiques (réservoirs) et chez des espèces de volailles très résistantes cliniquement (comme le canard). En fonction de l'espèce touchée, de l'âge des oiseaux etc., et de la virulence du virus impliqué, l'infection AI peut s'exprimer cliniquement chez les volailles domestiques, depuis des formes très modérées (atteinte respiratoire limitée à l'étage supérieur, simple chute de ponte) jusqu'aux formes très sévères (forte mortalité, lésions hémorragiques généralisées) responsables d'importantes pertes économiques. Ces dernières formes ont jusqu'à présent toutes été imputables à des virus AI de sous-types H5 ou H7 hautement pathogènes (HP) et, dans la plupart des cas, ont été précédées pendant quelques semaines à quelques mois, d'une circulation inapparente dans les élevages de volailles, de virus faiblement pathogènes (LP).

A ce risque majeur en santé animale est de plus associée une préoccupation de santé publique, compte tenu des possibilités d'infection directe de l'homme par des virus aviaires HP et surtout des possibilités i) de réassortiment viral entre virus provenant d'espèces différentes et ii) d'émergence de nouveaux virus avec un potentiel zoonotique redoutable.

Suite aux épizooties survenues ces 5 dernières années en Europe et dans le monde, les gestionnaires du risque se sont interrogés sur les moyens de mise en oeuvre d'une prévention plus efficace, justifiée en terme de coût/bénéfice et fondée sur une éradication. En effet, la seule surveillance passive reposant sur une manifestation clinique de l'infection était insuffisante pour détecter une circulation inapparente de virus. C'est dans cet esprit que la Commission européenne a imposé dès 2002 aux Etats membres la réalisation d'enquêtes sérologiques visant à détecter la présence d'infections inapparentes des volailles par des virus de sous-types H5 et/ou H7. Parallèlement la Commission a aussi encouragé des investigations virologiques visant les espèces d'oiseaux sauvages réservoirs en vue de prévoir les implications en santé animale et publique pour pouvoir mieux les maîtriser.

La Commission européenne a décidé de renouveler en 2004 les enquêtes sérologiques ciblant les infections à virus AI H5 et H7 chez les volailles et les recherches relatives à la présence des virus *influenza* dans l'avifaune sauvage. Concernant les volailles, les enquêtes sérologiques de l'année 2004 étaient organisées dans le double contexte de la réforme du chapitre du code de l'OIE relatif à l'*influenza* aviaire et du remplacement de la directive 92/40/CEE du Conseil du 19 mai 1992 établissant des mesures communautaires de lutte contre l'*influenza* aviaire. De plus, en cas de résultats positifs, l'Etat membre concerné devait rapporter les mesures prises à son initiative pour appréhender et maîtriser la situation sanitaire. Enfin, en raison de résultats positifs mis en évidence au cours de la précédente enquête dans les élevages de canards prêts à gaver (11,6 %¹ s'étaient révélés sérologiquement positifs lors de l'enquête précédente de 2002-03), une étude virologique a été mise en place pour déterminer les caractéristiques des souches virales circulant dans cette production. Les résultats obtenus en France au travers de ces approches complémentaires, font l'objet du présent article et sont mis en perspective par rapport aux données françaises antérieures et aux données européennes actuelles.

I. PROTOCOLE D'ENQUÊTE²

1.1 Enquête sérologique

Conformément à la décision de la Commission 2004/111/CE du 29 janvier 2004 modifiée par la décision 2004/615/CE du 23 juillet 2004, le protocole d'enquête sérologique retenu pour les élevages français de volailles devait tenir compte des critères suivants : risques de contamination des élevages, sensibilité de certaines espèces de volailles, couverture suffisante des différents bassins d'élevage français et paramètres précis d'échantillonnage. Pour ces raisons, l'enquête a concerné les productions avicoles et les nombres d'élevages listés dans la partie II (tableau 2).

Concrètement, la moitié des prélèvements a été réalisée en élevage après un ciblage réalisé au préalable par chaque direction départementale des services vétérinaires (DDSV) en fonction de certains facteurs de risque (tableau 1) :

1/ risque de contamination par la faune sauvage : il s'agissait des élevages avec un parcours plein air, ou de ceux situés à proximité d'une aire de rassemblement d'oiseaux sauvages.

2/ risque de persistance ou de circulation virale : il s'agissait des élevages rassemblant des bandes d'âges multiples ou plusieurs espèces aviaires, d'élevages de volailles à long cycle de vie, et enfin d'élevages situés en zone de forte densité de population avicole (carte 1).

Les dindes présentant une sensibilité particulière au virus, toutes leurs formes de production y compris en claustration, ont été prises en compte.

En ce qui concerne la période de prélèvements, ceux-ci ont été réalisés essentiellement en novembre et décembre 2004 dans les productions plein air, alors qu'ils ont été davantage étalés avec une collecte ayant démarré au cours de la 1ère moitié du printemps 2004 pour les productions à durée de vie longue (reproducteurs et pondeuses). Le nombre de prises de sang était de 40 par élevage dans les productions canards et oies et se limitait à 10 par élevage dans les autres productions.

	nombre d'élevages enquêtés	Facteurs de risque relevés				
		élevages en plein air	proximité aire de rassemblement d'oiseaux sauvages	"forte" densité d'élevages avicoles	âges multiples dans le même élevage	plusieurs espèces d'oiseaux présentes dans le même élevage
poulets plein air	197	100%	19%	48%	21%	28%
volailles pour le marché local	70	57%	13%	33%	57%	80%
poules pondeuses âges multiples	38	8%	3%	8%	100%	8%
poules pondeuses plein air	123	100%	40%	60%	15%	5%
dindes chair bâtiments	165	0%	13%	40%	10%	12%
dindes plein air	77	100%	25%	49%	29%	47%
dindes reproductrices	82	0%	2%	29%	1%	0%
autruches	23	100%	0%	0%	13%	9%
canards PAG	78	100%	23%	37%	67%	26%
canards "haut risque"	30	100%	23%	60%	90%	10%
canards reproducteurs	60	0%	3%	78%	40%	2%
oies	47	100%	4%	40%	28%	21%
Total	990	62%	17%	44%	30%	21%

Tableau 1 : facteurs de risque relevés dans les élevages enquêtés en France en 2004

1.2 Enquête approfondie (sérologique et virologique) chez les canards prêts à gaver

Dans chacun des 30 élevages de canards prêts à gaver (PAG) sélectionnés du fait de leur exposition à plusieurs des facteurs de risque mentionnés en 1.1, 3 séries (de chacune 30 écouvillons cloacaux) ont été réalisées aux âges de 4, 8 et 12 semaines respectivement et stockés à -70 °C dans l'attente des résultats sérologiques obtenus à partir de prises de sang (40 par élevage) pratiquées à l'âge de 12 semaines; des recherches virales³ ont été effectuées à partir des écouvillons provenant des lots séropositifs à 12 semaines. Tous les prélèvements de cette étude ont été collectés entre novembre 2004 et janvier 2005

1.3 Compléments d'enquête dans les élevages détectés positifs à l'issue des étapes 1.1 et 1.2 précitées

Dès que les résultats obtenus en 1.1 ou 1.2 apportaient les preuves d'infection (ou laissaient suspecter une infection) par des virus de sous-types H5 et/ou H7 des élevages, dans chacun d'entre eux, de nouvelles prises de sang et des écouvillons cloacaux ont été réalisés sur les mêmes bandes lorsqu'elles étaient encore présentes ou sur la bande suivante; de plus, ont été menées en parallèle une inspection clinique des volailles de ces élevages par un vétérinaire sanitaire et une enquête par les services vétérinaires visant à identifier la source possible et les liens éventuels avec d'autres élevages. En cas de doute quant à une possible infection persistante⁴, ces investigations ont pu être renouvelées ou étendues à d'autres bandes ou d'autres productions de volailles présentes simultanément dans ces élevages.

Au total 1000 élevages, 22550 sérums, 3570 écouvillons, ont été prélevés dans 33 départements.

II. RÉSULTATS OBTENUS :

Les résultats des analyses sérologiques sont reportés dans le tableau 2 suivant :

Types d'élevages ciblés	Nombres d'élevages prélevés	Nombre d'élevages séropositifs ^a
Poulets élevés en plein air (>4 semaines de plein air)	197	0
Pondeuses élevées en plein air ou en bandes d'âges multiples (>8 semaines de ponte)	161	0
Volailles (dindes poules poulets les plus âgés) destinées au marché local (élevages multi-espèces ou à bandes multiples)	70	0
Dindes élevées en plein air (>5 semaines de plein air)	77	1 (sous-type H5)
Dindes chair élevées en bâtiment (>8 semaines d'élevage)	165	0
Dindes reproductrices (dans leur 2 nd e moitié de ponte)	82	0
Autruches (abattoir exclusivement)	23	0
Canards reproducteurs (>1 mois de ponte)	60b	14 dont 2 douteux ^c (sous-type H5)
Canards prêts à gaver (PAG) (>10 semaines d'élevage)	88	3 (sous-type H5) et 1 douteux ^c (sous-type H7)
Canards PAG cumulant plusieurs facteurs de risque d	30	8 (sous-type H5)
Oies	47	2 (sous-type H5)
Total	1000	29 (dont 2 douteux sous-type H5 et 1 douteux / sous-type H7)

Tableau 2 : résultats des analyses sérologiques

- a : au moins un sérum positif vis à vis d'un des sous-types H5 ou H7
- b : 30 prélevés au printemps et 30 prélevés en automne
- c : résultat douteux car un seul sérum positif avec un titre le plus faible (juste au seuil de positivité)
- d : voir enquête détaillée au point 1.2

Parmi les 775 élevages d'espèces autres que les palmipèdes, seul un élevage de dindes plein air s'est révélé sérologiquement positif vis à vis des virus de sous-types H5. Ces dindes n'ont montré aucun symptôme ; l'enquête ultérieure réalisée par les agents des services vétérinaires a permis de préciser que ces dindes avaient été élevées dans leurs premières semaines de vie au contact de canards qui se sont eux-mêmes révélés sérologiquement positifs H5 mais à partir desquels aucun *influenzavirus* n'a été isolé ; par ailleurs les autres espèces présentes dans cet élevage ont également été séro (H5)- et viro (*influenzavirus*)- négatives. 28 élevages se sont révélés positifs ou douteux au plan sérologique sur les 225 élevages de palmipèdes prélevés.

Sur les 88 élevages de canards PAG, 3 élevages se sont révélés sérologiquement positifs H5 et 1 s'est révélé douteux vis à vis du sous-type H7. Lors de la réalisation de prélèvements et des enquêtes complémentaires, aucun symptôme n'a été observé sur les animaux. Les sérologies complémentaires n'ont pas mis en évidence d'anticorps vis à vis des virus de sous-types H5/H7 (selon le cas) dans 3 élevages sur 4 et dans le 4ème, les recherches virologiques n'ont pas permis de mettre en évidence de virus de sous-types H5, par contre un virus de sous type H6N8 caractérisé comme faiblement virulent (indice de pathogénicité par voie intraveineuse nul) a été isolé.

Sur les 30 élevages de canards PAG cumulant plusieurs facteurs de risque, 8 élevages ont présentés des résultats sérologiques positifs par rapport au sous-type H5. Les recherches virologiques ont permis d'isoler dans 4 de ces élevages, 4 souches de virus *influenza* de sous-type H5 : une souche de sous-type H5N3, deux souches de sous-type H5N2, et une souche de sous-type H5N1. De plus dans un de ces élevages deux virus de sous types H6N2 et H11N9 ont été également isolés alors que dans 2 autres des 4 élevages restants, deux virus de sous types H6N2 et H6N8 ont été isolés respectivement. Toutes ces souches présentaient un IPIV (indice de pathogénicité par inoculation intraveineuse) égal à zéro, de plus les 4 virus de sous-types H5 possédaient un motif de clivage de leur hémagglutinine caractéristique des souches faiblement pathogènes. Trois isolats de paramyxovirus de type 1 aviaires avirulents ont par ailleurs été isolés, dont 2 dans les élevages *influenza* virus positifs précités. Aucun symptôme n'a été observé et lors des enquêtes complémentaires effectuées sur les bandes suivantes, aucune souche du sous-type H5 n'a pu être à nouveau isolée ; néanmoins 6/8 des élevages étaient encore séropositifs H5 et des *influenzavirus* [de sous-types H2N3, H6N1, H6N2 et H4(sous réserve de confirmation N6)], tous caractérisés comme faiblement pathogènes, ont été isolés de 5 élevages sur 8.

Sur les 60 élevages de canards reproducteurs, 14 élevages (dont 13 prélevés au printemps, ce qui constitue une différence significative $p < 0.01$) ont montré au moins un sérum positif vis à vis des virus de sous-types H5. Aucun symptôme et en particulier aucune chute de ponte significative n'ont été observés dans les élevages.

Pour des raisons de logistique, les compléments d'enquête des 13 élevages identifiés positifs au printemps, n'ont pu être entrepris que plusieurs mois après les prélèvements initiaux et n'ont de ce fait pas nécessairement concerné la même bande. Quoiqu'il en soit, il n'a pas été retrouvé d'anticorps spécifiques des virus de sous-types H5 dans 8 élevages ni d'*influenzavirus* dans les 6 autres. De plus, pour un de ces derniers, les poulets plein air et oies également présents étaient séronegatifs H5.

Sur les 47 élevages d'oies prélevés, deux élevages conduits en plein air ont montré au moins un sérum positif vis à vis des virus de sous-types H5. Aucun symptôme n'a été observé. Lors des compléments d'enquête il n'a plus été retrouvé d'anticorps vis à vis des virus de sous-types H5 dans le premier élevage et dans le second, les recherches d'*influenzavirus* se sont révélées négatives.

Il faut noter que les prélèvements et visites qui ont pu être réalisés dans les élevages voisins des élevages séro ou viro positifs n'y ont pas mis en évidence la présence d'un virus *influenza* ou l'existence d'une pathologie.

III. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les résultats 2004 permettent d'une part d'enrichir les données sérologiques pré-existantes relatives aux productions françaises de poulets plein air, dindes chair, dindes reproductrices et canards gras, et d'autre part d'acquiescer des données pour les productions nouvellement enquêtées comme les dindes et pondeuses plein air ainsi que les pondeuses en bandes multiples, canards reproducteurs, autruches et oies. De plus, les résultats virologiques permettent de démontrer sans ambiguïté la réalité des infections révélées sérologiquement et de connaître les caractéristiques des virus en circulation.

A l'exception d'un résultat douteux, d'ailleurs non confirmé lors d'un prélèvement ultérieur, il est observé l'absence d'infection par des virus de sous-types H7, des volailles de toutes les productions considérées. Ce résultat confirme les données françaises pré-existantes (2001 à 2003) pour les productions déjà investiguées antérieurement et apporte des informations satisfaisantes sur les autres productions précitées nouvellement explorées ; en bref l'infection par des virus de sous-types H7 n'y est pas une préoccupation. Cette situation correspond aussi aux données européennes, à l'exception des Pays Bas atteints par une souche H7N7 en 2003 et de l'Italie qui depuis plusieurs années doit gérer des cas d'infection à virus de sous-types H7N1 puis H7N3, notamment dans sa filière dinde de chair, et de quelques cas ponctuels d'infections à virus de sous-types H7 chez les poulets plein air, oies et ratites dans 3 autres Etats membres.

En ce qui concerne les infections par des virus de sous-types H5 en France, il est observé / confirmé (selon qu'il s'agit de productions nouvellement investiguées ou non) qu'à l'exception des palmipèdes domestiques, l'infection par les virus de sous-types H5 est inexistante ou tout à fait sporadique. A nouveau, à l'exception des données relatives aux ratites, ce résultat corrobore des données européennes. En effet, 4 autres Etats membres déclarent en 2004 des infections par des virus de sous-types H5 dans leurs productions de canards et/ou d'oies, mais leurs pourcentages d'élevages positifs (0,5 à 1,3 %) est significativement inférieur ($p < 0,05$) à celui observé en France en 2004, toutes catégories de palmipèdes confondues (12,4%) même s'il convient d'être prudent sur l'interprétation à en donner, du fait de l'absence de précisions sur l'échantillonnage, le ciblage effectif ou non en fonction de facteurs de risque et les modalités d'analyses. Dans notre cas, du fait du ciblage réalisé, il n'est pas possible de calculer de façon fiable une prévalence d'infection.

Chez les canards prêts à gaver, le pourcentage apparent d'élevages séropositifs H5 (3 sur 88 soit entre 3 et 4 %) est inférieur à celui (11,6 %) observé l'année précédente. Cette différence peut tenir à la période de collecte des sérums (essentiellement en fin d'automne en 2004, essentiellement en fin d'hiver en 2003) de même qu'à la taille plus réduite de l'échantillon en 2004.

Cependant les 8 lots de canards prêts à gaver ayant fait l'objet d'investigations virologiques systématiques ont permis de montrer que cette production pouvait être fréquemment infectée de manière inapparente par des virus faiblement pathogènes (FP)5 (au sens réglementaire) appartenant à de multiples sous-types dont H5N1, H5N2 et H5N3. Nos études phylogénétiques ont montré que les gènes H5 de ces derniers virus étaient proches du gène H5 d'un isolat 2003 H5N2 (FP) provenant de poulets fermiers français mais plus distant de celui d'un isolat H5N3 (FP) 2002 provenant de canards prêts à gaver français. Néanmoins aucun des gènes H5 précités n'était regroupé avec les gènes des virus asiatiques (dont les H5N1 hautement pathogènes actuels et de 1997). Une étude phylogénétique complémentaire⁶ a pu montrer que les gènes H5 des isolats français (à l'exception de l'isolat H5N2 2002) étaient très proches des gènes H5 des virus italiens (H5N2) isolés de dindes en 2005. Par ailleurs, nos résultats suggèrent plutôt l'occurrence d'infections successives à partir de sources distinctes. Après chaque infection l'excrétion virale par les canards persiste moins de 4 semaines. Cependant, le maintien d'une séropositivité H5 dans les bandes suivantes suggère soit une infection à partir d'une nouvelle source, soit la persistance du virus initial dans l'environnement. De nouvelles études sont nécessaires pour éclaircir ce point et surveiller l'évolution possible de cette situation.

Dans la période d'enquête 2004, la présence de souches dites faiblement pathogènes de l'*influenza* aviaire n'a entraîné aucune mesure de police sanitaire particulière ; cependant, au titre des précautions qui doivent être prises vis à vis de tout

agent infectieux présentant un risque pour la santé animale et aussi dans la perspective de la nouvelle réglementation qui se préparait, a-t'il été recommandé à tous les éleveurs en charge des élevages qui se sont révélés positifs (pas seulement pour les élevages de canards prêts à gaver) de prendre toutes les dispositions permettant d'éviter la diffusion éventuelle du virus.

Chez les canards reproducteurs, il s'agit des premières données sérologiques positives représentatives et nous ne disposons pas du recul suffisant pour apprécier l'ancienneté de l'infection par des virus de sous-types H5 dans les élevages français, ni pour déterminer à quel(s) âge(s) l'infection se produit. Néanmoins le pourcentage très significativement supérieur ($p < 0,01$) d'élevages positifs au printemps suggère que l'infection puisse se produire dans le courant de l'hiver. La question de la persistance des virus au sein de cette production est posée. Il est prévu de renforcer la surveillance exercée sur cette production en 2005 au moyen d'une enquête exhaustive portant sur tous les élevages de canards reproducteurs et futurs reproducteurs de l'élevage sélection et multiplication ainsi que d'essayer de mieux cerner les facteurs de risque. A côté de cette surveillance sérologique, il est aussi primordial de pouvoir effectuer une surveillance virologique comparable à celle présentement décrite chez les canards PAG.

En ce qui concerne les ratites, nos résultats restent à vérifier, par une autre approche analytique (à savoir la mise en oeuvre d'emblée de tests d'inhibition de l'hémagglutination ciblant les sous-types H7 et H5. En effet, outre les résultats européens récents déjà mentionnés relatifs aux infections à virus H7, deux Etats membres signalent aussi des cas limités d'infections par des virus de sous-types H5. De plus, ces espèces sont réputées bien sensibles à l'infection par ces virus comme le confirme la récente épizootie d'*influenza* aviaire hautement pathogène en Afrique du Sud. Le maintien d'une surveillance active dans cette production est très recommandé.

Enfin le statut vis à vis des *influenzavirus* (H5/H7) de certaines productions françaises telles que les pintades, les cailles et le gibier à plume (faisans, perdrix, colverts etc..) reste à déterminer. Mais compte tenu des premiers résultats préoccupants sur les canards reproducteurs chair et gras, il semble prioritaire de faire porter les efforts sur cette filière.

RÉFÉRENCES

Anonyme : An interim report on surveys for avian *influenza* in poultry and wild birds in the EU Member States during 2004. Commission Européenne SANCO 10218/2005. Mai 2005.

Anonyme : *Influenza* aviaire hautement pathogène en Afrique du Sud. Informations sanitaires OIE, 22 octobre 2004. Vol. 17 n° 44 (2 pages).

Anonyme : Low pathogenic avian *influenza* (LPAI) in Italy (Lombardy Region). Commission Européenne SANCO 10269/2005 SCFAH 07-08. Juin 2005 (7 pages).

REMERCIEMENTS

Les auteurs adressent leurs chaleureux remerciements à tous les partenaires de ce projet, vétérinaires sanitaires, personnels des DDSV, du LDA 22 et de l'AFSSA-Ploufragan, notamment A. Schmitz, M. Cherbonnel-Pansart, C. Guillemoto, I. Pierre, J. Lamandé, A. Allée, K. Ogor, G. Le Gall-Reculé, Y. Morin, J.P. Picault.

1 Donnée publiée dans le Bulletin épidémiologique N°11 de décembre 2003

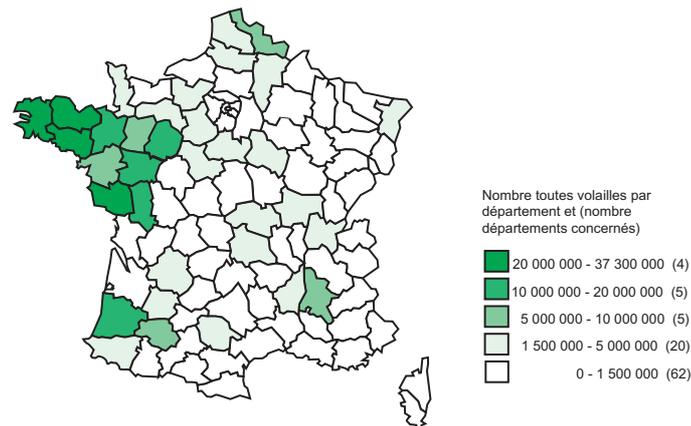
2 Le protocole a été élaboré sous l'autorité scientifique du LNR. Le protocole détaillé précisant notamment les techniques de diagnostic est disponible auprès de l'AFSSA - site de Ploufragan. En bref, pour toutes les productions listées (à l'exception des canards et oies) immunodiffusion en gélose puis inhibition de l'hémagglutination H5/H7 ; pour les canards et les oies, inhibition de l'hémagglutination H5/H7 directement

3 criblage par RT-PCR temps réel puis ovoculture et caractérisation complète des isolats

4 séropositivité confirmée sur la bande suivante par exemple

5 Ces isolats ont fait l'objet d'investigations poussées qui ont été présentées à la réunion annuelle des LNR européens (Bruxelles, Septembre 2005) et seront rapportées dans des revues de virologie.

6 Communication J. Banks (LCR, VLA Weybridge)



Carte 1 : Nombre de volailles toutes espèces confondues par département (données issues du recensement général de l'agriculture 2000)