

Anses  
Site de Ploufragan-Plouzané

# Journée Avicole et Cunicole d'Information et d'Echanges

Rapport d'activité 2015-2017



## Réunion d'information et d'échanges de l'Anses - Secteur avicole et cunicole -

9H30 Café d'accueil

10H00 Accueil des participants : G. Salvat, N. Eterradossi, J.E. Blochet

10H15 **Présentation des activités de l'Unité Epidémiologie et Bien-être en Aviculture et Cuniculture** (Sophie Le Bouquin)

- Etude des facteurs influençant le démarrage des poussins, une étape critique pour la santé et le bien-être des poulets de chair (Rozenn Souillard et Françoise Pol)

11H05 **Présentation des activités de l'Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins** (Marianne Chemaly)

- Attribution de source des campylobactérioses en France (Amandine Thépault)
- Développement d'un vaccin vis-à-vis de *Campylobacter* chez le poulet de chair par une approche innovante (Muriel Guyard)

11H55 **Présentation des activités de l'Unité Génétique Virale et Biosécurité** (Yannick Blanchard)

- Plateforme de séquençage haut débit de l'Anses: bilan d'activité sur 4 ans et apport à la filière (Yannick Blanchard)

12H30 Repas

13H45 **Présentation des activités de l'Unité Mycoplasmologie Bactériologie** (Isabelle Kempf)

- Travaux récents sur le syndrome des œufs à extrémité de verre et sur la détection des mycoplasmes aviaires (Anne Bouchardon)
- Apport du test Colispot dans la détection de la résistance à la colistine chez *E. coli* (Eric Jouy)

14H35 **Présentation des activités de l'Unité Virologie Immunologie et Parasitologie Aviaire et Cunicole** (Nicolas Eterradossi)

- Création d'un observatoire sur le portage d'helminthes en production avicole : Développement d'une méthode de dépistage (Jean-Michel Répérant)
- Travaux de recherche mis en place en lien avec les épizooties d'influenza aviaire 2015-2016 et 2016-2017 » (Eric Niqueux)

15H25 **Présentation des activités et programmes de rénovation du Service d'Elevage et d'Expérimentation Avicole et Cunicole** (Alassane Keita)

- Activités récentes du Service d'Elevage et d'Expérimentation Avicole et Cunicole (Alassane Keita)

16H00 Discussion générale

16H15 Remarques de conclusion



Le présent document décrit les travaux réalisés en 2016 et 2017 par le laboratoire de l'Anses Ploufragan Plouzané dans les domaines de l'aviculture et de la cuniculture.

En introduction, sont brièvement rappelées les missions du laboratoire, son organisation générale, ses moyens expérimentaux ainsi que les domaines dans lesquels il exerce une activité de référence et/ou accréditée, de même que les évolutions récentes ayant concerné ces différents aspects.

Les activités de recherche, d'appui technique et de référence sont ensuite présentées pour chaque unité de recherche ou service expérimental intervenant en aviculture et/ou cuniculture.

Comme lors des éditions précédentes et dans le but de conserver un format réduit à ce rapport d'activités avicoles et cunicoles, aucune liste de références bibliographiques n'est jointe au présent document. Cette liste sera néanmoins disponible sous forme électronique et les participants qui souhaiteraient la consulter peuvent en faire la demande auprès de la chargée de communication de l'Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané ([elisabeth.reperant@anses.fr](mailto:elisabeth.reperant@anses.fr)).

Que les responsables administratifs, les scientifiques, les partenaires de l'Anses, les professionnels, les industriels et les représentants des interprofessions qui ont bien voulu consacrer du temps à venir discuter nos résultats à l'occasion de cette « Journée Avicole et Cunicole d'Information et d'Echanges » et qui aident ainsi à orienter les travaux de l'Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, soient ici remerciés, de même que les collègues qui ont préparé ces comptes-rendus de leurs activités.



## Table des matières

Introduction.....	05
Organisation générale du laboratoire .....	07
Principales évolutions de l'Anses dans les domaines avicoles et cunicoles sur la période considérée .....	10
Unité Epidémiologie et Bien-Etre en Aviculture et Cuniculture .....	13
Unité Hygiène et Qualité Des Produits Avicoles et Porcins .....	23
Unité Génétique Virale et Biosécurité .....	30
Unité Mycoplasmologie Bactériologie.....	32
Unité Virologie Immunologie et Parasitologie Aviaire et Cunicole.....	40
Service d'Elevage et d'Expérimentation Avicole et Cunicole .....	55
Unité Epidémiologie et Bien-Etre du Porc .....	61



## Introduction

Le laboratoire de Ploufragan-Plouzané de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail (Anses Ploufragan/Plouzané) regroupe au sein d'une même entité administrative de l'Anses les activités consacrées à la pathologie virale des poissons conduites par une unité de recherche localisée à Plouzané (29) et les activités consacrées aux porc, volailles et lapin conduites par ses 7 autres unités de recherches et ses 2 services expérimentaux implantés sur le site du Zoopôle à Ploufragan, au sein de la Technopole de Saint Briec Armor (22).

Le Laboratoire réunit sur ses deux sites de Ploufragan et celui de Plouzané plus de 190 personnes. Il est spécialisé dans la santé des volailles, du lapin, des porcs et des poissons d'élevage. Il concourt à l'amélioration du bien-être des animaux ainsi qu'à la qualité sanitaire des denrées d'origine avicoles, cunicoles et porcines.

Le laboratoire de Ploufragan-Plouzané étudie :

- les agents responsables des maladies ayant un fort impact sur l'économie de ces productions ou sur le potentiel immunitaire des animaux,
- les maladies émergentes.

Il analyse les nouvelles méthodes d'élevage :

- leurs conséquences comportementales et sanitaires sur les animaux,
- la qualité des produits qui en sont issus,
- leur éventuel impact sur la santé des éleveurs.

Il développe des outils et méthodes de diagnostic et de prévention chez les animaux.

Il évalue également l'impact des contaminants microbiens sur les animaux et les risques liés à la consommation des aliments issus de ces filières. Enfin, il est laboratoire de référence pour les maladies des porcs des volailles et des poissons et participe à ce titre à la surveillance épidémiologique.

Il fournit aux organismes internationaux ou à l'État un appui scientifique et technique pour le contrôle vétérinaire (analyse de prélèvements, fourniture et validation de réactifs de référence, suivi de la qualité des analyses des laboratoires de diagnostic, appui pour l'analyse et le suivi épidémiologique en situation de crise sanitaire...).

Le laboratoire abrite en outre depuis 2014 la plateforme nationale de séquençage haut débit de l'Anses.

En matière de bien-être, les travaux sont orientés vers l'évaluation des nouvelles méthodes d'élevage et vers l'étude de leur impact i) sur la santé des animaux, ii) sur la qualité hygiénique des produits qui en sont issus, iii) sur la santé des éleveurs et iv) sur la sécurité sanitaire de l'environnement, ce champ d'intervention intègre donc, conformément aux missions de l'Anses, la sécurité sanitaire de l'environnement et du travail. Pour les filières avicoles, cette mesure de l'impact des pratiques d'élevage sur le triptyque constitué par la santé des consommateurs, celle des éleveurs et celle des



volailles définit le périmètre d'intervention de l'Unité Mixte Technologique « Sanivol », qui associe depuis 2009 des équipes issues de l'Anses et de l'ITAVI. En matière de sécurité sanitaire des aliments, enfin, les travaux contribuent à prévenir les risques de contamination bactériologique des produits d'origine avicole et porcine ainsi qu'à analyser les risques éventuels liés à la consommation des produits d'origine avicole, cunicole et porcine.

Le laboratoire assure enfin la gestion de différents réseaux et observatoires, tels que le réseau national d'observations épidémiologiques en aviculture (RNOEA) ou les volets avicole ou porcin du réseau de surveillance des antibiorésistances chez les bactéries pathogènes (RESAPATH).



## Organisation générale du laboratoire

Le Laboratoire réunit sur ses deux sites de Ploufragan et celui de Plouzané plus de 190 personnes. Huit unités de recherche et deux services expérimentaux composent désormais le laboratoire. Ils se répartissent comme suit :

- 1 unité spécifiquement piscicole : *Pathologie Virale des Poissons* (PVP), seule unité à être localisée sur le site de Plouzané (29).
- 2 unités spécifiquement aviaires et cunicoles : *Virologie Immunologie Parasitologie Aviaire et Cunicole* (VIPAC) et *Epidémiologie et Bien-Etre en Aviculture et Cuniculture* (EBEAC), cette dernière unité et le service expérimental SELEAC étant engagés avec l'ITAVI dans l'UMT « Sanivol » pour étudier « l'impact des techniques d'élevage avicole sur la santé (des animaux et des éleveurs) et la qualité sanitaire des produits ». L'existence de l'UMT permet une mutualisation des moyens humains des instituts partenaires sur les thématiques d'intérêt commun et un accès facilité aux installations expérimentales gérées par le service expérimental.
- 2 unités développant des activités aviaires et cunicoles, d'une part, ainsi que des activités porcines d'autre part : *Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins* (HQPAP) et *Génétique Virale et Biosécurité* (GVB).
- 1 unité développant des activités aviaires et cunicoles, des activités porcines et des activités en filière piscicole (antibiorésistance) : *Mycoplasmologie Bactériologie* (MB),
- 2 unités spécifiquement porcines : *Virologie Immunologie Porcine* (VIP) et *Epidémiologie et Bien-Etre Porcins* (EBEP).
- Deux services expérimentaux :
  - Le service d'élevage et d'expérimentation avicole et cunicole (SELEAC) gère les installations expérimentales non confinées destinées à l'expérimentation portant sur les paramètres zootechniques, alimentaires et de bien-être animal (installations utilisées entre autres dans le cadre de l'UMT Sanivol), d'une part, et les installations expérimentales confinées destinées à l'élevage des troupeaux de reproducteurs EOPS et à l'expérimentation avicole en conditions confinées A2 et A3, d'autre part).
  - Le service de production de porcs assainis et d'expérimentation (SPPAE) gérant le troupeau EOPS porc et l'expérimentation porcine en condition confinées A2 et A3
- Deux services de fonctions support :
  - Le Service Administratif Financier Technique et Informatique (SAFTI) gère l'ensemble des fonctions supports du laboratoire.
  - Le Service de management de la qualité (SMQ) qui accompagne les unités accréditées par le COFRAC dans le développement de leurs projets d'accréditation notamment sous la norme ISO 17025 mais également plus récemment sous la norme EN 17043 pour l'accréditation des



organisateurs d'essais inter-laboratoires d'aptitude. Il étend également son périmètre d'activité aux services expérimentaux et aux unités n'hébergeant pas de LNR.

Bien qu'organisé en unités et services ayant chacun une gouvernance propre, le laboratoire de l'Anses Ploufragan Plouzané tire sa force de la capacité de ses différentes structures de recherche et de fonctions support à construire ensemble la réponse aux questions de recherche de référence et d'appui scientifique et technique qui nous sont posées. Cette collaboration entre les différentes unités et services s'illustre particulièrement dans la gestion de notre réponse conjointe aux crises sanitaires. A ce titre, nos travaux qui ont été conduit depuis novembre 2015 jusqu'à aujourd'hui pour répondre à deux crises successives Influenza Aviaire qui ont durement frappé nos production avicoles sont emblématiques de ce travail en synergie. Notre réponse à ces deux crises a bien évidemment mobilisé le LNR hébergé par l'unité VIPAC mais également notre unité d'épidémiologie EBEAC, notre plateforme de séquençage en GVB, notre service administratif SAFTI pour la logistique et la réception des échantillons 24/24H, 7/7J, notre service expérimental SELEAC et l'UMT Sanivol que nous partageons avec nos partenaires de l'ITAVI. Il faut rajouter à cette mobilisation du laboratoire celle de la Direction de l'Evaluation des Risques de l'Anses et celle des experts de notre groupe de travail influenza aviaire.

Cette capacité à mobiliser un collectif de scientifiques et de gestionnaires pour répondre aux besoins conjoints de l'état et des filières de production, quelle que soit la localisation de la crise sanitaire en France est l'une des forces à porter au crédit de notre laboratoire.

Par ailleurs, les équipes du laboratoire de l'Anses Ploufragan-Plouzané veillent à être insérées dans un réseau de collaborations avec les grands organismes de recherche aux niveaux régional (projets CPER : Elephants élevage de demain avec l'INRA, Apivale avec IRSTEA, Infectio avec l'université de Rennes 1 et l'INSERM), interrégional (construction du tremplin Carnot AgriFoodTransition piloté par la fédération des centres techniques bretons et ligériens et associant les principales universités bretonnes et les grands organismes de recherche), national (INRA, INSERM, CNRS, IRSTEA, IFREMER, CIRAD, Universités...), européen (Club V, réseaux d'excellence MedVetNet et Epizone, EJP « one health ») ou international (réseau des laboratoires de référence internationaux de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale - pour laquelle le laboratoire détient 3 mandats de référence et sous l'égide de laquelle le laboratoire vient de terminer un programme de jumelage de 4 ans avec le Harbin Research Veterinary Institute (PR China). Ce positionnement contribue à notre réussite dans la réponse aux appels à projets européens notamment, qui ne s'est pas démenti au cours des deux dernières années.

Cette volonté d'un positionnement résolument scientifique reste complétée, comme elle est inscrite dans notre culture commune, par la volonté de produire des résultats directement utilisables par les filières professionnelles, qui se traduit par une collaboration forte des équipes du laboratoire avec celles des instituts techniques et Centres de Ressources Technologiques (*cf.* UMT déjà mentionnée, partenariat privilégié avec Zoopôle Développement), avec les interprofessions voire, dans des conditions propres à respecter le devoir d'indépendance de l'Anses, avec des partenaires privés



(tremplin Carnot AFT). A ce titre, l'implantation du laboratoire sur le Zoopôle de Ploufragan est un facteur essentiel pour l'insertion du laboratoire dans les réseaux professionnels aux niveaux local (Projets soutenus par l'Agglomération briochine ou le Conseil Départemental des Côtes d'Armor) ou régional et interrégional (projets coordonnés par le Pôle agronomique de l'Ouest, ou labellisés par le Pôle de compétitivité Valorial « aliment de demain » et soutenus par les Régions Bretagne et Pays de la Loire

La localisation du laboratoire permet de surcroît une dissémination accrue des résultats obtenus vers les filières professionnelles, au travers de la participation des scientifiques du laboratoire aux actions de formation organisées par les structures en charge de la formation initiale (Avipole Formation) ou continue (ISPAIA), ou des journées techniques très régulièrement organisées par l'ITAVI. Outre la publication régulière des résultats des travaux sous forme d'articles dans les revues scientifiques nationales et internationales, trois autres voies de diffusion des connaissances sont à mettre en exergue i) la participation, tous les deux ans, des scientifiques des unités travaillant dans les domaines avicoles aux Comité d'organisation, Comité scientifique (et bien entendu aux conférences) des Journées de la Recherche Avicole, dont l'ITAVI est le maître d'œuvre, ainsi que ii) la co-organisation annuelle des journées d'échanges avec les partenaires institutionnels et professionnels de l'Anses, en partenariat avec Zoopôle développement et en alternance pour les filières avicoles et cunicoles, une année, ou porcine, l'année suivante, iii) l'organisation conjointe avec l'ISPAIA de nombreux colloques et symposium scientifiques internationaux.

Enfin, notre localisation au sein de l'agglomération briochine, du département des Côtes d'Armor et de la Région Bretagne nous permet de bénéficier du soutien indéfectible, chacune à leur niveau, des trois collectivités territoriales que sont la communauté d'agglomération, le conseil départemental et le conseil régional. Qu'elles en soient remerciées.



## Principales évolutions de l'Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, dans les domaines avicoles et cunicoles sur la période considérée

Les évolutions de périmètres connues par l'Anses depuis sa création et les plus récentes d'entre elles (intégration de l'évaluation et des AMM des biocides et de l'évaluation des produits du tabac et dérivés) n'ont pas eu jusqu'à présent d'impact sur le périmètre d'activités du laboratoire de Ploufragan-Plouzané. Le périmètre de responsabilités croissant de l'agence et le contexte de l'expertise sanitaire en France justifient toujours autant l'application des principes de déontologie en vue d'une expertise publique, collective et indépendante. Les scientifiques du laboratoire continuent à contribuer à ces activités d'expertise et d'évaluation. Une première contribution, essentielle, est constituée par la production de données de qualité, dans des conditions partenariales qui doivent respecter l'indépendance de l'Agence. Les données produites sont entre autres destinées à alimenter des travaux d'évaluation du risque et/ou de modélisation (Développement des programmes d'Analyse Quantitative du Risque par exemple), en partenariat avec la Direction de l'Evaluation des Risques de l'Anses. Une deuxième contribution, non moins importante, consiste plus directement en la participation de nombreux scientifiques du laboratoire aux comités d'experts spécialisés de l'Anses (CES), ou au niveau européen à ceux de l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA), ou à l'animation de certains groupes de travail (GT) ou groupes d'expertise collective d'urgence (GECU) issus des CES. Enfin de nombreux scientifiques du laboratoire contribuent à l'expertise au travers des activités des Laboratoire Nationaux de Référence hébergés par le laboratoire (13 mandats, principaux ou associés).

Autre étape importante en cette fin d'année 2017, le renouvellement de la signature de la convention entre le Conseil Départemental des Côtes d'Armor et l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail. Le Conseil Départemental des Côtes D'Armor, partenaire historique du laboratoire-Anses de Ploufragan, a ainsi ré-affirmé pour 3 ans son soutien au laboratoire. Dans un contexte marqué, à l'Anses comme dans toute la fonction publique, par une réduction progressive des moyens, ce soutien s'avère essentiel au maintien de l'équilibre des moyens humains et financiers du laboratoire.

Au-delà du cadre strict des activités scientifiques qui font l'objet de la convention entre le CD22 et l'Anses, le laboratoire de Ploufragan participe activement à la vie du Zoopôle et à l'animation scientifique, de l'agglomération briochine, du département, de la région Bretagne ou des régions voisines. Au cours du biennium 2016-2017, les scientifiques du laboratoire ont ainsi été particulièrement impliqués dans l'organisation des 12<sup>èmes</sup> Journées de la recherche avicole (Tours), du symposium européen sur le bien-être des volailles (European Poultry Welfare) du congrès européen sur l'élevage de précision (ECPLF), du congrès mondial sur *Campylobacter et Helicobacter* (CHRO), du symposium international sur les salmonelles et les salmonelloses (IS3) ainsi que du colloque sur l'Immunologie des Animaux Domestiques (IAD). Le succès de ces initiatives doit beaucoup au travail de l'équipe de Zoopôle Développement qui collabore au succès



de la plupart de ces événements et au soutien actif des partenaires publics, privés et associatifs. Nous sommes fiers d'avoir pu modestement contribuer au succès de plusieurs de ces initiatives et à l'installation d'une dynamique positive d'organisation de congrès internationaux qui se poursuivra en 2018 notamment avec l'organisation les 24-25-26 Septembre 2018 d'I3S 2018 (International Symposium on Salmonella and Salmonellosis) à St Malo.

**Sur le plan des infrastructures et des équipements**, la période 2016/2017 aura été marquée par les projets permettant l'extension des travaux de rénovation à nos installations expérimentales avicoles non confinées et le démarrage à venir de la construction de notre prototype expérimental d'élevage de poulet standard du futur. Cette nouvelle tranche de travaux a déjà permis la démolition d'un certain nombre de bâtiments obsolètes et leur remplacement par de nouveaux bâtiments (ou des bâtiments rénovés) dotés d'équipements qui permettront pour la première fois à Ploufragan de mettre en œuvre les principes de l'élevage de précision (PLF), pour les volailles de chair, de ponte et reproductrices. Ces installations devraient nous permettre de préparer l'avenir du bien-être et de la santé des volailles de chair et de ponte et d'avoir une participation active dans les programmes TIGA du PIA3 : c'est ainsi que nous construisons avec nos partenaires de l'INRA et des instituts techniques entre autres un projet Ouest territoires d'élevages (Ouesterel) qui préfigurera l'avenir des productions animales. Par ailleurs, les moyens expérimentaux et les services qui les gèrent permettent en effet aux équipes de l'Anses de produire à Ploufragan des poules, des dindes, des canards et des porcs Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiés (EOPS), ainsi que des truites, saumons, bars et turbots exempts de virus à Plouzané. Les installations expérimentales confinées des mêmes services rendent possibles des infections expérimentales avec des agents microbiens divers, sur le site des Croix, dont le système de stérilisation des effluents liquides par traitement thermique profite surtout aux installations confinées d'expérimentation animale, de niveaux A2 ou A3. De telles installations, rares en Europe, sont essentielles pour la politique partenariale du laboratoire et la reprise du fonctionnement des animaleries avicoles confinées a été au cours du biennium 2016-2017 un argument fort pour nouer de nouveaux partenariats (notamment avec CEA Tech) et générer de nouvelles activités, y compris au sein des laboratoires : c'est ainsi que le partage des installations expérimentales confinées a été soutenu dans le cadre d'un nouveau programme européen (VetBioNet, porté au sein du laboratoire par le SELEAC et son chef de service et fait l'objet d'un programme infrastructure du PIA3 en cours de construction (Emerg'in).

Sur le plan des infrastructures l'accueil au sein du laboratoire (unité GVB) de la plate-forme nationale de séquençage à haut-débit de l'Anses qui s'est concrétisé en 2015 a montré toute sa pertinence dans la gestion des crises sanitaires auxquelles la France a dû faire face en 2016-2017. Notamment pour ce qui concerne directement la filière avicole et le laboratoire cette plateforme a été précieuse pour apporter des résultats complémentaires à ceux fournis par le Laboratoire National de Référence et essentiels dans la réponse en urgence aux deux crises influenza aviaire successives auxquelles nous avons été confrontés. Les unités du laboratoire et leurs partenaires sont dotées avec cet ensemble d'outils et de compétences scientifiques d'une capacité de réaction inconnue auparavant pour l'identification des menaces sanitaires émergentes.



**En ce qui concerne les thématiques abordées,** le biennium 2016-2017 a été marqué :

- Pour l'unité VIPAC par son implication dans la gestion des deux crises successives Influenza aviaire,
- Pour l'unité HQPAP et GVB par la poursuite de la montée en puissance des travaux consacrés à *Campylobacter* et par la mise au point notamment d'un concept vaccin contre *Campylobacter* chez le poulet,
- Pour l'unité EBEAC par sa forte mobilisation également sur la gestion des crises Influenza Aviaire,
- Pour l'unité MB par le renforcement des travaux consacrés aux formes génitales de l'infection par *Mycoplasma synoviae*, grâce à l'accueil d'un chercheur vétérinaire équatorien dans le cadre d'un partenariat entre l'Anses, l'Université de Rennes I et l'Université de Quito (Equateur), mais également par son travail au sein du réseau de surveillance de l'antibiorésistance en santé animale (Resapath) qui a souligné le succès remarquable du plan EcoAntibio 2017, en particulier en filière volaille,
- Pour le SELEAC par le début de la rénovation des installations d'élevage non confinées et par sa contribution active à la conduite des expérimentations nécessaires pour répondre aux questions suscitées par les crises influenza.
- Pour l'unité EBEP par la poursuite du partage de l'expérience en pharmaco-épidémiologie pour l'étude des déterminants de l'utilisation des antibiotiques dans les élevages avicoles et cunicoles et l'achèvement d'un programme européen sur le sujet puis des programmes de recherche conduits dans le cadre d'EcoAntibio 2017.

Dans toutes ces thématiques, le laboratoire de Ploufragan/Plouzané de l'Anses a tenté de faire valoir son approche pluridisciplinaire combinant activité analytique (laboratoires), maîtrise des modèles animaux (expérimentation animale), connaissance des conditions de productions (épidémiologie et facteurs de risque en élevage et dans les ateliers de transformation) en vue de nourrir l'expertise demandée (modélisation), avec un souci de produire des résultats de qualité utilisables par les partenaires administratifs et professionnels du laboratoire.



## UNITE EPIDEMIOLOGIE ET BIEN-ETRE EN AVICULTURE ET CUNICULTURE

Effectif : 10 à 14 personnes en fonction du nombre de personnes sous contrat

Chef d'unité : Sophie LE BOUQUIN-LENEVEU, Chef d'unité adjoint : Françoise POL

L'unité Épidémiologie et Bien-Être en aviculture et cuniculture (EBEAC) travaille sur des projets relevant à la fois de la santé animale, du bien-être animal et de la santé du consommateur et de l'éleveur.

En plaçant les systèmes d'élevages au cœur de ses thématiques, l'unité articule ses travaux d'épidémiologie autour de 3 objectifs principaux :

- 1) Améliorer la Santé et le Bien-Etre des animaux
- 2) Assurer la Sécurité Sanitaire des produits et de l'environnement d'élevage
- 3) Prévenir les émergences de maladies et contribuer à leur surveillance

Une partie des activités de l'unité rentre dans le champ d'investigation de l'Unité Mixte Technologique (UMT) SANIVOL, résultant d'un partenariat entre l'Anses et l'ITAVI. L'objectif de cette UMT, intitulée « impact des systèmes d'élevage sur la santé et sur la qualité sanitaire des produits » et co-dirigée par un binôme chercheur/ingénieur issu de l'unité EBEAC de l'Anses et de l'ITAVI, est d'acquérir et de développer des connaissances pour anticiper les contraintes réglementaires et répondre aux attentes des professionnels et des consommateurs dans le domaine de la prévention sanitaire en aviculture.

Grâce à ses travaux et à la veille scientifique qu'elle assure, l'unité EBEAC apporte un appui scientifique et technique auprès de vétérinaires et laboratoires spécialisés en aviculture, d'organismes professionnels avicoles et des ministères chargés de l'agriculture et de la santé. Des missions d'appui scientifique et technique (AST), d'expertise et d'épidémiologie opérationnelle sont menées à la demande des Services Vétérinaires, des professionnels de la filière avicole et des instances nationales ou européennes concernant en premier lieu les pestes aviaires mais aussi les salmonelles, le botulisme et le bien-être animal.

La période écoulée a été marquée par le changement du binôme chef d'unité/chef d'unité adjoint, à la suite du départ en 2016 de l'ancienne

chef d'unité vers des missions nationales sur le Bien-être animal.

Peu d'évolutions thématiques sont survenues depuis la période précédente. Néanmoins, suite aux deux épizooties d'influenza aviaire qui ont touché le territoire au cours des hivers 2015-2016 et 2016-2017, l'axe dédié à la prévention des émergences des maladies aviaires et à leur surveillance s'est considérablement développé. Ceci a fortement impacté l'organisation du travail d'une partie de l'unité. Les recrutements d'un technicien et d'une scientifique (grâce au soutien de la DGAI) ont permis de renforcer ponctuellement l'équipe sur cette thématique.

L'impact des conditions précoces d'existence du jeune animal sur sa santé, son bien-être et ses performances s'est développé au travers de plusieurs études conduites en conditions expérimentales et sur le terrain. Ces travaux ont fait l'objet d'une thèse universitaire co-encadrée dans l'unité, soutenue en 2017. Une autre thèse a été soutenue par une scientifique de l'unité sur l'aménagement des cages de poules pondeuses, thématique portée dans l'unité depuis de nombreuses années.

Enfin, les travaux conduits en santé au travail visant à caractériser et évaluer la qualité de l'air et la santé respiratoire des travailleurs aux différents maillons de la filière avicole sont clos et la thématique n'a, à ce jour, pas été poursuivie.

### 1. Activités de surveillance et d'appui scientifique et technique en rapport avec les filières avicoles et cunicole

#### 1.1. Animation du RNOEA (Réseau National d'Observations Epidémiologiques en aviculture)

Le RNOEA assure en France depuis 1987 une surveillance épidémiologique des maladies des volailles (toutes espèces / toutes maladies) à partir d'observations mensuelles transmises volontairement par 50 correspondants (laboratoires d'analyses et vétérinaires terrain). En 2017, une nouvelle interface Web a été mise en



place afin d'optimiser la collecte, la gestion et la restitution des données aux correspondants. Les correspondants adhérents au RNOEA peuvent ainsi transmettre leurs données en ligne sur l'interface Web, par saisie des données ou importation de fichiers de données. Ils ont également accès à une consultation de l'ensemble des données RNOEA sous forme de sorties graphiques (histogrammes, cartographies) en réalisant leurs propres requêtes. Une charte d'adhésion définit les droits et les devoirs des correspondants et des gestionnaires du réseau. Les données du RNOEA sont anonymes et confidentielles. L'accès à l'interface et la consultation des données sont sécurisés par une identification personnelle des adhérents.

Ce nouvel outil a été développé en collaboration avec la Direction Technique Informatique de l'Anses Maisons Alfort et la participation du comité de pilotage constitué de membres du RNOEA. Les travaux sur l'interface se poursuivent pour notamment optimiser l'importation automatique des fichiers et proposer de nouvelles possibilités de sorties graphiques aux correspondants.

Le réseau surveille ainsi l'évolution épidémiologique des maladies aviaires en France et peut, si nécessaire, être à l'initiative d'études épidémiologiques concernant certaines préoccupations sanitaires comme l'étude du botulisme aviaire ou de la colibacillose. Par ailleurs, une veille épidémiologique internationale de l'Influenza aviaire diffuse régulièrement des messages d'information aux correspondants.

## 1.2. AST et expertise

### 1.2.1. Sur l'Influenza aviaire

Les deux épizooties d'Influenza Aviaire Hautement Pathogène (IAHP) survenues en France depuis 2015 ont donné lieu à de nombreux travaux d'AST et d'expertise, en collaboration étroite avec le laboratoire national de référence (LNR).

A la demande de la DGAI, des appuis aux investigations épidémiologiques menées dans des foyers d'IA ont été conduits auprès des DD(CS)PP suite à la détection, fin 2015, des premiers foyers d'IAHP en Dordogne. Des informations ont été collectées afin de prévenir les risques de diffusion amont et aval de l'infection. Cette première mission a immédiatement permis d'appréhender l'ampleur du phénomène et

d'identifier des pratiques à risque dans la filière des palmipèdes gras (importance des mouvements d'animaux, biosécurité insuffisante,...).

Un second appui a été réalisé pour approfondir les investigations menées dans les foyers détectés au cours de l'été 2016 suite à la repopulation des élevages de palmipèdes. Ce travail a permis de concevoir une méthode pour évaluer l'origine possible de la contamination d'un foyer IA à partir des données virologiques et épidémiologiques issues des investigations menées dans tout foyer. Lors de l'épizootie 2016-2017, un troisième appui a été réalisé pour investiguer les foyers IAHP H5N8 dans les Deux Sèvres. Ces AST s'ajoutent au travail d'analyse et de synthèse des données épidémiologiques réalisé sur un rythme hebdomadaire en période d'épizootie pour alimenter le centre de ressources de la plateforme d'épidémiosurveillance en santé animale (plateforme ESA).

L'activité d'expertise sur l'IA comprend aussi la participation de trois scientifiques au groupe d'expertise collective de l'Anses dédié (GT IA). Dix-neuf avis en réponse à des saisines ont été rédigés sur la période concernée.

Enfin, l'activité d'expertise s'est aussi traduite par la collaboration au groupe de travail EFSA mandaté sur le risque posé par l'IA H5N8 en Europe (Ares 1422958). Elle a porté sur une étude d'application du modèle EFSA FLURISK pour cartographier un éventuel risque zoonotique lié à l'épizootie de H5 HP en France en 2015-2016 (collaboration Anses-EFSA-DGAI). Une analyse des résultats de surveillance de l'IA en France depuis 2012 et des mesures de gestions lors des deux épizooties a également été fournie au groupe de travail.

### 1.2.2. Sur le botulisme

Plusieurs investigations épidémiologiques dans le cadre d'AST ont aussi été conduites sur le botulisme aviaire.

Un cas chez des poules pondeuses a notamment été suivi en collaboration avec la DDPP 22, pour étudier la diffusion et la persistance de *C. botulinum* dans l'élevage. La bactérie a été détectée dans le bâtiment plus de cinq mois après l'épisode clinique, notamment sur le circuit à œufs et a été retrouvée sur la coquille mais jamais dans le contenu de l'œuf. En l'absence de mesures de police sanitaire définies pour ce danger sanitaire de première catégorie, des pistes ont été proposées, concernant notamment l'identification



des principales zones critiques pour les opérations de décontamination et l'instauration de mesures spécifiques permettant d'éviter la dissémination du germe à l'extérieur du bâtiment atteint.

En collaboration avec le GDS Bretagne, une investigation de cas groupés de botulisme dans deux exploitations bovines avec une suspicion de lien épidémiologique avec un élevage de volailles a été menée. L'enquête a mis en évidence des liens épidémiologiques entre les exploitations : fumier des volailles stocké sur des pâturages ou des parcelles utilisées pour faire de l'ensilage pour les bovins. Elle a montré que les volailles pouvaient être réservoir de *Clostridium botulinum* et qu'il était possible qu'une contamination croisée entre élevages ait eu lieu. Cependant, étant donnée l'absence de typage moléculaire des souches bactériennes, il ne s'agit que d'une hypothèse. Cette investigation montre l'importance du respect des bonnes pratiques de gestion des fumiers par les éleveurs pour éviter tout risque de contamination croisée entre les productions.

### 1.2.3. Sur les Salmonelles et Campylobacter

Concernant les contaminations salmonelliques en filières avicoles, l'unité EBEAC assure un AST auprès de la DGAL, des DD(CS)PP et des professionnels. En 2016, un rapport d'AST a été produit concernant la confirmation des infections salmonelliques dans les élevages de volailles. Ce rapport a été porté en annexe de l'avis d'expertise concernant l'amélioration des plans de lutte officiels contre les salmonelles en aviculture (saisine 2015-SA-0088).

Concernant *Campylobacter*, un scientifique participe depuis janvier 2017 au groupe de travail Anses (saisine SA-2016-0183) ayant pour but d'établir une analyse coût/bénéfice de mesures de maîtrise de cet agent zoonotique dans les filières de volailles de chair françaises (échéance au premier semestre 2018).

## 2. Activités de recherche

### 2.1. L'étude de l'influence des systèmes et pratiques d'élevage sur la santé et le bien-être des animaux.

#### 2.1.1. Étude de l'impact de la qualité des poussins sur le bien-être, la santé et les performances zootechniques des poulets de chair.

Plusieurs projets ont été réalisés par l'unité EBEAC afin d'investiguer tout au long de la chaîne d'accoupage, depuis la gestion des reproducteurs jusqu'à la mise en place des poussins et leurs conditions de démarrage, les facteurs de risque de moindre qualité des poussins, et les leviers potentiels pouvant permettre de l'améliorer. En effet, la qualité des poussins puis la santé, le bien-être et les performances zootechniques des animaux au cours de l'élevage dépendent de nombreux facteurs intervenant depuis l'élevage des reproducteurs jusqu'à la mise en place des animaux.

Les pertes des dix premiers jours d'élevage représentent une part importante de la mortalité totale dans une bande de poulets de chair. La viabilité des poussins est donc un paramètre crucial à optimiser afin de mieux maîtriser la mortalité des premiers jours d'élevage. De plus, le plan Ecoantibio 2017 prévoit un usage prudent et raisonné des antibiotiques et la réduction de l'utilisation d'antibiotiques d'importance critique en médecine humaine. En production de poulet de chair standard, une grande part des administrations d'antibiotiques a lieu au cours de la première semaine de vie des animaux. Ceci implique d'améliorer notamment la prévention des troubles digestifs en période de démarrage et la résistance des poussins aux conditions d'ambiance ou de microbisme rencontrées au démarrage en élevage.

Au travers de plusieurs projets, des pistes innovantes en vue de garantir une viabilité et une croissance optimale des futurs poulets, tout en optimisant leur santé et leur bien-être ont été testées.

### Qualicouv

#### Optimisation de la qualité du poussin d'un jour : quels leviers d'actions ?

 *Projet UMT Sanivol financé par CASDAR [jan 2015 -> juin 2018 - avenant demandé jusqu'à fin 2018]*

Le projet Qualicouv consiste à améliorer la qualité du poussin (diminution de la mortalité précoce, meilleure résistance aux maladies et aux stress, en vue de diminuer l'utilisation d'antibiotiques). La robustesse des poussins et les performances zootechniques qui en découlent au cours de l'élevage dépendent de nombreux facteurs comme la qualité des œufs à couvrir (OAC), elle-même liée à l'âge du troupeau reproducteur, aux



conditions et durées de stockage des œufs et des conditions et durées d'attente des poussins avant l'arrivée en élevage.

Une première expérimentation a été réalisée au printemps 2016, dont la première phase (de l'éclosion au transport des poussins) s'est déroulée en couvoir de production commercial et la seconde phase (élevage des animaux) à la station expérimentale de l'Anses. Elle visait à comparer diverses conditions d'attente des poussins au couvoir (température contrôlée, renouvellement d'air, densité animale en caisse, ajout d'hydratant) pendant 24h avant le transport en élevage. La seconde expérimentation a été effectuée au printemps 2017 au sein de la station expérimentale de l'Anses (couvoir et bâtiment d'élevage) et visait à comparer divers traitements thermiques sur des OAC stockés 15 jours avant incubation (5°C, 12°C, 17°C ou préchauffages en incubateurs unique à J1 ou double à J5 et J11).

Dans chaque expérimentation, les œufs étaient issus de deux élevages de reproducteurs : en début de ponte et en fin de ponte. Les mesures ont porté sur les paramètres d'éclosion, la qualité des œufs et des poussins et sur la santé et les performances des poulets de chair.

Les leviers testés sur les poussins n'ont globalement pas permis d'améliorer de manière significative les paramètres étudiés. L'ajout d'hydratant pourrait s'avérer intéressant (meilleure homogénéité du lot, moins de lésions aux pattes), mais uniquement pour les œufs issus de reproducteurs en début de ponte. Les traitements thermiques appliqués sur les œufs stockés longtemps ont permis une amélioration des résultats d'éclosion et dans certaines conditions une amélioration de la qualité des poussins.

Une troisième expérimentation sera effectuée au dernier trimestre 2018 afin de valider ces résultats, en ajoutant des mesures (une collaboration avec GVB pour l'analyse génomique, et un test de résistance aux coccidies en collaboration avec VIPAC sont envisagés).

#### **Jeune Avi+**

**Prévenir et réduire l'utilisation des antibiotiques dans le jeune âge en élevage avicole : identifier les pratiques et situations à risque, valider des leviers d'action**

 **Projet UMT Sanivol, financé par le plan Ecoantibio 2017 et la DGAl [Déc 2014 - > Déc 2016]**

Les 10 premiers jours d'élevage constituent une phase déterminante pour le développement du système digestif et immunitaire des poulets de chair et conditionne la réussite technico-économique du lot. Il s'agit d'une étape critique pour le développement des poussins et d'une période à risque pour l'usage des antibiotiques. L'étude conduite en 2015 et 2016 avait pour objectif d'identifier les conditions de démarrage des poussins pouvant influencer l'utilisation d'antibiotiques et la mortalité à 10 jours. Cinquante lots de poulets de chair standard ont été enquêtés en Bretagne. Deux visites par lot ont été réalisées : la première dans les 24 h après l'arrivée des poussins à l'élevage (V1) et la seconde à 3 jours (V2), permettant d'évaluer la qualité des poussins, de mesurer des paramètres d'ambiance et de recueillir des informations sur les conditions de démarrage. Sur les 10 premiers jours, le taux de mortalité moyen a été de 1,9 % (n=46 lots), et 47 % des lots (22/47 lots) ont reçu un traitement antibiotique. Une analyse multivariée des données a fait ressortir deux classes d'élevages opposées. La classe présentant un taux de mortalité moyen à 10 jours plus élevé que celui de l'échantillon global (2,3 %) et recevant plus fréquemment un antibiotique avant 10 jours (58 % des lots de cette classe) est caractérisée par : la présence d'*E. coli* en portage sur les poussins en V1, l'observation de poussins boiteux en V2 plus fréquentes, des concentrations en CO2 en V1 généralement plus élevées (> 3 000 ppm), des élevages souvent plus éloignés du couvoir (> 200 km) et des bâtiments généralement lavés sans détergent. Cette étude a permis de cibler des actions correctrices pour limiter l'usage des antibiotiques et la mortalité lors de la phase critique du démarrage des poussins.

#### **2.1.2. Épointage**

**Recherche d'alternatives à l'épointage du bec chez les poules pondeuses : réduction des risques de picage en élevage sol plein-air et en cages.**

 **Projet RMT Bien-être et systèmes d'élevages financé par CASDAR [jan 2015 -> juin 2018]**

L'épointage du bec est systématiquement pratiqué en France sur les poules pondeuses afin de limiter les conséquences négatives de comportements de picage agressif. Cependant, compte tenu d'une demande sociale importante, cette pratique est en cours d'interdiction dans plusieurs pays européens. Ce projet a pour objectif d'identifier les freins et les leviers de la filière œufs de



consommation à l'absence d'épointage, de connaître les facteurs associés au picage (enquête épidémiologique) et de proposer des solutions techniques pour éviter cette pratique, en expérimentant un ensemble d'enrichissements et de mesures de conduite d'élevage en cages aménagées (volet expérimental). Les résultats de l'étude épidémiologique ont permis d'estimer la prévalence de picage sévère (emplumement dégradé) dans les lots de poules pondeuses épointées logées en cages aménagées à 32,9% (IC=95%, [22,5 ; 43,3]) et la présence de cannibalisme (emplumement dégradé et mortalité associée) à 2,5% (IC=95%, [-0,9 ; 5,9]). En cages aménagées, l'ensemble des facteurs suivants est associé à l'état d'emplumement des animaux : souche, localisation géographique de l'exploitation, type et longueur de perchoirs, surface de cage par poule, type de lumière et nombre de poules par cage. En système plein-air, la prévalence de picage sévère (emplumement dégradé) dans les lots de poules pondeuses épointées est estimée à 23,8% (IC=95%, [14,5 ; 31,1]) et la présence de cannibalisme (emplumement dégradé et mortalité associée) à 8,8% (IC=95%, [2,6 ; 15,0]). Les facteurs associés à l'état d'emplumement des animaux sont les suivants : utilisation du parcours, programme lumineux, souche, localisation géographique de la ferme et année de construction du poulailler.

Le volet expérimental s'est terminé en octobre 2017. Les données sont actuellement en cours d'analyse.

### **2.1.3. Mise au point d'un support de picotage & grattage pour les poules pondeuses en cages**

*Projet financé par la DGAl et la Région Bretagne [juillet 2014 -> mars 2016]*

Pour satisfaire les comportements de picotage-grattage et bains de poussière des poules, les fabricants de cages proposent la distribution automatique d'aliment comme litière friable, généralement déversé sur un tapis de type gazon artificiel en polypropylène, ou sur une plaque plane. Pourtant, cette mise à disposition obligatoire de litière friable en cages n'est aujourd'hui que rarement mise en œuvre dans les élevages car ces solutions ne sont pas totalement satisfaisantes : d'une part pour la satisfaction des besoins comportementaux des poules (matériau peu propice pour exprimer ce comportement) et d'autre part pour des raisons environnementales (traitement des déchets plastiques,

empoussièrement), sanitaires (hygiène de la cage à cause du tapis de récupération qui devient rapidement sale et difficile à nettoyer et risque d'ingestion par la poule pouvant générer des résidus dans les œufs de consommation) et économiques (coût de distribution d'aliment supplémentaire, de mécanisme de distribution automatique, renouvellement fréquent nécessaire car tenue insuffisante dans le temps). L'objectif de ce projet était de trouver des solutions techniques applicables en élevage en cages et permettant aux éleveurs de respecter la réglementation. Nous avons contribué à développer et étudié différents matériaux à la station expérimentale de l'Anses (à base de bois et de colle au soja, à base d'algues, de marc de café, de luzerne, de cellulose, de minéraux...) en comparant le comportement, la santé, la production et la qualité des œufs des poules ayant ces matériaux à ceux de poules ayant des tapis artificiel ou du grillage simple. Les matériaux à base de sciure de bois non traité lié à un liant (type caséine), de marc de café ou d'algues permettent davantage aux poules d'exprimer leurs comportements que le grillage simple et les tapis. Par ailleurs les plaques de bois et de minéraux ont une résistance élevée. Actuellement, les plaques testées dans cette étude sont à l'état de prototypes, c'est pourquoi le coût de production à grande échelle n'est pas connu. Toutefois, le tapis artificiel resterait économiquement moins intéressant que les autres revêtements. De plus, les supports naturels peuvent être fabriqués à partir de co-produits d'industries agroalimentaires (comme le marc de café par exemple), ce qui permettrait un débouché économiquement viable.

### **2.1.4. Étude Synergie pour la santé des élevages biologiques**



*Projet UMT Sanivol financé par le CASDAR 2012 [janv 2013 -> Juin 2016]*

Bien que la production de volailles de chair biologiques connaisse une progression régulière (5 % sur un an en 2016, Agence Bio, 2016), il existe peu de données sur la gestion de la santé et du bien-être dans ces élevages. C'est pour les identifier que l'Institut Technique de l'Agriculture Biologique (ITAB) a coordonné un projet multifilières « Synergie pour la santé des élevages biologiques » dont les objectifs pour les volailles sont de décrire l'état de santé et de bien-être des poulets et d'identifier les conditions d'élevage influençant cet état de santé. Une étude a été



menée par l'Anses (unités EBEAC et VIPAC) dans 85 lots de poulets biologiques (2 visites à 3 et 11 semaines d'âge). Pour chaque visite, un questionnaire a été renseigné, une notation d'indicateurs de bien-être sur 30 poulets et des examens parasitaires sur 5 poulets ont été réalisés. Des problèmes sanitaires, le plus souvent digestifs, ont été signalés par les éleveurs dans 37,6% des lots. Des helminthes ont été identifiés dans 59% des lots sans lien significatif avec les lots atteints de problèmes digestifs et il n'a pas été observé de lésions coccidiennes majeures. Pour l'ensemble des élevages suivis, des pododermatites ont été observées en fin de lot pour 44,1% des poulets, dont 21,5% avec des lésions minimales. Par ailleurs, cette étude a permis de mettre en évidence des conditions d'élevage influençant l'état de santé, et de proposer des moyens d'action pour améliorer la gestion sanitaire des élevages de poulets biologiques : le renforcement de l'hygiène avec la désinfection des bâtiments et de la biosécurité avec un changement de chaussures, une meilleure gestion de la qualité de l'eau de boisson, l'aménagement de la zone de sortie sur parcours, la préconisation d'un vide sanitaire périodique complet sur l'élevage et le développement de l'accès au conseil technique pour les éleveurs indépendants. Les analyses de diversité de la flore caecale réalisées par TTGE (*temporal temperature gradient gel electrophoresis*) sur 5 poulets dans 34 élevages ont montré que cette diversité tendait à être plus faible chez les animaux infestés par des helminthes. La flore caecale s'avère plus homogène entre les poulets d'un même troupeau dans les élevages de grande taille ayant des barrières sanitaires. Cependant aucune relation n'a pu être mise en évidence entre cette homogénéité de flore au sein des troupeaux et la santé digestive des poulets.

## 2.2. L'étude de l'impact des systèmes et pratiques d'élevage sur la sécurité sanitaire et l'hygiène des produits ainsi que la qualité sanitaire de l'environnement d'élevage

### 2.2.1. Étude sur la contamination des produits animaux par des polluants organiques persistants émergents, les retardateurs de flamme bromés

Projet « BRAVIPORC » UMT Sanivol financé par le CASDAR 2012 [janvier 2013 -> décembre 2015]

Les Polluants Organiques Persistants (POP), comprenant pesticides, produits industriels et sous-produits involontaires de procédés industriels et de combustion, sont des molécules organiques ubiquistes, toxiques, persistantes et bioaccumulables le long de la chaîne alimentaire. Parmi ceux-ci, les Retardateurs de Flamme Bromés (RFB) ajoutés dans les matériaux d'isolation, peuvent accidentellement être ingérés par les animaux et contaminer les produits. L'étude BRAVIPORC, menée dans 60 élevages de poudeuses et 56 élevages de poulets de chair, a montré que la concentration en RFB des produits issus de ces fermes demeure faible ; les œufs et la viande de poulet produits en France, sur la base de ces observations, seraient donc de faibles contributeurs à l'exposition alimentaire en RFB des consommateurs. Il est à noter que des RFB ont été plus fréquemment retrouvés dans les échantillons issus de productions plein-air et biologiques. Ces systèmes d'élevage seraient ainsi plus exposés à cette contamination, soit à cause de l'accès direct à l'extérieur soit du fait de pratiques spécifiques telles qu'un âge d'abattage plus élevé des poulets. En complément des investigations de terrain, une étude expérimentale a été réalisée avec l'Anses SELEAC pour évaluer le transfert d'un RFB ( $\alpha$ -HBCD) dans l'œuf par exposition environnementale de poules à un matériau contaminé. Cette étude a montré que des poules en cages ayant accès à une plaque de polystyrène expansé (matériau isolant utilisé en élevage) contenant de l' $\alpha$ -HBCD vont naturellement ingérer une grande quantité en la picorant. Moins de trois jours après, une concentration très élevée d' $\alpha$ -HBCD est détectée dans les œufs qu'elles produisent et celle-ci perdure au moins pendant deux semaines après l'arrêt de l'exposition. Cet essai démontre que le transfert de RFB dans les œufs est tout à fait possible si les poules ont accès directement à un isolant en contenant. Il est donc nécessaire de s'assurer du bon état d'entretien des bâtiments de volailles pour éviter ce type de contamination accidentelle.

### 2.2.2. Étude de l'impact sanitaire de l'empoussièrement

#### ACCROCH'AIR : étude de l'impact des poussières aériennes sur la santé respiratoire des accrocheurs de volailles à l'abattoir

Projet UMT Sanivol financement France Agrimer [janvier 2015 -> juin 2016]



L'objectif de ce projet est de caractériser l'empoussièrément de l'air au poste d'accrochage des volailles à l'abattoir et son impact potentiel sur la santé respiratoire des salariés. Trente visites ont été réalisées en 2015 sur 27 chaînes d'abattage afin de quantifier l'exposition de 109 accrocheurs aux poussières. L'empoussièrément total ambiant au poste d'accrochage varie fortement selon les dispositions des locaux : les cabines d'accrochage cloisonnées peuvent présenter des niveaux élevés de poussières même en présence de systèmes de ventilation spécifiques comme des caissons ou dossier aspirants ; la présence d'une gaine de ventilation, en augmentant le renouvellement de l'air, tend à diminuer cet empoussièrément. Le taux de poussières est généralement plus faible dans les postes d'accrochage ouverts sur le hangar de réception des volailles, le volume très important du local permettant une diffusion rapide des poussières loin des opérateurs. Néanmoins, l'exposition des professionnels aux poussières inhalables (diamètre inférieur à 100 µm) est souvent élevée quel que soit l'aménagement du poste d'accrochage. Le port d'équipement de protection individuel adéquat (masque FFP2) est donc indispensable pour les professionnels travaillant au poste d'accrochage. Quarante-six accrocheurs de volailles ont ensuite été reçus en visite médicale. Un lien significatif a pu être mis en évidence entre une exposition élevée aux poussières lors de l'accrochage des volailles et le risque de tousser le matin au réveil ou de façon habituelle toute la journée. D'un point de vue général, les professionnels suivis présentent fréquemment des symptômes respiratoires au travail et des anomalies de la fonction respiratoire, à mettre aussi en relation avec un tabagisme important.

Les études menées depuis 2000 par l'EBEAC et l'ITAVI sur l'exposition aux poussières des travailleurs avicoles ont permis de mettre en évidence des risques respiratoires spécifiques dans cette population, qu'il n'est pas toujours possible d'expliquer par l'empoussièrément du lieu de travail uniquement. Une coexposition à d'autres polluants aériens est donc fortement suspectée. L'UMT Sanivol projette de mener des études complémentaires pour mesurer le risque lié à l'exposition aux produits nettoyants et désinfectants chez les travailleurs avicoles.

### **2.2.3. Usage des antibiotiques en filière cunicole**

*Plan Ecoantibio 2017 [sept 2013 -> Octobre 2017]*

*Travaux menés conjointement avec l'unité EBEP*

La filière cunicole est mobilisée depuis de nombreuses années pour promouvoir le bon usage des traitements en élevage et notamment des traitements antibiotiques. Depuis 2011, les Index de Fréquence des Traitements Antibiotiques (IFTA), sont déployés sur le terrain et permettent un suivi réactif de l'évolution de l'utilisation d'antibiotiques à chaque bande. L'analyse des trajectoires d'utilisation a mis en évidence que la réduction des usages n'est pas uniforme dans tous les élevages et dépend vraisemblablement d'un grand nombre de facteurs, notamment sanitaires, mais aussi techniques et humains. En 2015, dans le cadre du plan Ecoantibio 2017, une enquête postale a été conduite auprès de 405 éleveurs, en collaboration avec l'ITAVI et l'Université de Rennes 2 (sciences humaines) afin de comprendre les déterminants humains, techniques et sanitaires de cette variabilité de trajectoires. La perception du métier d'éleveur a été décrite au travers du modèle « Demande – ressources au travail » et le lien entre ses composantes et l'usage des antibiotiques exploré. Parallèlement, les caractéristiques structurelles et sanitaires de l'élevage ainsi que leur évolution, de même que les freins et leviers rencontrés par les éleveurs pour réduire les usages ont été renseignés. Cette étude a permis de montrer qu'en 2015 les trajectoires d'usages étaient en tout premier lieu influencées par le contexte sanitaire de l'élevage. Les modifications des pratiques sanitaires apportées (pratique de la vaccination, modification de la ventilation, amélioration de l'hygiène ou de la qualité de l'eau,...) et la perception de la démedication par l'éleveur (frein ou opportunité) elle-même influencée par la personnalité de l'éleveur, agissent aussi sur les trajectoires d'usage.

### **2.2.4. État des lieux des méthodes de traitements alternatifs utilisés en production de poulet biologique en France**

*Projet Trait'Bio financement Plan Ecoantibio 2017 [juillet 2015 -> juillet 2018]*

En production biologique, la gestion de la santé repose essentiellement sur des pratiques préventives et des méthodes alternatives à l'utilisation des traitements allopathiques. Dans le cadre du projet Casdar Synergie (cf. 2.1.4), un état des lieux sanitaire des élevages et des pratiques



associées a été réalisé. Pour chacun des 85 lots enquêtés, l'ensemble des produits administrés a été relevé avec le nom du produit, le motif d'utilisation par l'éleveur, l'âge des animaux et la durée du traitement. Le projet Trait'Bio, mené dans le cadre du Plan Ecoantibio 2017, initié à sa suite avait pour objectifs de recenser les produits utilisés, de décrire les usages, les motifs d'utilisation et les allégations des fabricants. Un travail de recherche systématique a été réalisé (bibliographie, web, contacts téléphoniques avec les fabricants et fournisseurs...) afin de recueillir la composition des produits à partir des notices. Les résultats de cette étude montrent qu'il existe une grande diversité de produits utilisés avec 62 produits et 203 utilisations recensés. Quinze lots n'ont reçu aucun produit. La part de l'utilisation préventive est essentielle, avec 78.9% des usages contre seulement 21.2% pour le curatif. Peu de produits conventionnels ont été utilisés, avec seulement 6 lots ayant eu recours à ces produits pour des problèmes sanitaires. Concernant la composition des produits, la phytothérapie (aromathérapie et extraits de plantes) et les oligo-éléments et minéraux sont les composants majoritaires. Ces produits sont principalement utilisés pour éviter les problèmes digestifs, mais aussi favoriser l'ossification et la croissance.

### **2.3. La surveillance, l'épidémiologie descriptive et analytique des maladies réglementées et/ou d'élevage**

#### **2.3.1. Étude de la survie et de la dissémination du virus IA dans l'environnement**

*Projet financé par la DGAL [juillet 2016 -> ....]*

Pour répondre aux questionnements soulevés par l'épizootie d'IAHP à H5N8 de l'hiver 2016-2017, des observations de terrain ont été menées sur des foyers et en abattoirs par l'unité EBEAC en collaboration avec les DD(CS)PP concernées, le Laboratoire des Landes et l'unité VIPAC. 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. Trois aspects ont été abordés : la contamination environnementale des foyers (bâtiment, parcours, air), la contamination des lisiers d'élevages de canards infectés et la décontamination des camions de transport dans le cadre des abattages

préventifs de lots de volailles. Sur le terrain, ces études ont consisté en quatre missions s'étalant de janvier à mai 2017, impliquant de un à quatre agents par mission, concernant douze foyers IAHP (visités une à quatre fois) et quatre abattoirs (visités une à deux fois).

Les résultats préliminaires ont été diffusés rapidement via la Plateforme ESA (article mis en ligne le 24 mars 2017).

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 représentaient un risque important de contamination environnementale.

#### **2.3.2. Épidémiologie de *Clostridium botulinum* dans la filière avicole en France**



*Projet financé par la DGAL (LNR Botulisme aviaire) [Janvier 2016 -> Juillet 2017]*

Lors d'un épisode de botulisme aviaire, le nettoyage-désinfection et la gestion des effluents restent des opérations délicates pour les élevages atteints. Nous disposons de peu de données concernant la contamination des fumiers d'élevages de volailles par *C. botulinum*, une bactérie sporulante, capable de résister dans l'environnement pendant plusieurs années et pouvant donner lieu à des récurrences. Une étude a été menée sur le terrain en collaboration avec l'unité HQPAP dans le cadre du LNR botulisme aviaire. L'objectif était d'évaluer la contamination de fumier stocké suite à un épisode de botulisme et l'évolution de cette contamination dans le temps. Pour cela, 5 foyers ont été suivis : 2 en élevages de dindes (*C. botulinum* type D et D/C), 2 en élevages de poulets (type C/D) et un élevage de poules (type C/D). Pour chaque élevage, après stockage du fumier à l'extérieur, 2 visites ont été réalisées avec 1 à 2 mois d'intervalle. Lors de chaque visite, le tas de fumier a fait l'objet de 15 prélèvements avec 5 prélèvements (2 en surface et 3 en profondeur) réalisés dans 3 endroits différents. Des données épidémiologiques sur les épisodes de botulisme et la gestion du fumier ont



également été collectées. Les prélèvements de fumier ont été analysés par PCR en temps réel pour détecter les gènes toxiques. *C. botulinum* a été détecté dans les tas de fumier des 5 élevages investigués lors d'au moins une des deux visites, que ce soit dans les prélèvements réalisés en surface (60,7%) ou en profondeur (46,9 %). Le nombre de prélèvements détectés positifs était plus élevé lors de la seconde visite (68 %) que lors de la première (42,2 %), indiquant une forte persistance de *C. botulinum* dans les fumiers au cours du temps. Cette étude préliminaire montre l'importance de la mise en place de mesures appropriées pour la gestion des fumiers qui constitue une source de re-contamination persistante dans les élevages.

### 2.3.3. Maîtrise de la colibacillose aviaire en élevage de poulet de chair : quelles pistes d'action ?

 *Projet « COLISEE » UMT Sanivol financé par le CASDAR 2016 [janvier 2017 -> décembre 2019]*

La colibacillose est une maladie fréquente en volailles, impliquant des pertes économiques importantes et la mise en place de traitements antibiotiques. La bactérie responsable, *Escherichia coli*, présente une grande diversité de souches et de facteurs de virulence, d'où les difficultés de caractérisation de sa pathogénicité et de maîtrise de la maladie. L'étude COLISEE sera menée de 2017 à 2019 par l'UMT Sanivol en partenariat avec les laboratoires FINALAB, RESALAB, LABOCEA, la plateforme Identypath de l'Anses Maisons Alfort et les unités MB et SELEAC de l'Anses Ploufragan. Au cours du 1<sup>er</sup> volet, une étude épidémiologique sera conduite dans 100 élevages de poulets pour identifier les facteurs de déclenchement de la colibacillose et étudier la relation entre les profils moléculaires des souches d'*E.coli* et les données épidémiocliniques. Le volet 2 permettra de développer des outils de caractérisation des souches d'*E.coli* isolées dans les élevages (PCR haut débit et MALDI-TOF). Le volet 3 concernera le développement de modèles de colibacillose et d'essais de vaccination à partir des souches isolées. Ce projet permettra d'apporter des moyens d'action pour mieux maîtriser l'expression clinique de la colibacillose, par l'optimisation des conditions d'élevage et le développement de technologies d'analyses permettant une caractérisation de la pathogénicité des souches d'*E.coli*.

### 3. Activité de référence

L'unité HQPAP du laboratoire Anses de Ploufragan-Plouzané a été nommée LNR botulisme aviaire fin 2011. L'unité EBEAC du laboratoire de Ploufragan et la plateforme Identypath du laboratoire de Maisons-Alfort sont LNR associés. L'unité EBEAC a en charge le volet épidémiologique avec notamment les investigations épidémiologiques sur le terrain, le traitement des données et la coordination des vétérinaires.

### 4. Activités d'expertise

L'unité participe aux activités d'expertise en épidémiologie et bien-être animal à différents niveaux :

#### *Au niveau national*

- Membre du CES SA de l'Anses jusqu'en sept 2016 (1 scientifique)
- Membre du GT BEA de l'Anses jusqu'en sept 2016 (1 scientifique)
- Membre du GT IA de l'Anses (2 scientifiques)
- Membre du GT Référentiel inspection de la DGAI (1 scientifique)
- Membre du groupe de suivi pestes aviaires de la plateforme ESA (2 scientifiques)
- Membre du GT OASIS sur l'évaluation du dispositif de surveillance des pestes aviaires en France (2 scientifiques)

#### *Au niveau européen*

- Membre de WGs de l'EFSA (1 scientifique)
- Membre du panel AHAW de l'EFSA (1 scientifique) jusqu'en sept 2016
- Expert auprès de la commission européenne pour l'évaluation des dossiers (2 scientifiques)
- Membre du Groupe IX (Bien-être) de la WPSA (1 scientifique)
- Membre du COST Keel Bone deviation (2 scientifiques jusqu'en sept 2016 puis 1 scientifique)
- Membre du COST GroupHousNet (2 scientifiques jusqu'en sept 2016 puis 1 scientifique)

### 5. Dissémination des résultats

Les résultats des travaux présentés ci-dessus ont été valorisés par la rédaction de 57 publications scientifiques dont 17 dans des revues internationales, de 43 communications orales dont



9 dans des congrès internationaux et de 35 communications affichées dont 17 dans des congrès internationaux. Plus particulièrement, les travaux menés par l'UMT Sanivol ont permis une co-signature Anses / ITAVI de 20 communications auprès des scientifiques et professionnels nationaux. Des rapports, mémoires ou documents techniques sont aussi systématiquement rédigés pour les financeurs et à l'occasion des soutenances des stagiaires accueillis dans l'unité. Les résultats obtenus à

partir d'enquêtes sur le terrain (élevages, couvoirs) font l'objet d'une restitution spécifique et si possible individualisée auprès des acteurs professionnels qui y ont participé.

La liste des références disponibles peut être obtenue sur demande auprès de la correspondante Communication de l'Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané,  
mél: [elisabeth.reperant@anses.fr](mailto:elisabeth.reperant@anses.fr)



## UNITE HYGIENE ET QUALITE DES PRODUITS AVICOLES ET PORCINS

Effectif : 29 agents dont 11 scientifiques et 3 doctorants

Chef d'unité : Marianne CHEMALY, Chef d'unité adjoint : Martine DENIS

L'Unité HQPAP assure des missions de recherche, de référence, de surveillance et d'expertise. Les travaux de l'unité se font sous assurance qualité. Les activités de recherche ont pour thématique la « Maîtrise des agents bactériens zoonotiques par une approche pluridisciplinaire dans les filières avicole et porcine ». Les principales bactéries zoonotiques étudiées sont *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Yersinia* et *Clostridium botulinum*. L'approche pluridisciplinaire se décline en 3 axes : Prévalence et épidémiologie moléculaire, Relation hôte – pathogène et Moyens de lutte.

### 1- Prévalence, facteurs de risques et épidémiologie moléculaire

- acquérir des données de prévalence, de quantification, de facteurs de risque et de diversité génétique aux différents maillons des chaînes
- proposer une recherche réactive en fonction des problèmes émergents
- tracer les bactéries du réservoir, l'animal, jusqu'à l'homme
- développer de techniques de détection / de dénombrement/ de typage (méthodes classiques ou moléculaires)

### 2- Relations Hôte-pathogène-matrice

- acquérir des connaissances :
  - sur la colonisation des animaux par les bactéries, sur la diffusion des bactéries entre les animaux en relation ou non avec le microbiote digestif
  - sur la relation du pathogène avec des matrices inertes
- caractériser les souches issues du terrain (élevages, abattoirs et distribution) et de l'homme en étudiant les mécanismes de virulence, les caractères phénotypiques de ces souches
- développer de modèles animaux, de méthodes pour mesurer la virulence, les caractères phénotypiques

### 3- Moyens de lutte

- Elevage : diminuer l'excrétion des bactéries par les animaux en élevage sous l'action de molécules (*via* l'alimentation) ou de la vaccination
- Abattoir : diminuer la diffusion de la bactérie à l'abattoir en jouant sur des paramètres technologiques
- développer des modèles animaux / d'outils technologiques pour étudier les moyens de lutte.

### 1. Recherche

#### 1.1. SALMONELLA

##### 1.1.1. Moyens de lutte vis-à-vis de *Salmonella* spp. Au niveau de l'élevage

Le projet Algolife (2014-2019), financé par la Banque Publique d'Investissement fait intervenir plusieurs partenaires (SICA, Amadeite, Diana, Triballat, la Station Biologique de Roscoff et plusieurs unités de l'Anses Ploufragan-Plouzané). L'objectif général de ce projet est l'enrichissement et la transformation de macro-algues pour l'extraction de molécules bioactives destinées aux marchés de la nutrition, de la santé animale et humaine. La filière volaille de l'unité HQPAP est impliquée dans ce projet pour tester l'effet de plus de 50 extraits d'algues sur *Campylobacter*, *Salmonella* et *Clostridium*.

Parmi les 50 extraits d'algues testés *in vitro* sur la croissance, 5 ont permis de réduire la croissance des 2 sérovars *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* de 1 à 6 log<sub>10</sub> CFU/ml par rapport au témoin. Des essais *in vivo* sont prévus pour tester l'effet de 2 extraits ajoutés à l'alimentation des poulets sur la colonisation de *Salmonella*.

#### 1.2. CAMPYLOBACTER

*Campylobacter* est la cause la plus fréquente des infections intestinales humaines d'origine



bactérienne dans le monde. Au niveau européen, plus de 200 000 cas de campylobactériose sont signalés annuellement par l'autorité européenne de sécurité sanitaire des aliments (EFSA). Les produits de volaille crus et la contamination croisée sont les principaux facteurs de risque pour l'infection humaine. Les études d'évaluation des risques ont conclu qu'une réduction de *Campylobacter* de 3 log<sub>10</sub> UFC/g dans les intestins de poulet de chair, réduirait l'incidence des infections recensées en santé publique d'au moins 90 %. Par conséquent, plusieurs études ont été mises en place pour proposer des interventions au niveau de la production primaire, telles que l'administration d'additifs non-antibiotiques dans l'alimentation animale ou la vaccination des animaux afin de réduire la quantité de *Campylobacter* dans les animaux vivants. En outre, des stratégies de lutte au niveau de l'abattage et des produits à la distribution sont très importantes pour continuer le processus de réduction de la charge en *Campylobacter* tout au long de la chaîne de production de poulets de chair, de la fourche à la fourchette.

#### **1.2.1. Moyens de luttés au niveau de l'élevage : effet de composés non antibiotiques sur l'excrétion de *Campylobacter***

De 2015 à 2017, l'équipe a continué les efforts sur cette thématique qui se sont traduits par la suite ou la mise en place de plusieurs projets dont un européen (Campybro, Campylow, Algolife, Recap, et Volalgo).

Le projet européen Campybro (2013-2016) et le projet Campylow (2014-2016) se sont terminés en 2016.

Dans les premières phases du projet Campybro (porté par IMASDE Agroalimentaria, en partenariat avec le CIDEF, la FIA, Propollo, NEPLUVI, BTT MikROLAB, REDONDO et CZV) une combinaison de deux additifs alimentaires (un probiotique et un mélange d'acides organiques) avait montré une efficacité vis-à-vis de *Campylobacter in vivo* en animalerie. Lors de la dernière phase du projet, cette combinaison a été testée sur le terrain en France, en Espagne, en Hongrie et aux Pays-Bas. En France la combinaison a été testée chez le poulet de chair et dans des élevages de dindes. Malheureusement l'ajout des produits n'a pas permis de réduire *Campylobacter* chez les volailles. Dans les autres pays européens des résultats similaires ont été observés.

Le projet Campylow (2014-2016) porté par Oniris, et en partenariat avec JEFO, Terrena et Nutrèa) avait pour but d'étudier l'effet d'une souche de *Lactobacillus salivarius* sur la colonisation du poulet par *Campylobacter*. Cependant, les résultats prometteurs d'un premier essai *in vivo* en animalerie confinée n'ont pu être reproduits, en particulier, lorsque dans le but d'une application industrielle future, une distribution du ferment lyophilisé dans l'aliment a été réalisée.

Dans le cadre du projet Algolife, parmi les 50 extraits d'algues testés *in vitro*, 18 ont permis de réduire la croissance de 2 souches de *C. jejuni*, de 6 log<sub>10</sub>CFU/ml par rapport au témoin. Des essais *in vivo* sont prévus pour tester l'effet de 2 extraits ajoutés à l'alimentation des poulets sur la colonisation de *Campylobacter*.

Le projet Recap (2016-2019), labellisé VALORIAL, est porté par Teraxion, en partenariat avec Terrena. Durant ce projet une double approche, l'ajout d'un traitement de l'aliment et de l'environnement (litière + bâtiment) sera testée pour réduire la colonisation du poulet par *Campylobacter*. Par ailleurs une analyse de la composition du microbiote du poulet dans les différentes conditions testées sera également réalisée pour mieux comprendre les interactions existantes entre *Campylobacter* et les autres communautés bactériennes présentes.

Le projet Volalgo (Tremplin Carnot Agrifood Transition, 2017-2018) est porté par le Centre d'Etude et de Valorisation des Algues en partenariat avec zoopôle développement. Il vise à tester l'effet de nouveaux extraits d'algues rouges et brunes vis-à-vis de *Campylobacter* et *Salmonella*. La première phase du projet consiste à produire et caractériser les extraits par le CEVA. Les effets antibactériens *in vitro* puis *in vivo* seront testés sur la colonisation du poulet par *Campylobacter* et *Salmonella*. Les essais *in vivo* seront réalisés en animaleries expérimentales à l'Anses, puis à l'échelle terrain avec zoopôle développement.

#### **1.2.2. Moyens de luttés au niveau de l'élevage : Recherche et caractérisation d'antigènes vaccinaux contre *Campylobacter* par vaccinologie inverse**

Les campylobactérioses sont les infections intestinales bactériennes d'origine alimentaire les plus fréquemment rapportées au sein de l'Union Européenne et sont principalement associées à la consommation de viande de volailles. Une



diminution de la colonisation intestinale des volailles par *Campylobacter* de 2 à 3 log<sub>10</sub> UCF/g permettrait de réduire l'incidence des cas humains de 76 à 100 %. La vaccination aviaire constitue un moyen de lutte potentiel mais, malgré de nombreuses études, aucun vaccin commercial n'est actuellement disponible.

L'objectif de ce projet a été d'identifier de nouveaux antigènes vaccinaux contre *Campylobacter* en appliquant la stratégie de la vaccinologie inverse et d'évaluer leurs pouvoirs immunogène et protecteur contre la colonisation intestinale des volailles. Sur la base de leur localisation subcellulaire, leur antigénicité, leur densité en épitopes B et leur homologie de séquence avec l'ensemble des souches de *C. jejuni* et *C. coli*, quatorze antigènes ont été sélectionnés. Six d'entre eux ont été produits et testés *in vivo* en appliquant un protocole vaccinal optimisé. Quatre antigènes ont montré des diminutions significatives de la charge intestinale des oiseaux de 2 à 4,2 log<sub>10</sub> UFC/g associées à l'induction de réponses humorales spécifiques. L'immunogénicité de ces candidats vaccins et l'efficacité protectrice de deux antigènes ont été observées à nouveau. Ces premiers résultats montrent l'intérêt et la fiabilité de la vaccinologie inverse. L'évaluation du potentiel vaccinal de ces nouveaux antigènes doit être poursuivie et approfondie lors de futures expérimentations.

### 1.2.3. Capacité de différents outils de typage moléculaire pour tracer et définir l'origine des campylobactérioses à *C. jejuni*

*Campylobacter* est responsable de la gastro-entérite bactérienne la plus fréquente en Europe. Des approches de génotypage moléculaire, en particulier la MLST (Multi Locus Sequence Typing), ont été utilisées pour décrire les populations de *Campylobacter* améliorant la compréhension de leur épidémiologie et de leur structure génétique. En outre, la MLST a été largement utilisée pour identifier l'origine de la campylobactériose humaine sur la base des variations alléliques de 7 loci, et a identifié le poulet comme une source d'infection majeure dans plusieurs pays. La disponibilité croissante de génomes bactériens fournit des données sur la variation allélique des loci à travers le génome, ce qui permet d'améliorer la précision de l'attribution des sources.

En utilisant une approche pan-génome de référence et une comparaison systématique gène par gène de plusieurs centaines de génomes de *C. jejuni*, 15

loci ont été choisis comme marqueurs pour l'attribution des sources, puisqu'ils permettaient la ségrégation des isolats en fonction de leur hôte pour identifier l'origine la plus probable de la campylobactériose de 2009 et 2015 en France. À cette fin, une collection de 1067 *C. jejuni* provenant de poulets, de ruminants, d'animaux de compagnie, d'eaux environnementales et de cas cliniques a été caractérisée par MLST et une sous-sélection de 370 isolats a été séquencée.

L'attribution de source utilisant les 15 marqueurs de ségrégation de l'hôte, a montré que les ruminants et les poulets sont impliqués de manière équivalente dans les campylobactérioses en 2009 alors que le poulet était la première source d'infection en 2015. L'utilisation des 15 marqueurs de ségrégation de l'hôte dans l'étude d'attribution de source pour *Campylobacter* a permis une plus grande précision de discrimination des isolats de poulet. En conclusion, le réservoir ruminants semble être une voie de transmission significative pour *C. jejuni* aux humains en France, alors que le rôle important du poulet dans la campylobactériose est confirmé.

## 1.3. CLOSTRIDIUM BOTULINUM

Le botulisme est une pathologie nerveuse commune à l'homme et aux animaux, caractérisée par une paralysie flasque provoquée par l'action de la toxine botulique produite par *C. botulinum*. Cette toxine empêche la transmission du message nerveux, provoquant ainsi une paralysie. Il existe 7 types toxiques caractérisés, annotés de A à G, le botulisme humain étant principalement associé aux types A, B, E et F tandis que le botulisme animal est majoritairement associé aux types C, D et aux types mosaïques C/D et D/C. Les types mosaïques C/D et D/C possèdent respectivement la chaîne légère des types C et D et la chaîne lourde des types D et C. Quelques cas de botulisme aviaire de type E ont été diagnostiqués en France dans des élevages à la fin des années 90 et le dernier cas recensé remonte à 2001. Aucun cas n'a été recensé en France depuis.

### 1.3.1. Développement et validation de la méthode de détection de *C. botulinum* de type C, D, C/D, D/C et E par PCR en temps réel.

Une première étude menée par le LNR entre 2013 et 2015 avait permis de démontrer que l'analyse des foies prélevés sur 4 animaux présentant des symptômes cliniques par PCR en temps réel pour la confirmation du botulisme aviaire en laboratoire



(<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.10.0141075-9964/>).

Cette étude a été suivie du développement de la méthode afin d'optimiser les paramètres suivants :

- Les conditions de conservation des prélèvements
- La prise d'essai
- Méthode d'homogénéisation
- Conditions d'enrichissement (température, conditions d'anaérobiose, temps)
- Méthode d'extraction d'ADN
- Possibilité d'analyser les échantillons en mélange

Des échantillons naturellement contaminés ou artificiellement contaminés ont été utilisés pour optimiser la méthode.

La méthode ainsi développée est la suivante : les foies doivent être prélevés sur des animaux présentant des symptômes de botulisme puis transportés sous régime du froid si la durée entre la réalisation du prélèvement et l'analyse est inférieure à 24h sinon il est conseillé de conserver le prélèvement à une température inférieure à -18°C. Les foies sont ensuite analysés individuellement avec une prise d'essai de maximum 25g diluée au 1/10<sup>ème</sup> en bouillon TPGY. L'échantillon est homogénéisé à l'aide d'un Pulsifier pendant 15 secondes puis incubé au moins 24h à 37°C dans une enceinte anaérobiose. L'extraction d'ADN est ensuite réalisée avec le kit QiaAmp® DNA mini kit (Qiagen) à partir d'1 ml de l'enrichissement. La détection des gènes codant pour les toxines C, D, C/D, D/C et E est réalisée par PCR en temps réel. La méthode a ensuite été validée selon la norme NF-U 47-600-2 : la limite de détection est de 5 spores/g de foie pour les types C et D et 250 spores/g de foie pour le type E. L'analyse de 268 échantillons naturellement contaminés provenant de 73 suspicions de botulisme aviaire a montré une spécificité de 100 % et une sensibilité de 95.35 % (doi:10.1371/journal.pone.0169640.g006).

Ce travail a été financé par la DGAI et réalisé en collaboration avec le LABOCEA, l'unité EBEAC et la plateforme IdentyPath.

Une étude similaire est actuellement en cours pour le diagnostic du botulisme bovin.

### 1.3.2. Etude épidémiologique du botulisme aviaire

L'unité HQPAP participe aux études épidémiologiques conduites par l'unité EBEAC sur le botulisme aviaire en réalisant l'analyse des prélèvements de terrain réalisés au cours des enquêtes menées dans les élevages ayant eu un épisode de botulisme.

Une étude a débuté en 2015 et a pour objectif d'une part d'évaluer la contamination par *C. botulinum* des fumiers d'élevages de volaille et d'autre part d'évaluer le portage de *C. botulinum* dans les foies et caeca d'animaux provenant d'élevages atteints et indemnes de botulisme. Les premiers résultats de cette étude montrent une forte persistance de *C. botulinum* dans les fumiers suite à un épisode de botulisme avec une augmentation du nombre de prélèvements positifs au cours du temps et une contamination persistante des foies et caeca chez les animaux issus de ces lots. La mise en place de mesures appropriées pour la gestion du fumier suite à un épisode de botulisme aviaire est indispensable. Cinq élevages sans historique de botulisme ont été investigués. Un seul d'entre eux était positif en D/C pour 5 prélèvements de fumier sur 30 analysés et un caecum de dinde sur les 5 analysés. Ce résultat est le premier démontrant la présence de *C. botulinum* de type D/C dans un élevage de volaille sans historique de botulisme. Une étude sur un plus grand nombre d'élevages sains est nécessaire pour confirmer ce résultat.

Cette étude a fait l'objet d'un financement par la DGAI.

Au niveau moléculaire, l'unité HQPAP est associée aux travaux menés par la plateforme IdentyPath (LNR associé) : 17 souches de *C. botulinum* de type C/D et D/C, isolées de bovins et de volaille ont ainsi été séquencées en 2015.

L'analyse des séquences a montré que les souches françaises sont très proches des autres souches européennes qui ont déjà été séquencées. Différentes méthodes d'analyse ont été testées pour comparer les génomes : CRISPR, phage typing, profil Single Nucleotide Polymorphism (SNP), comparaison des génomes complets. Les souches présentent un degré élevé de parenté au niveau génétique quelle que soit l'origine géographique ou la source. La comparaison des génomes complets et des SNP a permis de montrer que 3 des 17 souches séquencées présentent un profil légèrement différent des autres souches. Ces 3 souches ont été isolées d'épisodes en poulet de chair sur la même période que les autres souches,



montrant qu'il y a probablement au moins 2 groupes de souches impliquées dans les épisodes de botulisme aviaire en France sur la période 2008-2012. L'analyse des génomes a également permis de montrer une variabilité au niveau des éléments génétiques mobiles entre les souches. Ces travaux se poursuivent, notamment via l'investigation des plasmides présents dans les souches de *C. botulinum* du groupe III.

### **1.3.3. Suivi d'un épisode de botulisme aviaire dans un élevage de poudeuses plein air.**

Une étude a été menée conjointement avec l'unité EBEAC dans un élevage de poules poudeuses plein air dans lequel un épisode de botulisme aviaire de type C/D avait été confirmé. L'objectif de cette étude était d'étudier la persistance et la diffusion de *C. botulinum* de type C/D en présence des animaux dans l'élevage dans les six mois qui ont suivi l'épisode. Pour cela, 5 visites ont été réalisées au cours desquelles des prélèvements d'environnement ont été collectés ainsi que des œufs ou des chiffonnettes réalisées sur des œufs. La détection du pathogène a été réalisée par PCR en temps réel après enrichissement du prélèvement pendant au moins 4 jours en anaérobiose à 37°C en bouillon TPGY. *C. botulinum* de type C/D a été détecté dans 16,4 % des échantillons. Cette étude a permis de montrer qu'il était toujours possible de détecter *C. botulinum* de type C/D cinq mois après l'épisode, notamment sur les murs, le circuit des œufs et les coquilles d'œufs.

<http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2016.1240355>

### **1.3.4. Etude d'un épisode de botulisme bovin et suspicion de contamination croisée avec un élevage de volaille.**

Une étude a été menée conjointement avec l'unité EBEAC et le GDS Bretagne pour réaliser des investigations épidémiologiques dans le cadre d'un épisode de botulisme bovin de type D/C qui concernait deux élevages bovins et un élevage de volailles situé à proximité de ces deux élevages et qui avait transféré du fumier dans les deux élevages bovins juste avant l'apparition des symptômes. Les objectifs de l'étude étaient d'évaluer la contamination de l'élevage de volaille en *C. botulinum* de type D/C et d'identifier la source de contamination à l'origine des deux foyers bovins. Sept prélèvements sur les 11 réalisés dans l'élevage de volailles se sont révélés positifs pour *C. botulinum* de type D/C montrant que l'élevage constituait un potentiel réservoir de *C. botulinum* de type D/C. Dans un des élevages

bovins, l'ensilage d'herbe était positif pour *C. botulinum* de type D/C. Cet ensilage avait été produit à partir d'un champ sur lequel du fumier provenant de l'élevage de volaille avait été stocké. Une pédichiffonnette réalisée dans une pâture était également positive. Dans le second élevage bovin, *C. botulinum* de type D/C avait été détecté dans le tas de fumier provenant de l'élevage de volaille et dans une pédichiffonnette réalisée sur une pâture. Ces résultats montrent que l'élevage de volaille pourrait être la source à l'origine de la contamination des deux élevages bovins. Des analyses de génotypage des souches sont néanmoins nécessaires pour le démontrer formellement. Cette étude montre la nécessité de la mise en place de mesures de biosécurité appropriées dans les élevages afin de prévenir les contaminations croisées. Il est en particulier essentiel de ne pas exposer les bovins à du fumier de volailles, qui peut constituer une source de *C. botulinum* de type D/C.

Cette étude a été financée par le GDS Bretagne et a été récemment publiée dans la revue *Veterinary Microbiology*.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.07.022>

### **1.3.5. Moyens de lutte à l'élevage**

Dans le cadre du projet Algolife, pour évaluer l'effet que les extraits d'algues pourraient avoir sur la croissance de *Clostridium botulinum*, une souche modèle de *Clostridium novyi* a été utilisée. Ils ont également été testés sur une souche de *Clostridium perfringens*. Parmi les 50 extraits testés, 6 ont permis de réduire de la croissance des 2 souches de 4 à 6 log<sub>10</sub>CFU/ml par rapport au témoin.

## **2. Appui scientifique et technique**

L'Unité HQPAP assure 4 mandats de référence (LNR *Salmonella* et salmonelloses aviaires, *Campylobacter*, botulisme aviaire) et des missions d'expertise aux niveaux national et international.

### **2.1. LNR *Salmonella* et salmonelloses aviaires**

Deux unités assurent les activités du LNR, l'unité HQPAP à Ploufragan (coordonnateur) et l'unité SEL à Maisons-Alfort. Le rapport annuel d'activité donne l'ensemble des activités du LNR. Il est disponible sur le site de l'Anses.



L'unité HQPAP participe aux essais de détection proposés par le laboratoire de référence de l'Union Européenne (LR UE). L'unité HQPAP a organisé à destination des laboratoires français accrédités pour le Programme N 116 du COFRAC deux essais inter-laboratoires d'aptitude (EILA) pour la recherche de *Salmonella spp.* dans les échantillons au stade de la production primaire en 2016 et 2017. L'unité SEL a également organisé deux EILA sérotypage des *Salmonella*. Ces EILA ont concerné chaque année, plus de 57 participants.

L'unité HQPAP a également organisé en partenariat avec ACTALIA cecalait (sous-traitance pour la préparation des échantillons) à destination des laboratoires français accrédités pour le Programme LAB GTA 59 du COFRAC deux EILA pour la recherche de *Salmonella spp.* dans les aliments en 2016 et 2017. Ces EILA ont concernés chaque année plus de 70 participants.

### 2.1.1. Exploitation des données de la souchothèque

De récentes épidémies de salmonelloses, survenues en lien avec la consommation d'aliments contaminés, soulignent l'importance de maintenir une surveillance des salmonelles tout au long de la chaîne alimentaire.

L'unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins, Laboratoire National de Référence *Salmonella*, détient une souchothèque des salmonelles réglementées, depuis la mise en place des notes de service de la Direction Générale de l'Alimentation en 2007. Ces notes de service portent sur l'obligation de conserver les souches de *Salmonella* isolées à partir des élevages lors de contrôles officiels pendant au moins 2 ans.

Cette souchothèque permet (i) d'analyser la tendance de l'infection à *Salmonella spp.* dans la filière avicole en France et (ii) de caractériser spécifiquement certaines souches de *Salmonella spp.* afin de rechercher l'origine de la contamination et d'établir des relations entre les isolats.

L'analyse récente de ces données a montré que *S. Enteritidis* et *Salmonella* Typhimurium continuent de figurer parmi les principaux sérovars retrouvés dans la filière avicole et a souligné l'augmentation de sérovars non réglementés tels que *Salmonella* Senftenberg ou *Salmonella* Montevideo.

Une augmentation des cas à *S. Enteritidis* dans les élevages entre 2014 et 2016 a suscité la mise en

place d'enquêtes par la DGA afin de mieux comprendre l'origine de contamination des souches et la possible transmission de celles-ci à travers les stades de productions dans les élevages. Plusieurs isolats de *S. Enteritidis*, ont été recueillis et analysés par PFGE (électrophorèse en champ pulsé). Les dendrogrammes obtenus ont révélé des pulsotypes distincts de *S. Enteritidis*, mais également des isolats persistants et communs circulant à travers les différents stades de la production avicole, démontrant même une possible contamination des animaux à partir de l'alimentation ou de moyens de transport.

Cette collecte des souches par le LNR est un outil important dans la surveillance épidémiologique des souches de *Salmonella spp.*

### 2.2. LNR *Campylobacter*

Le laboratoire de Ploufragan est Laboratoire National de Référence pour *Campylobacter*.

Tous les ans, le LNR participe à des Essais d'Aptitude organisés par le laboratoire européen en vue du maintien de ses compétences pour la détection de *Campylobacter* à partir de différentes matrices, viande, peau de cou, caecas, chiffonnettes. Ces échantillons sont issus principalement de la filière volaille.

Tous les ans, le LNR organise pour les laboratoires français accrédités EN NF ISO 10272 un EILA pour la recherche de *Campylobacter*. En 2017, il a également organisé un EILA pour le dénombrement de *Campylobacter*. Les matrices sont des matrices viandes ou peaux de cou de poulet. A ces essais, participent des laboratoires agréés mais aussi des laboratoires non agréés.

Le LNR sur la période s'est intéressé à la performance de plusieurs milieux d'isolement commercialisés (en poudre ou prêt à l'emploi) en vue d'optimiser la détection de *Campylobacter* à partir de matrices riche en flore annexe comme les caecas ou peaux de cou de poulet.

Le LNR sur la période s'est également impliqué dans la relecture de la nouvelle version de la norme EN NF ISO 10272. Celle-ci a été publiée en juillet 2017, avec son domaine d'application qui s'est élargi à la production primaire.

Cette année 2017 est marquée aussi par la publication au journal officiel de l'UE le 23 août 2017 du Règlement (UE) 2017/1495 relatif à la définition d'un critère d'hygiène des procédés pour *Campylobacter* sur les carcasses de poulets de chair après ressuage à l'abattoir.



Le LNR, et certains agents de l'unité ont été impliqués dans l'organisation du congrès international CHRO (*Campylobacter*, *Helicobacter* et autres) en tant que membre du comité d'organisation et/ou du comité scientifique. Ce congrès a eu lieu à Nantes en septembre 2017.

### 2.3. LNR Botulisme aviaire

Depuis octobre 2011, notre laboratoire a été désigné par la DGAI Laboratoire National de Référence pour le botulisme aviaire. Les activités sont réparties sur 3 unités : les unités HQPAP et EBEAC du laboratoire de Ploufragan et la plateforme Identypath du Laboratoire de Sécurité des Aliments de l'Anses à Maisons-Alfort. Les activités ont débuté en 2012 et une méthode de détection de *C. botulinum* de type C, D, C/D, D/C et E dans le foie d'origine aviaire a été développée et validée. Des travaux d'AST et de recherche en relation avec cette thématique récente (cf. 1.3) ont également été réalisés.

### 2.4. Autres activités d'expertise

L'unité participe régulièrement à des travaux d'expertise aux niveaux national (saisines Anses) et européen (groupes de travail auprès de l'agence européenne de sécurité sanitaire des aliments EFSA). Depuis juillet 2015, un membre de l'unité a intégré le panel d'experts « biohaz » de l'EFSA, en lien avec les pathogènes microbiologiques dans la chaîne alimentaire.

### 2.5. Fourniture de réactifs

L'unité produit et distribue les sérums témoins positifs et négatifs pour les tests de séroconversion de volailles vis-à-vis de *Salmonella*

Pullorum/Gallinarum (Norme NFU 47-034). La production de ces sérums a été l'occasion de confirmer la sensibilité des antigènes utilisés en France dans la surveillance d'une contamination vis-à-vis des deux biotypes Gallinarum et Pullorum.

Le sérum produit par l'Anses de Sophia-Antipolis pour les tests de séroconversion des ovins vis-à-vis de *Salmonella* Abortusovis (Norme NFU 47-014) est distribué par l'unité HQPAP.

### 3. Formation et dissémination des résultats

Sur la période considérée, l'unité HQPAP a accueilli des stagiaires universitaires ou vétérinaires de France et de l'étranger. Les scientifiques de l'unité continuent de dispenser des enseignements auprès de l'université de Rennes, les IUT de Vannes, Saint-Brieuc et de Quimper.

La diffusion des résultats obtenus dans les études décrites ci-dessus est de façon privilégiée orientée vers la rédaction d'articles scientifiques dans des revues internationales et vers la communication orale au cours de congrès internationaux ou sous forme de posters. En parallèle, les scientifiques de l'unité HQPAP participent à des congrès nationaux ou à des journées professionnelles qui sont autant d'occasion de diffuser ces résultats en France.

La liste des références de l'unité HQPAP est disponible sur demande auprès de la correspondante communication de l'Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané (mél: [elisabeth.reperant@anses.fr](mailto:elisabeth.reperant@anses.fr))



## UNITE GENETIQUE VIRALE ET BIOSECURITE

Effectif : 16 personnes sur la période considérée, dont 9 scientifiques ingénieurs et assistants ingénieurs (incluant 2 doctorant) et 7 techniciens ou agents techniques

Chef d'unité : Yannick BLANCHARD, Chef d'unité adjoint : Béatrice GRASLAND

L'UGVB n'a pas de mandat officiel de référence (LNR, CNR ou LR-UE) mais a développé une partie importante de son activité dans des projets propres essentiellement liés aux virus porcins (circovirus, coronavirus) (Béatrice Grasland) et à la caractérisation chez le porc de séquences rétrovirales et plus spécifiquement des intégrases rétrovirales (Yannick Blanchard), à cela s'ajoutent des travaux portant sur les questions de biosécurité lié à l'utilisation d'ADN plasmidiques (réplicatifs ou non) dans un but vaccinal (Daniel Dory).

Ces travaux ont permis d'établir de nombreuses collaborations avec d'autres unités de Ploufragan ou au sein de réseaux internationaux (réseau d'excellence Epizone, projet infrastructure NADIR, VetBioNet)

L'expertise développée en virologie moléculaire, au cours des 25 années d'existence de l'UGVB avait permis la conception d'une plateforme génomique haute densité par microarray pour l'investigation des émergences virales et l'étude des interactions hôtes-pathogènes. Le développement méthodologique s'est poursuivi ces dernières années avec l'acquisition d'un savoir-faire dans les nouvelles techniques de séquençages dites NGS (Next Generation Sequencing). Ces techniques sont basées sur l'acquisition de grandes quantités de données et nécessitent des compétences et des capacités de traitement bioinformatiques importants ce qui a conduit l'unité à se doter d'une équipe de bioinformaticiens par le recrutement en 2012 puis en 2014 de scientifiques dédiés à la bio-informatique. Fin 2013 l'acquisition d'un séquenceur de nouvelle génération de type Ion Proton (acquisition co-financée par l'Anses, la région Bretagne et le programme FEDER), a complété le dispositif en dotant l'Anses, et le laboratoire de Ploufragan, à la fois des capacités de séquençage haut débit et de traitement des données générées. Cette structuration, officialisée sous la forme d'une plate-forme Anses nationale de séquençage haut-débit accessible aux autres

laboratoires de l'Anses et aux instituts partenaires dans le cadre de programmes de recherche collaborative, nous permet de traiter de façon autonome des échantillons ce qui est déterminant quand une grande réactivité est demandée (ex : émergence). Ces capacités ont été déterminantes dans l'acceptation et le financement de différents projets de recherche collaboratifs actuellement en cours (programme FAM antibiorésistance, programmes européens COMPARE, METASTAVA, LISTADAPT...) et dans de nombreux travaux directement en lien avec la filière avicole en collaboration avec les unités HQPAP, MB, VIPAC et EBEAC, dont vous trouverez les comptes rendus dans les rubriques des différentes unités du Laboratoire.

En plus de la mise en place de la plateforme génomique l'UGVB continue à affirmer sa vocation à aborder des problématiques transversales en poursuivant le développement de ses partenariats; l'expertise acquise en vaccinologie est ainsi à l'origine de la collaboration avec l'unité HQPAP dans le programme européen CAMPYBRO, dans lequel une étudiante en thèse a été dirigée conjointement par l'HQPAP (voir rapport de cette unité) et l'UGVB. Une approche de vaccinologie inverse a permis d'identifier dans l'ensemble du génome de *Campylobacter* 14 nouveaux antigènes potentiellement vaccinaux. Les pouvoirs protecteurs de 6 de ces antigènes ont été évalués chez le poulet. Sur les 6 antigènes évalués, 2 se sont révélés particulièrement prometteurs pour induire une protection vaccinale suffisamment efficace pour réduire les titres de *Campylobacter* de 2 à 4,2 log CFU/g.

Plusieurs unités et service de l'Anses Ploufragan-Plouzané sont associés dans le projet Algolife (2014-2019), financé par la Banque Publique d'Investissement. Ce projet, dont la coordination scientifique a été confiée à l'UGVB (Béatrice Grasland), fait aussi intervenir plusieurs partenaires externes (SICA, Amadeite, Diana Petfood, Triballat, la Station Biologique de



Roscoff) L'objectif général de ce projet est l'enrichissement et la transformation de macroalgues pour l'extraction de molécules bioactives

destinées aux marchés de la nutrition de la santé humaine et animale dont celle des volailles.



## UNITE MYCOPLASMOLOGIE BACTERIOLOGIE

Effectif : 14 personnes dont 6 scientifiques ou doctorants et 8 techniciens ou agents techniques

Chef d'unité : Isabelle KEMPF, Chef d'unité adjoint : Corinne MAROIS

### Introduction

Les activités de recherche de l'Unité Mycoplasmiologie Bactériologie concernent les filières avicoles, porcines et piscicoles et leur environnement. Pour ce qui concerne les filières avicoles, les activités sont réalisées par sept scientifiques ou techniciens, travaillant également pour les autres filières (soit environ 4 Equivalents Temps Plein Travaillé pour la filière avicole). Nos activités sont orientées vers l'acquisition de connaissances relatives aux mycoplasmes et bactéries des volailles et de leur environnement et à leur bio-résistance. Les fonds qui financent nos recherches sont soit publics (départementaux, régionaux, nationaux, européens, bourse Equatorienne), soit privés (conventions).

L'Anses a vu renouveler son mandat de **laboratoire national de référence pour l'antibiorésistance** (Arrêté du 7 décembre 2016). Au sein du LNR Antibiorésistance (quatre laboratoires Anses), les missions de notre unité comprennent, outre les activités de recherche et développement, la surveillance officielle de la résistance de *Campylobacter* pour les filières avicoles, la co-animation technique des laboratoires participant à Resapath ou aux plans de surveillance, la gestion des données des filières aviaires et porcines de Resapath ou encore la participation au conseil scientifique de l'Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques (Onerba) et au groupe de travail vétérinaire du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).

L'UMB est également **LNR pour les mycoplasmoses aviaires** (Arrêté du 7 décembre 2016). Elle assure des activités de recherche, de formation, d'expertise scientifique et technique auprès des acteurs de la filière, de veille scientifique et technique, de fourniture de réactifs de référence et de constitution et gestion d'une souchothèque / échantillothèque relative aux mycoplasmes aviaires.

Sur le plan de l'assurance qualité, l'unité a maintenu son **accréditation COFRAC** au titre de la norme NF EN ISO/CEI 17025 (agglutination rapide sur lame pour le dépistage des mycoplasmoses aviaires, antibiogramme et détermination des concentrations minimales inhibitrices d'antibiotiques pour *Campylobacter*).

Trois scientifiques de l'unité ont contribué à l'organisation scientifique de différents congrès scientifiques (JRA2017 à La Rochelle, WVPA2017 à Edinbourg, CHRO 2017 à Nantes, Colloque International Francophone de Microbiologie Animale, à Liège) en participant à la sélection des communications ou à l'animation scientifique. Ils contribuent également à l'évaluation scientifique d'articles pour des revues internationales ou à l'expertise de projets de recherche (évaluation de 12 articles ou projets de 2015 à 2017)

En matière de formation, les scientifiques de l'unité dispensent des cours dans les Ecoles Nationales Vétérinaires (CEAV, Master ManImal, Master qualité et environnement en productions animales), à Avipole formation et contribuent à l'accueil de stagiaires (niveau Bac+2 à Master 2) et de doctorants.

### 1. Antibiorésistance

#### 1.1. Résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G) chez *E. coli*

Au cours des années précédentes, plusieurs projets de recherche nous ont permis de mettre en évidence l'émergence dans la filière avicole, comme dans d'autres filières de production animale, de la résistance des Entérobactéries commensales ou pathogènes vis-à-vis des C3G, une famille d'antibiotiques critiques pour la santé humaine.

Au cours de ces dernières années, la surveillance de la prévalence de cette résistance en filières avicoles a été basée sur les données du réseau



RESAPATH (voir ci-dessous) pour les souches pathogènes. Pour les souches commensales, les plans de surveillance à l'abattoir, basés maintenant sur la décision 2013/652/UE sont mis en place sous la direction de la DGAL, avec l'aide des services vétérinaires, des laboratoires agréés pour l'isolement et l'identification des espèces bactériennes cibles et du LNR Résistance Antimicrobienne pour les analyses officielles de première intention et le transfert des données à l'EFSA. Cette surveillance a été conduite par le laboratoire Anses de Fougères sur les filières poulets de chair et dindes de chair en 2016, et a consisté en l'analyse de la sensibilité de souches commensales de *E. coli* isolées de caeca de poulets et de dindes et la recherche sélective de *E. coli* résistantes aux C3G et/ou carbapénèmes (respectivement par production de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) ou de céphalosporinase (AmpC) ou de carbapénémases) dans les caeca de poulets et de dindes et la viande de poulet au stade de la distribution. Pour les caeca, 3,2% et 0,5% des souches de poulet et de dinde respectivement étaient résistantes aux C3G, avec des profils évoquant la production de BLSE, aucune souche n'était résistante aux carbapénèmes. Les recherches sélectives ont montré qu'environ 44% des caeca de poulet et 28% des caeca de dinde contenaient au moins une souche présentant une résistance aux C3G de type BLSE/AmpC et que la prévalence atteignait 62,3% dans les échantillons de viande de poulet en 2016 (*Laboratoires Anses du LNR Antibiorésistance, 2017*). Cette première enquête de prévalence montre ainsi que, si un faible pourcentage de souches des caeca de volailles sont résistantes aux C3G, les pourcentages de lots de volailles ou d'échantillons de viande contenant des souches de *E. coli* résistantes aux C3G sont relativement élevés. Il est important de mieux comprendre l'épidémiologie de cette résistance vis-à-vis de molécules d'importance critique.

Ainsi, pour mieux comprendre les modalités de transmission de cette résistance entre animaux, élevages, types de production, productions animales ou entre les compartiments Homme, Animal et Environnement, il est capital de mieux tracer les gènes et leurs principaux vecteurs, à savoir les plasmides. En effet, la résistance aux C3G chez les Entérobactéries résulte le plus souvent de la production de BLSE. Ces enzymes sont très fréquemment codées par des gènes portés par des plasmides, c'est à dire des éléments génétiques mobiles susceptibles d'être transférés entre différentes souches bactériennes ou entre

espèces bactériennes différentes. Dans ce but, l'UMB, avec le concours de l'Unité GVB a conduit deux projets depuis 2014, afin de séquencer près de 150 plasmides dont une centaine provenant des filières avicoles (souches commensales, pathogènes ou isolées de viandes, de poulets, pondeuses, dindes, canard, pintade), les autres plasmides provenant d'autres productions ou d'environnement. Les projets étaient financés par le consortium d'établissements de recherche européens COVETLAB rassemblant des équipes hollandaise, suédoise, anglaise et française ou par le Ministère de l'Agriculture dans le cadre du plan EcoAntibio.

A l'heure actuelle nous avons pu mettre en évidence une grande homogénéité des plasmides d'origine avicole, représentés majoritairement par des plasmides d'environ 100-110 kpb, porteurs d'un réplicon de type IncII, pMLST3 et comportant les gènes de résistance *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (résistance aux C3G), *sul2* (résistance aux sulfamides) et *tet(A)* (résistance aux tétracyclines). Les séquences de ces plasmides IncII, pMLST3 ont un très fort pourcentage d'identité entre elles et avec celles des plasmides décrits à l'étranger et dans d'autres filières. D'autres plasmides de type IncII pMLST12 et porteurs du seul gène de résistance aux C3G *bla*<sub>CMY-2</sub> sont également présents et leurs séquences sont très proches de celles de plasmides décrits pour d'autres Entérobactéries (*Salmonella*) à l'étranger. Malheureusement cette très forte dominance de quelques plasmides complique l'analyse des voies de transmission de cette résistance (*Baron et al, 2016, Lucas et al, 2017, Touzain et al, 2017*).

## 1.2. Recherche du SARM à partir d'écouvillons cloacaux de volailles à l'abattoir

Dans le cadre de l'étude Accroch'air de l'UMT Sanivol (cf. Unité EBEAC), une attention particulière a été portée au *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM). Ce phénotype de résistance, bien connu de la médecine humaine, est également décrit chez les animaux de rente depuis 2005. Afin d'évaluer le portage de SARM chez différentes espèces de volailles en France, vingt-huit lots de 10 animaux ont été prélevés par écouvillonnage cloacal individuel. Les espèces animales étaient le poulet (n=17), la dinde (n=6), le canard (n=3), la pintade (n=1) et le pigeon (n=1). Les 28 lots ont été prélevés de mai 2015 à janvier 2016, dans 26 abattoirs différents, au cours de 28



jours différents. Au sein de l'unité MB, ces 280 écouvillons ont été analysés par étalement direct sur gélose Chromagar MRSA (I2a, Montpellier, France) suivie d'une incubation à 37°C pendant 18h à 24h. Les colonies de taille et couleur caractéristiques ou suspectes ont ensuite été analysées par PCR pour leur identification. Les colonies non colorées mais de taille compatible avec la croissance d'un staphylocoque ont également été analysées par PCR. Les gènes *mecA* et *mecC*, caractéristiques de la méticillino-résistance, ont également été recherchés par PCR.

Aucune colonie strictement caractéristique de SARM n'a été détectée. En revanche, parmi les colonies suspectes et celles non colorées, des staphylocoques non *aureus* possédant le gène *mecA* ont été détectés dans 12 lots (43 %) et 85 animaux (30 %), avec une représentation de toutes les espèces animales étudiées : le poulet (n=57, 7 lots), le canard (n=14, 2 lots), la dinde (n=6, 1 lot), la pintade (n=7, 1 lot) et le pigeon (n=1, 1 lot).

Comme dans d'autres pays, et pas uniquement chez la volaille, cette étude a révélé un portage animal de staphylocoques non *aureus* possédant le gène *mecA*. Cependant aucun SARM n'a été mis en évidence au sein de la flore bactérienne fécale dominante des animaux prélevés. Il ne peut néanmoins pas être exclu que cette bactérie puisse être présente en faible quantité.

### 1.3. Résistance à la colistine

Découverte à la fin des années 40, la colistine est utilisée depuis des décennies en médecine vétérinaire. Longtemps délaissée chez l'Homme, elle connaît un regain d'intérêt depuis le début des années 2000 notamment pour soigner les infections à bacilles Gram négatif multirésistants. Jusqu'en 2015, seules des mutations chromosomiques étaient décrites pour expliquer la résistance bactérienne à cet antibiotique, avant la découverte du premier gène de résistance plasmidique en Chine. Ce gène, dénommé *mcr-1* (mediated colistine resistance), code pour une enzyme (la phosphoethanolamine transférase) qui modifie l'un des constituants de la paroi bactérienne (le lipopolysaccharide) rendant ainsi la bactérie résistante à la colistine. Suite à cette découverte, de très nombreuses études ont mis en évidence la répartition mondiale de ce gène chez des bactéries isolées chez l'Homme et chez l'animal (Kempf et al, 2016). Depuis, la « famille *mcr* » s'est agrandie avec 4 membres supplémentaires, ainsi que des

variants présentant quelques mutations pour certains d'entre eux. Le dernier membre en date (septembre 2017), *mcr-5*, a été identifié chez plusieurs souches de *Salmonella* Paratyphi B d'origines avicole ou environnementale isolées en 2012, en Allemagne.

La détection de la résistance à la colistine au laboratoire est donc un enjeu majeur, d'autant que certaines méthodes ont été mises en défaut. La méthode par diffusion à partir des disques, largement utilisée par les laboratoires d'analyses vétérinaires en France, n'est ainsi pas la plus adaptée pour la colistine. La technique de référence est actuellement la microdilution en milieu liquide mais la transposition de cette méthode dans le cadre du diagnostic vétérinaire n'est pas évidente.

Compte-tenu de ces difficultés, l'Anses a développé un test alternatif simple, le Colispot, présenté aux laboratoires adhérant au Résapath le 29 novembre 2016 et publié en janvier 2017 (Jouy et al., 2017). Ce test, dédié à *E. coli*, consiste en un dépôt de 10 µL d'une solution de colistine à 8 mg/L sur une gélose de Mueller-Hinton préalablementensemencée avec la souche à étudier (de la même manière que pour un antibiogramme). Après incubation, la présence d'une zone d'inhibition (environ 10 mm) indique une sensibilité et son absence indique une résistance.

Au cours de l'année 2017, parallèlement à l'appropriation de ce test par certains laboratoires d'analyses adhérant au Résapath, l'Anses a confronté le test Colispot à la technique de mesure de concentrations minimales inhibitrices (CMI) en microplaques Sensititre® (Thermo®). Pour les entérobactéries, une souche est considérée résistante à la colistine à partir d'une CMI strictement supérieure à 2 mg/L.

Cent quatre-vingt-dix-sept *E. coli* isolés entre 2011 et 2017 au cours d'infections chez le porc (n=116) et la volaille (n=81), transmis à l'Anses dans le cadre du Résapath en raison de leur phénotype de résistance, ont été étudiés à l'aide des deux méthodes précitées, en y associant la recherche des gènes *mcr-1* et *mcr-2* par PCR. Cette collection de souches est différente de celle ayant servi au développement du test Colispot.

Les CMI étaient comprises entre 0,25 et 1 mg/L pour 133 souches et entre 4 et 16 mg/L pour les 64 autres, toutes d'origine porcine. Le test Colispot n'a donné aucune zone d'inhibition pour les 64 souches résistantes alors que les 133 sensibles ont été inhibées. Le gène *mcr-1* (mais pas *mcr-2*) a été



détecté dans 87,5 % des souches résistantes et jamais dans les souches sensibles.

Le test Colispot permet donc la détection fiable de la résistance à la colistine chez *E. coli* tout en évitant le recours à une mesure de CMI en routine. Il apporte ainsi une information utile, tant pour le vétérinaire praticien que pour la surveillance de l'antibiorésistance.

#### 1.4. Resapath

En France, la surveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes pour les animaux est assurée par le Résapath (fédéré à l'Onerba), qui collige les résultats d'antibiogrammes (méthode de diffusion à partir de disques) auprès des laboratoires d'analyses vétérinaires adhérant à ce réseau (Anses, 2017).

Entre 2003 et 2016, 81534 antibiogrammes relatifs à la volaille ont été enregistrés par l'Anses via le réseau Résapath. Ils ont été transmis par 77 laboratoires sur cette période, dont 12 représentaient 90 % des données. Parmi la volaille, le groupe des poules pondeuses et des poulets de chair (*Gallus gallus*) ainsi que la dinde représentaient la majorité des antibiogrammes réalisés avec respectivement 52 % et 28 % des données.

Chez ces espèces animales, c'est *E. coli* qui a fait l'objet de la majorité des antibiogrammes : 81 % chez *Gallus gallus* et 76 % chez la dinde. Pour cette bactérie, les principaux points marquants concernant les proportions de souches non sensibles (intermédiaires ou résistantes) sont :

- Une stabilité pour le ceftiofur au cours de ces deux dernières années (2015 et 2016), autour de 2,5 % pour *Gallus gallus* et 1 % pour la dinde. Pour ces deux espèces animales, la proportion maximale a été obtenue respectivement en 2010 (22,5 %) et en 2011 (5 %).
- Une diminution en 2016 pour l'enrofloxacin : 7 % chez *Gallus gallus* et 5 % chez la dinde, après une augmentation entre 2013 et 2015. Pour ces deux espèces animales, la proportion maximale a été obtenue respectivement en 2009 (12,6 %) et en 2010 (14 %).
- Une augmentation, entre 2014 et 2016, pour l'acide oxolinique (35,9 % à 45,7 %) et la fluméquine (34,1 % à 42,5 %) pour *Gallus gallus*. Ce phénomène n'est pas observé pour la dinde.

- Une stabilité pour la gentamicine chez *Gallus gallus* en 2016 (6,5 %), après une augmentation entre 2011 (3,1 %) et 2015 (7,3 %).
- Une diminution importante pour l'association triméthoprime-sulfamide entre 2003 et 2016 : 35,5 % à 25,7 % pour *Gallus gallus* et 44,1 % à 24,7 % pour la dinde.
- Une diminution très importante pour la tétracycline entre 2003 et 2016 : 70,4 % à 41,8 % pour *Gallus gallus* et 87,6 % à 41,6 %. La tétracycline n'est ainsi plus l'antibiotique avec la résistance la plus élevée, les plus fortes proportions étant observées pour l'acide oxolinique chez *Gallus gallus* (45,7 %) et l'amoxicilline chez la dinde (49,5 %) en 2016. (Anses, 2017)

#### 1.5. Surveillance de l'antibiorésistance des souches de *Campylobacter* isolées de poulets de chair et de dindes à l'abattoir

L'UMB participe aux travaux effectués dans le cadre de la surveillance de la résistance aux antibiotiques des bactéries sentinelles et responsables de zoonoses. Comme indiqué précédemment pour la surveillance des souches commensales de *E. coli*, cette surveillance est organisée en collaboration avec la DGAL, les services vétérinaires, les laboratoires d'analyses vétérinaires et les laboratoires du LNR Antibiorésistance. L'UMB est plus particulièrement en charge de la surveillance de la résistance des *Campylobacter* isolés de caeca de poulets de chair et de dindes de chair prélevés à l'abattoir.

La surveillance de la résistance aux antibiotiques des souches de *Campylobacter* a été effectuée à partir des souches isolées en 2016 par les laboratoires départementaux d'analyses vétérinaires. Depuis 2014, après la mise en place de la décision 2013/652/UE, le plan d'échantillonnage permet d'assurer l'analyse d'environ 170 souches de *C. jejuni* de poulets de chair ou de dindes de chair. La sensibilité des souches de *C. jejuni* a été étudiée par la méthode de micro-dilution en milieu liquide basée sur la norme CLSI Vet01-A4. Les résultats sont présentés dans le tableau 1. Plus de la moitié des souches sont résistantes aux fluoroquinolones mais les *C. jejuni* sont le plus souvent sensibles aux macrolides et aux aminosides.

Pour les souches de poulets de chair, le profil de résistance le plus fréquent est la résistance aux



quinolones/fluoroquinolones et à la tétracycline, qui est observée pour 102 souches soit 54% des souches testées. Aucune souche n'est résistante à plus de deux familles d'antibiotiques testés.

Pour les souches de dindes, le profil le plus fréquent est également la résistance aux

quinolones/fluoroquinolones et à la tétracycline qui est observée pour 83 souches soit 50,6% des souches testées. Une seule souche est résistante à un maximum de trois familles d'antibiotiques (fluoroquinolones, tétracycline et streptomycine). (*Laboratoires Anses du LNR Antibiorésistance, 2017*).

Tableau 1 : Pourcentage de résistance des souches de *Campylobacter jejuni* en 2016.

<i>C. jejuni</i> Antibiotiques (Seuil épidémiologique en mg/L)	Poulet (N=188)		Dinde (N=164)	
	n*	% [intervalle de confiance]	n*	% [intervalle de confiance]
Erythromycine (4)	0	0,0 [0,0-1,6]	0	0.0 [0-1.8]
Ciprofloxacine (0,5)	123	65,4 [58,6-72,2]	95	57.9 [50.4-65.5]
Acide nalidixique (16)	119	63,3[56,4-70,2]	88	53.7 [46.0-61.3]
Tétracycline (1)	127	67,6 [60,9-74,2]	115	70.1 [63.1-77.1]
Gentamicine (2)	0	0,0 [0,0-1,6]	0	0.0 [0-1.8]
Streptomycine (4)	2	1,1 [0,0-2,5]	1	0.6 [0-1.8]

\*nombre de souches résistantes

## 1.6. Alternatives aux antibiotiques

En 2016, notre unité a été sollicitée par le laboratoire du DTU (LRUE Antibiorésistance, Danemark) pour évaluer l'activité de peptides antimicrobiens vis-à-vis de la colonisation du poulet par *Campylobacter*. L'essai réalisé sur poulets n'a pas permis de mettre en évidence un effet protecteur des deux peptides testés.

Notre unité est impliquée dans le projet Algolife « Incubation et transformation de macro-algues pour l'extraction de molécules bioactives » financé par BPI France et nous évaluons l'activité antimicrobienne des extraits d'algues produits par les partenaires. Les concentrations minimales inhibitrices ou l'activité à une concentration maximale d'une soixantaine d'extraits ont été déterminées pour différentes espèces et souches d'origine aviaire telles que *E. coli*, *Enterococcus faecium*, *Pasteurella multocida*, et *Ornithobacterium rhinotracheale*. Quelques extraits se sont révélés inhibiteurs vis-à-vis de *P. multocida*.

Ces extraits d'algues ont également été testés vis-à-vis de deux souches de *Mycoplasma gallisepticum* et deux souches de *M. synoviae*. Deux méthodes différentes ont été utilisées pour déterminer si ces extraits avaient un effet sur la croissance des mycoplasmes : dépôt d'une goutte d'extrait d'algue sur un tapis de mycoplasmes en milieu gélosé, ou détermination des concentrations minimales inhibitrices en milieu

liquide en microplaques. Une inhibition de la croissance sur milieu gélosé et en milieu liquide a été observée vis-à-vis des deux espèces pour trois extraits.

## 2. Mycoplasmoses aviaires

L'étude sur le syndrome des œufs à extrémité de verre (ou Eggshell Apex Abnormalities, EAA), observé chez les poules pondeuses et dû à *Mycoplasma synoviae*, est poursuivie dans le cadre d'une thèse, avec accueil d'un étudiant équatorien depuis mai 2015 jusqu'en mai 2018.

Une enquête de prévalence de l'EAA dans les élevages de poules pondeuses d'œufs de consommation a été réalisée entre mai 2015 et mai 2016, adossée à l'étude réalisée par l'Unité EBEAC et l'ITAVI dans le cadre du projet EPOINTAGE. Cette enquête, réalisée auprès des éleveurs, a montré une prévalence de l'EAA de 7,3% dans les élevages de poules pondeuses. Le syndrome a été mis en évidence à la fois dans les élevages en cages aménagées et dans les élevages de type alternatif (bio, label), dans les différentes régions françaises productrices d'œufs de consommation. Cette enquête a également mis en évidence le faible recours à la vaccination vis-à-vis de *M. synoviae* (autovaccins ou vaccins vivants atténués utilisés principalement dans les élevages déjà touchés par le syndrome) ou aux analyses de laboratoire pour mettre en évidence l'infection par *M. synoviae* dans les élevages (*Cisnero-Tamayo et al, 2016, 2017*).



Des prélèvements (écouvillonnages trachéaux et/ou cloacaux) ont été réalisés dans 26 élevages touchés par l'EAA entre 2015 et 2017. Des œufs de deux autres élevages ont également été reçus au laboratoire. Des tests PCR ont été réalisés pour détecter *M. synoviae* dans les différents échantillons. Des cultures ont également été réalisées à partir de ces échantillons pour isoler des souches de *M. synoviae*. L'isolement de *M. synoviae* a été rendu difficile par la présence d'autres espèces de mycoplasmes dans plusieurs élevages. Au total, 18 souches de *M. synoviae* provenant de différents élevages touchés par l'EAA ont été isolées à ce jour.

Dans le cadre d'une collaboration avec le Labocea 22, la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a également été utilisée pour détecter différentes espèces de mycoplasmes aviaires, et notamment celles pour lesquelles une étape de séquençage est nécessaire actuellement pour leur identification car aucun test PCR n'est disponible. Une base de données spécifique, avec des spectres de référence de différentes espèces de mycoplasmes aviaires non disponibles dans la base de données du Biotyper (MALDI-TOF de Bruker), a été créée. Différents essais d'identification ont été réalisés directement à partir de cultures issues de différents cas terrain, puis après clonage. Ils ont permis d'identifier quatre espèces de mycoplasmes et des souches ont pu être isolées pour contribuer à la validation des spectres de référence et enrichir la souchothèque de l'Unité MB. Cette technique s'est avérée également très utile pour mettre en évidence des mélanges d'espèces mycoplasmiques dans certains échantillons (comme vu ci-dessus notamment lors de l'isolement de souches de *M. synoviae*), mélanges qui n'étaient que très rarement détectés auparavant par culture ou tests moléculaires.

### 3. Autres pathologies bactériennes

L'UMB participe au projet COLISEE qui vise à investiguer les pistes d'action pour la maîtrise de la colibacillose aviaire en élevage de poulet de chair. Ce projet, financé par l'appel à projet CASDAR Recherche Technologique 2016, est piloté par l'UMT Sanivol (voir rapport de l'unité EBEAC), et l'UMB apporte une expertise bactériologique pour la conduite des analyses des souches de *E. coli* qui seront isolées dans le cadre de l'enquête de terrain.

### 4. Diffusion des résultats

Les résultats des travaux ont été valorisés en 2016-2017 au travers de la publication de 5 articles scientifiques dans des journaux internationaux, de 3 rapports, d'un chapitre de livre, de 3 publications scientifiques et techniques dans des journaux nationaux et de 13 communications orales ou affichées lors de congrès en France ou à l'étranger (références disponibles sur demande auprès de la correspondante communication de l'Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané), mél: [elisabeth.reperant@anses.fr](mailto:elisabeth.reperant@anses.fr).

### Principales publications relatives à la filière avicole

**Anses** 2017. Résapath - Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, bilan 2016, Lyon et Ploufragan-Plouzané, France, novembre 2017, rapport

**Baron S, Delannoy S, Bougeard S, Larvor E, Jouy E, Balan O, Fach P, Kempf I.** 2016. Virulence genes in expanded-spectrum-cephalosporin-resistant and -susceptible *Escherichia coli* isolates from treated and untreated chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **60**:1874-1877.

**Baron S, Jouy E, Touzain F, Bougeard S, Larvor E, de Boisseson C, Amelot M, Keita A, Kempf I.** 2016. Impact of the administration of a third-generation cephalosporin (3GC) to one-day-old chicks on the persistence of 3GC-resistant *Escherichia coli* in intestinal flora: An in vivo experiment. *Veterinary Microbiology* **185**:29-33.

**Baron S, Le Devendec L, Touzain F, Lucas P, Jouy E, de Boisseson C, Kempf I.** 2017. Molecular analysis of plasmids coding for cephalosporin resistance in *E. coli* from broilers, 7th Symposium in Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment, Braunschweig, Germany, 26-28 June.

**Belguesmia Y, Kempf I, Tison N, Naghmouchi K, Drider D.** 2016. Resistance to Antibiotics and Antimicrobial Peptides: A Need of Novel Technology to Tackle This Phenomenon, p 1-22, *Functionalized Nanomaterials for the Management of Microbial Infection: A Strategy to*



Address Microbial Drug Resistance  
doi:10.1016/B978-0-323-41625-2.00001-6.

- Cisneros-Tamayo M, Kempf I, Chiron G, Mindus C, Balaine L, Coton J, Michel V, Gautier-Bouchardon A.** Epidemiological survey to identify eggshell apex abnormalities (EAA) syndrome in commercial layers in France, *In* 53ème symposium de la branche espagnole de la WPSA, Zaragoza, Espagne, 29-30 Septembre 2016
- Cisneros-Tamayo M, Kempf I, Cineux M, Busson R, Chiron G, Mindus C, Balaine L, Coton J, Michel V, Gautier-Bouchardon AV.** 2017. Situation actuelle du syndrome des œufs à extrémité de verre (EAA) produit par l'infection par *Mycoplasma synoviae* (MS) chez les poules pondeuses en France, SPACE, demi-journée de pathologie aviaire, Rennes, 14 septembre 2017.
- Gautier-Bouchardon AV, Balan O, Ferré S, Cineux M, Kempf I.** Diagnostic des mycoplasmoses aviaires chez la poule pondeuse par la technique d'agglutination rapide sur lame : attention aux faux négatifs !, 12èmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras), Tours 5-6 avril 2017
- Gay E, Jouy E, Jarrige N, Lupo A, Haenni M, Madec J-Y.** 2017. Point d'actualité sur la colistine. Bulletin Epidémiologique, Santé Animale et Alimentation:18-19.
- Jouy E, Haenni M, Le Devendec L, Le Roux A, Châtre P, Madec J-Y, Kempf I.** 2017. Improvement in routine detection of colistin resistance in *E. coli* isolated in veterinary diagnostic laboratories. Journal of Microbiological Methods **132**:125-127.
- Kempf I.** 2016. Les bactéries résistantes chez les animaux de rente Origine, sélection et transmission entre animaux et à l'homme par les aliments abstr Journée Pathogènes Alimentaires organisée par ThermoFisher, La Chapelle sur Erdre, France, 17/11/2016.
- Kempf I.** 2016. Antibiorésistance de *Campylobacter* en filières avicoles et porcines abstr Journée d'Information et d'Echanges sur *Campylobacter*, ISPAIA, Ploufragan, France, 22/11/2016.
- Kempf I, Jouy E, Baron S.** 2016. Transmission of antimicrobial resistance in animals and in the environment, abstr Résistance aux antibiotiques : une approche intégrée de l'environnement à l'Homme, Romainville (France), 16-17 mars. Colloque Adebitech
- Kempf I, Jouy E, Chauvin C.** 2016. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. International Journal of Antimicrobial Agents **48**:598-606.
- Kempf I, Jouy E, Le Bouquin S, Baron S.** 2016. Présence des bactéries résistantes et des gènes de résistance dans les effluents d'élevage, Colloque inter-académies : Antibiotiques, antibiorésistance et environnement : des raisons d'espérer, Paris (France), 15 juin.
- Kempf I, Le Goff O.** 2016. Du modèle animal au modèle fermenteur, vers de nouveaux outils d'étude du microbiote, Le microbiote dans tous ses états Journée organisée par ValorialConnection, Ploufragan (France), 21 avril.
- Laboratoires Anses du LNR Antibiorésistance.** 2017. Surveillance de l'antibiorésistance. *In* DGAL/SDSPRAT 2017/752. Bilan de la campagne 2016 des plans de surveillance et des plans de contrôle (rapport)
- Le Devendec L, Mourand G, Bougeard S, Léaustic J, Jouy E, Keita A, Couet W, Rousset N, Kempf I.** 2016. Impact of Colistin Treatment of Broilers on the Presence of Resistant Bacteria and Resistance Genes in Stored or Composted Manures. Veterinary Microbiology, **194**, pp. 98-106, doi:10.1016/j.vetmic.2015.11.012.
- Lucas, P., Le Devendec L., de Boisséson C., Jouy E., Touzain F., Kempf I.** Characterization of plasmids conferring resistance to extended-spectrum cephalosporins in *E. coli* isolated from French layers and future layers XXth World Veterinary Poultry Association Congress, Edinburgh, 4-8/09/2017,
- Mindus C, Chiron G, Puterflam J, Huneau-Salaün A, Cisneros-Tamayo M, Gautier-Bouchardon A.** 2016. *Mycoplasma synoviae* et syndrome des œufs à extrémité de verre. TeMa:27-37.
- Mindus C, Puterflam J, Huneau-Salaün A, Cisneros-Tamayo M, Gautier-Bouchardon AV, Chiron G.** Mesures employées sur le terrain pour limiter l'impact du syndrome des œufs à extrémité de verre induit par *Mycoplasma*



*synoviae* en élevage de poules pondeuses, p 834-838. 12èmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras), Tours 5-6 avril 2017

**Pourcher A-M, Druilhe C, Denis M, Kempf I.** 2017. Gestion des effluents organiques et risques sanitaires : antibiorésistance et micro-organismes pathogènes (conférence invitée), abstr Space, les rendez-vous de l'INRA, Rennes, 12 septembre 2017.

**Touzain F, Le Devendec L, de Boisséson C, Baron S, Jouy E, Perrin-Guyomard A, Blanchard Y, Kempf I.** Caractérisation de plasmides de *E. coli* résistants aux céphalosporines de troisième génération isolés de poulets de chair, 12èmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Tours 5-6 avril 2017



## UNITE VIROLOGIE, IMMUNOLOGIE-PARASITOLOGIE AVIAIRES ET CUNICOLES

Chef d'unité : N. ETERRADOSSI

Chef d'unité adjoint : V. JESTIN puis G. LE GALL-RECOLE, Adjointe au chef d'Unité : Audrey SCHMITZ

Responsable du LNR : E.NIQUEUX

Sur la période considérée, l'effectif de l'unité VIPAC a fluctué de 25 à 29 ETP. Sont particulièrement à signaler i) le recrutement temporaire d'une ingénieure et de deux techniciens (soutien de la DGAI) pour renforcer les effectifs du Laboratoire National de Référence pour l'influenza aviaire, ii) le recrutement permanent d'une technicienne pour diriger les activités de laverie et iii) la nomination d'une nouvelle chef d'unité adjointe.

Les évolutions thématiques survenues par rapport à la période précédente consistent surtout en un renforcement des activités consacrées aux virus influenza aviaires (VIA), du fait des deux crises successives enregistrées en France en 2015-2016 et 2016-2017 en lien avec des VIA H5 hautement pathogènes. Plusieurs nouveaux projets (projet européens, stage de master, accueil de scientifiques étrangers ou doctorants) ont cependant été montés ou conduits. Pour les autres viroses aviaires, les activités concernant les paramyxovirus /virus de la maladie de Newcastle, les metapneumovirus, la bursite infectieuse (fin du jumelage avec le laboratoire de Harbin en Chine pour l'activité de référence internationale OIE, montage de projets européen ou international, accueil de scientifique étranger en fin de période) ont été maintenues. Enfin, les activités de recherche consacrées aux coronavirus aviaires, aux calicivirus des lagomorphes (accueil d'un doctorant sur chaque thématique en cours de période) et aux coccidioses aviaires ont été développées.

Sur le plan de l'assurance qualité et en dépit des crises sanitaires, l'unité VIPAC a maintenu ses accréditations COFRAC au titre des normes NF EN ISO/CEI 17025 (essais) et NF EN ISO/CEI 17043 (organisations d'essais inter-laboratoires). Elle a obtenu de l'ANSM, après inspection, les autorisations nécessaires à la détention et la mise

en œuvre des VIA relevant de la réglementation MOT<sup>1</sup>. Les agréments nécessaires pour la manipulation d'OGM (VIA de sous-type H5, metapneumovirus aviaires) ont été renouvelés.

Plusieurs scientifiques de l'unité ont contribué à l'organisation scientifique et/ou à l'animation des JRA2017 (sélection des communications de la session pathologie aviaire et prévention) ou au comité d'organisation du Congrès mondial vétérinaire d'aviculture (WVPAC2017, Edimbourg).

Pour ce qui concerne les activités de formation, les scientifiques de l'unité contribuent à la réalisation de cours dans les Ecoles Nationales Vétérinaires, à l'Institut Pasteur, à Avipole formation et contribuent à l'accueil de stagiaires du niveau Bac+3 au niveau doctorat d'Université.

### 1. Activités concernant l'influenza aviaire

#### 1.1. Activités de référence nationale (LNR)

Les années 2016 et 2017 ont été marquées par deux épisodes majeurs d'influenza aviaire (IA) hautement pathogène (HP) survenus dans le Sud-Ouest de la France, d'une part dû à des sous-types H5N1, H5N2 et H5N9 au cours de l'hiver 2015-2016 et d'autre part dû au sous-type H5N8 de lignée asiatique A/gs/Gd/96 (clade 2.3.4.4.) au cours de l'hiver 2016-2017. Le LNR a donc augmenté de façon très significative son activité d'analyses de confirmation. De nombreuses analyses sérologiques de confirmation ont ainsi été réalisées pour la surveillance annuelle de la circulation des VIA de sous types H5 et H7 en élevage (environ 1500 tests), pour la surveillance suite aux épizooties (>10000 analyses pour 2016, chiffres 2017 en cours de consolidation). Les analyses virologiques ou moléculaires de confirmation ou d'exclusion (suspensions

<sup>1</sup> microorganismes et toxines



d'infection en élevage ou surveillance passive de l'avifaune sauvage) ont également très nettement augmenté (> 2300 analyses de sous-typage par séquençage des gènes HA ou NA pour l'année 2016, 2017 en cours de consolidation). Pour faire face à cette activité analytique très augmentée le LNR a mis en place de début janvier à février 2016 et de mi-décembre 2016 fin avril 2017 un rythme de travail permettant d'assurer 14 heures consécutives de travail quotidien et de fonctionner les week-ends et jours fériés. Un système d'astreinte a par ailleurs été mis en place pour garantir, le reste de l'année, le traitement sept jours sur sept des urgences sanitaires. L'organisation de notre système de gardiennage et la contribution de nos gardiens a permis la réception des échantillons 2H/24H 7/7J.

Les bilans annuels de la surveillance de l'IA sont en cours de rédaction pour une publication dans le Bulletin épidémiologique santé animale Anses - DGAI.

Le LNR a participé avec succès aux EILAs annuels européens organisés en 2016 et 2017 par le laboratoire de référence de l'union européenne (LRUE) et portant sur les techniques moléculaires Influenza Aviaire (RT PCR temps réel et point final, séquençage), l'identification de virus hémagglutinants (en commun avec les paramyxovirus aviaires *cf* maladie de Newcastle) et les tests sérologiques (IHA H5/H7). Le LNR a également participé avec succès aux EILAs nationaux qu'il a organisés sous accréditation NE EN ISO/CEI 17043 et qui ont porté en 2016 sur la détection des anticorps induits par les VIA de sous-types H5/H7 et en 2017 sur la détection d'anticorps contre les VIA de type A.

Le LNR a maintenu le champ des accréditations COFRAC précédemment acquises en immunosérologie, en ovoculture virale et identification de virus hémagglutinants, et en biologie moléculaire pour 4 méthodes RT-PCR temps réel et 1 méthode RT-PCR point final/séquençage utilisée pour le pathotypage des VIA de sous types H5/H7.

A la demande de la DGAI, le LNR a transféré la méthode de RT-PCR temps réel H5 avec contrôle interne vers les laboratoires agréés en octobre 2017. Le réseau des laboratoires agréés pour la réalisation des analyses officielles a continué à être animé et approvisionné en réactifs de référence accompagnés de certificats de qualité, avec une demande en réactifs très accrue du fait de l'intensification des contrôles. Les membres du réseau ont été réunis le 9 mars 2017.

Enfin, afin de répondre au besoin de trousse commerciales permettant la mise en place d'une surveillance de l'IA très renforcée au travers d'un réseau de laboratoires d'analyses et de méthodes « reconnus » pour la réalisation d'autocontrôles, le LNR s'est engagé en 2017 dans la validation de kits pour les analyses de biologie moléculaire (détection des gènes IA M, H5 et H7) selon les méthodes recommandées par la Commission Européenne. Un cahier des charges détaillant les méthodes a été envoyé aux fabricants de trousse de réactifs et l'organisation interne adaptée au contrôle officiel initial des trousse a été mise en place en fin de biennium.

Plus de détails sur l'activité de référence sont/seront fournis dans les rapports annuels 2016 et 2017 du LNR influenza aviaire/maladie de Newcastle.

## 1.2. Expertise

Au sein de l'Anses, les responsables du LNR ont participé au groupe de travail « influenza aviaire hautement pathogène » (GT IAHP) de l'Anses qui a publié, souvent en urgence compte tenu de l'évolution de la situation sanitaire, 18 avis en réponse aux saisines de la DGAI sur le risque influenza aviaire et portant entre autres sur la mesure des niveaux de risques (6 avis), l'évaluation des mesures proposées pour l'assainissement des élevages et parcours (3 saisines), l'évaluation des mesures de gestion pour les dépeuplement, repeuplement ou maintien d'élevages séropositifs (4 avis) et l'analyse des possibles sources de contamination / recontamination des élevages (2 avis). Le GT IAHP a également préparé une note de réflexion (présentée et validée par le CES Santé et Bien Etre des Animaux de l'Anses) relative aux facteurs de risque à maîtriser pour éviter la résurgence ou la ré-introduction des virus IA réglementés dans la filière palmipèdes dans la zone de restriction.

Au plan national, les responsables du LNR et de l'unité ont également répondu aux sollicitations de la DGAI, soit directement soit dans le cadre du groupe de suivi pestes aviaires de la plateforme Epidémiologie et Santé Animale (ESA), pour réviser :

- les notes de service et instructions techniques définissant les protocoles de surveillance événementielle de l'influenza aviaire chez les volailles, oiseaux captifs et oiseaux sauvages (avec l'ONCFS),



- les différents plans de surveillance programmée accompagnant la gestion des foyers d'IA H5 HP et concernant i) la levée des zones de protection et de surveillance autour des foyers, ii) la levée de la zone de restriction créée par arrêté ministériel du 17 décembre 2015 au 15 septembre 2016, iii) les enquêtes épidémiologiques dans les élevages en lien avec les foyers, iv) le repeuplement des foyers après nettoyage-désinfection et vide sanitaire, v) la surveillance renforcée de l'IA dans certains troupeaux d'oiseaux domestiques (reproducteurs en sélection et multiplication dans et hors ZR, volailles hors ZR, , volailles, appelants et gibiers de lâcher ou de repeuplement en ZR).
- les notes de service et instructions techniques définissant les méthodes officielles et reconnues pour le diagnostic de l'IA et le projet d'arrêté ministériel concernant la constitution d'un réseau de laboratoires reconnus.
- les fiches de plan d'analyses virologiques et sérologiques compatibles avec SIGAL, pour contribuer à faciliter les transferts de données entre la DGAL et le LNR.
- les projets d'arrêtés ministériels concernant les mesures de biosécurité en élevage.
- les synthèses hebdomadaires des résultats d'analyses de confirmation pendant les épizooties, et les projets de notes de situation nationale ou internationale publiées par la plateforme ESA (plus de 30 notes publiées avec une périodicité au moins bimensuelle lors des pics épizootiques).

Au plan européen, le responsable du LNR i) a été auditionné en tant qu'expert lors de 2 réunions physiques de travail, concernant le rôle des oiseaux sauvages dans l'introduction de l'influenza aviaire dans les élevages de volailles dans l'UE, ii) a participé aux réunions téléphoniques sur l'utilisation du modèle FluRisk (modélisation du risque de franchissement de la barrière d'espèce) appliqué aux virus H5HP mis en évidence en France en 2015-2016 et iii) a participé aux travaux sur l'analyse des données épidémiologiques et de surveillance sérologique pour ce même épisode. Par ailleurs, les responsables du LNR, de l'unité et du laboratoire ont été auditionnés dans le cadre d'une mission d'enquête sur les dispositifs nationaux de surveillance de l'influenza, diligentée fin juin 2017 par la Commission Européenne. Le responsable du LNR a participé en tant qu'expert

technique à une mission d'audit de la Commission Européenne en vue d'évaluer les contrôles de santé animale relatifs aux produits à base de volaille destinés à l'exportation vers l'UE.

Enfin le LNR assure une veille quotidienne de l'évolution de la situation épidémiologique mondiale.

### Activités de recherche

#### Surveillance avifaune sauvage

Pour l'année 2016, le LNR a réalisé les analyses confirmatoire dans le cadre de 80 dossiers relatifs à l'avifaune non domestique, incluant les analyses générées par la surveillance des appelants (n=10) et des mortalités de l'avifaune sauvage (n=58), ainsi que les analyses confirmatoires des détections virales effectuées dans le cadre du programme de recherche « Avifaune-CRD » géré par l'UMR INRA-ENVT de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (n=12). Chiffres en cours de consolidation pour l'année 2017.

#### Evolution virale

*Suivi génétique des VIA isolés en France pendant l'épizootie 2015-2016 :*

Le séquençage nucléotidique complet des huit segments de l'ARN génomique viral a été réalisé pour sept virus H5N1, cinq H5N9 et six H5N2 hautement pathogènes. Les données de séquençage ont montré que les différents virus IAHP H5 responsables de l'épizootie 2015-2016 en France étaient apparentés pour leurs séquences H5 à des virus contemporains H5 faiblement pathogènes (FP) circulant en Europe, et non au lignage A/goose/Guandong/1/1996 ayant généré des virus H5N1 ou H5N6 transmissibles à l'homme. Le génotypage du génome complet des virus 2015-2016 révèle par ailleurs une très grande diversité (douze génotypes identifiés). Une telle diversité provient de réassortiments fréquents, qui n'ont été possibles que si le virus H5HP à l'origine des virus détectés réassortit très facilement, et/ou qu'il circule depuis assez longtemps pour avoir eu le temps de réassortir avec de nombreux autres virus influenza aviaires (dont les analyses effectuées lors de l'épizootie suivante sont venues confirmer la fréquence). L'hypothèse d'une circulation prolongée et non détectée du virus H5HP est confortée par les analyses de chrono-phylogénie (tMRCA), qui permettent d'estimer la date d'apparition du site de clivage hautement pathogène à début 2014 ±1



an. Une collaboration avec un laboratoire vétérinaire a permis l'analyse *a posteriori* d'échantillons collectés, pour un autre usage, au cours des mois ayant immédiatement précédé la détection du premier cas d'infection à Biras. Les résultats confirment une circulation inapparente au sein des élevages de palmipèdes du Sud-Ouest, bien que les modalités d'échantillonnage mises en œuvre pour cette étude particulière ne permettent pas de préciser avec quelle prévalence.

#### *Suivi génétique des VIA isolés en France pendant l'épizootie 2016-2017 :*

Durant l'hiver 2016-2017, l'Europe a été touchée par un virus influenza aviaire H5N8 hautement pathogène détecté d'abord dans l'avifaune sauvage (245 détections chez 35 espèces au 12 décembre 2016), puis rapidement dans les élevages de volailles (155 détections au 12 décembre 2016). La présence du virus H5N8HP a été confirmée la première fois en France le 26 novembre 2016 sur des canards appelants dans le Pas-de-Calais. Le virus a ensuite été détecté à partir de début décembre dans le Sud-Ouest de la France (principalement dans des élevages de canards) ainsi que sur des goélands autour du lac de Genève. L'analyse des séquences du gène H5 indique que le virus appartient au clade 2.3.4.4., qui avait déjà sévi dans plusieurs pays d'Europe (mais pas en France) pendant l'hiver 2014-2015. Contrairement aux différents virus H5 HP détectés en France en 2015-2016, le virus H5N8 semble plus pathogène chez les palmipèdes. Le génome complet de sept virus H5N8 HP a été séquencé. Les analyses phylogénétiques confirment les résultats d'autres équipes européennes et montrent que deux génotypes de H5N8 HP (différenciés par leurs gènes PB2, PA et NP) ont circulé au cours de l'hiver 2016-2017. La détection de ces deux génotypes en Europe avant même la première détection de virus H5N8 HP en France indique qu'au moins deux introductions ont eu lieu pendant l'hiver 2016-2017. Ces deux introductions ont eu très probablement comme vecteur l'avifaune sauvage lors de la migration hivernale (même si un seul génotype semble ensuite avoir diffusé entre les élevages du Sud-Ouest). Une diffusion comparable de différents génogroupes et de multiples introductions via l'avifaune sauvage avaient déjà été observées en 2006 avec le virus H5N1 hautement pathogène.

#### Risque zoonotique

Après la détection en novembre 2015 d'un virus H5N1HP en Dordogne, il s'est avéré rapidement

nécessaire de vérifier que ce virus ne présentait pas de parenté génétique avec le virus H5N1 HP détecté en 2006 qui, lui, était connu comme zoonotique (c'est-à-dire susceptible d'infecter l'homme).

Différents déterminants de restriction d'hôte des virus influenza ont été décrits dans la littérature, (interaction de l'hémagglutinine virale avec les récepteurs cellulaires, réplication virale différentielle selon la température, capacité des virus à interférer avec les réponses immunitaires de l'hôte). Différents déterminants moléculaires sont connus comme étant le support de ces propriétés chez les virus influenza infectant préférentiellement les oiseaux ou des hôtes mammifères.

Trois virus HP représentatifs des sous-types ayant circulé lors de l'épizootie 2015-2016 (H5N1, H5N2 et H5N9), dont le génome avait été totalement séquencé, ont en conséquence fait l'objet d'une recherche *in silico* des marqueurs moléculaires associés à une transmission, une réplication ou une virulence augmentées pour les hôtes mammifères. Les résultats de ce travail indiquent que les virus étudiés possèdent la plupart des marqueurs retrouvés chez les souches aviaires, et qu'à l'inverse certaines des caractéristiques moléculaires des protéines HA, PB1 et PB2 essentielles pour la transmission à l'homme ou la transmission interhumaine, ne sont pas présentes. Réalisée en urgence pour le premier des virus séquencé (H5N1HP), cette étude *in silico* a permis de conclure à un risque zoonotique et pandémique limité (ce qui a été à la base de l'avis Saisine n°2015-SA-0241 publié par l'Anses le 14 décembre 2015), information essentielle pour orienter les mesures de gestion décidées ensuite.

Les caractéristiques phénotypiques prédites lors de l'étude *in silico* ont été investiguées expérimentalement pour le virus H5N1-HP dans une série de tests de laboratoire. Les résultats montrent que le virus H5N1-HP isolé en 2015 se réplique préférentiellement à 37°C, comme les virus aviaires (et moins bien à 33°C, température qui convient mieux aux virus influenza adaptés aux mammifères). Par ailleurs, le virus reconnaît préférentiellement les acides sialiques AS- $\alpha$ 2,3, comme les autres virus aviaires (et non les AS- $\alpha$ 2,6 récepteurs préférentiels du virus chez les mammifères). L'ensemble de ces caractéristiques *in vitro* apparaît donc en adéquation avec un phénotype préférentiellement aviaire du virus



H5N1-HP isolé en 2015, ce qui est cohérent avec les prédictions réalisées *in silico*.

#### Efficacité de transmission et pouvoir pathogène des virus circulants pour les différentes espèces de volailles

##### *Chez le poulet*

La réglementation qui s'applique aux virus influenza H5 et H7 s'explique par la capacité de ces virus d'évoluer vers des formes hautement pathogènes. Le niveau de pathogénicité est déterminé en mesurant expérimentalement, selon des conditions standardisées précisées par la directive européenne 2005/94/CE, l'index de pathogénicité par voie intraveineuse (ou IPIV). Ce paramètre a été mesuré chez des poulets exempts d'organismes pathogènes spécifiés placés dans des conditions de confinement de niveau 3 et inoculés soit avec le virus H5N1-HP isolé en 2015, soit avec le virus H5N8HP isolé en 2016. Les IPIV mesurés à l'issue de ces essais étaient 2,9 (valeurs minimale et maximale possibles = 0.0 et 3.0) ce qui confirme bien le caractère réglementairement hautement pathogène des virus considérés.

##### *Pouvoir pathogène du virus H5N9 HP 2015 chez le canard de barbarie.*

Un virus H5N9HP isolé en 2015 a été inoculé à 6 canards de barbarie EOPS âgés de 3 semaines placés en animalerie confinée. Douze canards EOPS ont été placés au contact des animaux précédents 24h après inoculation. Le virus inoculé n'a pas induit de signes cliniques évidents et le suivi de l'excrétion à l'aide d'écouvillonnages respiratoires et cloacaux n'a pas révélé de tropisme respiratoire marqué. Vingt-quatre heures après inoculation ou mise en contact, tous les canards étudiés étaient excréteurs, en général à la fois par les voies respiratoire et cloacale (l'excrétion respiratoire a précédé l'excrétion cloacale dans quelques cas). Le virus a été détecté au niveau oropharyngé pendant 6 à 8 jours, contre 7 à 13 jours au niveau cloacal. Ce pouvoir pathogène et ce profil d'excrétion sont proches de ceux observés dans les mêmes conditions expérimentales avec certains virus H5 faiblement pathogènes (excrétion de 7 à 20 jours post infection, avec un retard de l'excrétion cloacale, Niqueux et al., Vet Microbiol 2014).

##### *Pouvoir pathogène du virus H5N9 HP 2015 chez le canard Pékin.*

Le LNR s'est coordonné avec le LRUE (Prof Ian Brown, APHA, Weybridge, UK) qui a conduit des essais équivalents à ceux décrits au paragraphe précédent sur des canards Pékin.

##### *Pouvoir pathogène du virus H5N8 HP 2016 chez le canard mulard*

Huit canards mulards conventionnels âgés de 7 semaines ont été inoculés en animalerie confinée par instillation oculaire avec un virus H5N8 HP isolé en 2016. Le jour suivant l'inoculation quatre canards frères ont été introduits dans l'isolateur. L'ensemble des animaux a été suivi par des écouvillonnages oropharyngés et cloacaux quotidiens pendant 18 jours. Les canards inoculés se sont tous avérés sensibles et la transmission aux sujets contacts s'est effectuée dans un délai inférieur ou égal à 24h. Les signes cliniques suite à l'épreuve virulente ont été modérés (conjonctivite, œdème du cou) à sévères (torticolis, incoordination motrice), mais la mortalité est restée faible: seuls deux canards sur douze (un inoculé, un contact) sont morts tardivement, ce qui suggère une sensibilité modérée ou un développement lent des lésions. L'excrétion oro-pharyngée (respiratoire) s'est avérée plus importante que l'excrétion cloacale.

#### Etude de l'antigénicité des virus H5HP isolés en 2015-2016 et 2016-2017

##### *Réponses sérologiques croisées*

Les infections expérimentales décrites précédemment ont été l'occasion de caractériser les réponses immunitaires humérales de canard barbarie ou mulard après inoculation avec un virus H5N9 HP isolé lors de l'épisode 2015-2016 et un virus H5N8 HP isolé lors de l'épisode 2016-2017.

Après inoculation du virus H5N9 HP de 2015-2016 à des canards de barbarie EOPS, les sérums collectés étaient tous positifs en ELISA NP dès 7 jours après l'inoculation, partiellement positifs en ELISA H5 à partir de 7 jours (positivité croissante de 39 % à 7 jours à 100 % à 20 jours post inoculation) et quasiment tous positifs en IHA à partir de 14 jours post inoculation en utilisant l'antigène IHA homologue (titres plus faibles et séropositivité seulement chez une partie des individus avec l'antigène H5 hétérologue).

Après inoculation du virus H5N8 HP de clade 2.3.4.4 (2016-2017) à des canards mulards séronégatifs, les 12 canards inoculés avaient tous des anticorps détectables en ELISA NP et ELISA



H5 sept jours post-inoculation. A sept jours post-inoculation, seuls 6 des huit canards inoculés avaient des anticorps détectables en IHA homologue (100 % de séropositifs à 15 et 18 jours post infection).

#### *Etude expérimentale des possibilités de contrôle vaccinal*

Ces études ont été entreprises en conditions confinées, après avoir obtenu de l'ANMV l'autorisation d'importer les vaccins étudiés (la vaccination contre l'influenza aviaire actuellement est interdite en Europe), afin de recueillir les données d'efficacité nécessaires au cas où un échec des stratégies d'éradication mises en place sur le terrain aurait justifié de faire appel à la vaccination.

Une première expérimentation a été mise en place en 2016 pour vérifier la protection conférée par différents vaccins chez le canard de Barbarie vis-à-vis de l'infection par un virus H5N9 HP isolé en 2015. Quatre vaccins inactivés ou recombinants, déjà disponibles (donc porteurs d'antigènes H5 non directement apparentés à la souche d'épreuve nouvellement identifiée) ont été testés. Pour chacun des programmes vaccinaux utilisés, l'épreuve virulente a été réalisée 28 jours après la primo-vaccination. Les animaux ont été suivis sur le plan sérologique et sur le plan virologique (qRT-PCR gène M). La plupart des programmes vaccinaux ont induit des séroconversions partielles ou tardives, et aucun des programmes vaccinaux utilisés n'a permis de réduire significativement les quantités de virus d'épreuve excrétées par les canards vaccinés. Ceci suggère que l'utilisation des vaccins étudiés (disponibles à l'étranger) aurait un intérêt pratique extrêmement limité comme mesure de prophylaxie destinée à contrôler la diffusion des virus H5 HP mis en évidence en France en 2015-2016. Cette observation est cohérente avec le paradigme actuel qui stipule que pour être efficace, les gènes H5 de l'antigène vaccinal et du virus circulant doivent être suffisamment proches.

Les virus H5 HP de clade 2.3.4.4. induisent des réponses immunitaires qui croisent mal avec les autres virus H5. Cette particularité amène à devoir utiliser des antigènes H5 homologues (également de clade 2.3.4.4.) à la fois pour le dépistage sérologique de ces virus, et pour induire une protection contre ceux-ci. Une deuxième expérimentation a donc été conduite en 2017 pour évaluer chez le canard mulard la protection conférée par 3 vaccins expérimentaux, de

nouvelle génération (intégrant tous une hémagglutinine dérivée d'un virus H5 de clade 2.3.4.4), contre le virus H5N8 HP responsable de l'épizootie 2016-2017. Les résultats de l'essai sont en cours d'analyse.

#### Cinétique de survie des virus influenza aviaires dans les lisiers, et méthodes de décontamination

L'étude a été conduite avec l'unité EBEAC (voir état des lieux des pratiques de gestion des lisiers présenté par cette unité) et l'ITAVI. Débutée à la suite de l'épizootie de 2015-2016, elle a visé à estimer la persistance d'un virus IA H5 HP dans les lisiers de canards reproducteurs et de canards gavés i) en conditions naturelles par le suivi d'élevages naturellement contaminés et ii) en conditions expérimentales au laboratoire, avec ou sans traitement préalable au carbonate de chaux. Compte-tenu du nouvel épisode H5N8HP survenu en 2016-2017, l'étude initiale a été complétée par la recherche de virus infectieux dans les lisiers issus de 5 élevages de canard mulards naturellement contaminés par le virus H5N8 HP.

Les élevages contaminés (confirmation de la présence de virus H5HP par le diagnostic officiel RT-PCR et séquençage du site de clivage) ont été sélectionnés en concertation avec les DDPP. Après une première prise de contact avec l'éleveur, une visite a été réalisée sur chaque site afin de prélever du lisier (unité EBEAC et ITAVI). Le volet « laboratoire » de l'étude a consisté tout d'abord à valider l'absence de virus influenza dans d'autres échantillons de lisier prélevés dans d'autres élevages (sains cette fois), puis à contaminer artificiellement (en confinement BSL3) ces échantillons à l'aide d'une dose de virus H5N9 HP suffisante pour reproduire les niveaux de contamination des lisiers rencontrés sur le terrain. Les lisiers ainsi « dopés » avec le virus H5N9 HP ont ensuite été conservés à +4°C au laboratoire, avec ou sans un traitement au carbonate de chaux permettant d'ajuster leur pH à 10 ou 12. Les échantillons de lisier prélevés sur le terrain, comme ceux prélevés chaque semaine au laboratoire lors des essais de « dopage-vieillessement », ont été utilisés pour rechercher des virus influenza aviaires infectieux en inoculant des œufs embryonnés conformément à la norme Afnor NFU47-210.

Aucun virus H5HP infectieux n'a été ré-isolé à partir des lisiers naturellement contaminés prélevés lors de l'épizootie de 2015-2016, ce qui est probablement dû à une interférence entre



survie des virus et surgélation des prélèvements (les virus influenza semblent paradoxalement mal survivre dans les lisiers surgelés). Les lisiers prélevés dans les élevages contaminés lors de l'épizootie de 2016-2017 ont quant à eux été analysés sans congélation préalable et ont permis de ré-isoler du virus H5HP jusqu'à 3 semaines après le départ des animaux, ainsi que d'autres virus enveloppés (PMV3, PMV6 et virus influenza H4) pendant une durée allant jusqu'à 8 semaines (56 jours) après le départ des animaux, justifiant ainsi le délai de conservation de 60 jours avant épandage imposé par la réglementation aux élevages contaminés ne mettant pas en œuvre de traitement assainissant.

Les résultats expérimentaux obtenus au laboratoire sur lisiers dopés suggèrent, en l'absence de traitement au carbonate de chaux, une survie du virus H5N9 HP infectieux inférieure à 5 semaines dans trois lisiers de canards reproducteurs barbarie, canards reproducteurs pékins ou canards mulards. Les lisiers dopés et traités au carbonate de chaux à pH10 et pH12 n'ont permis pas de ré-isoler le virus inoculé pendant plus de 2 semaines.

Le protocole expérimental d'étude de la survie des virus H5HP a été transféré au cours de l'été 2017 à un laboratoire départemental agréé pour l'ovoculture virale.

L'étude a été valorisée lors des Journées de la Recherche Avicole (prix de la meilleure communication orale en pathologie) et en congrès international (poster).

#### Validation d'une méthode de diagnostic rapide de l'influenza aviaire

L'unité VIPAC a participé avec succès avec des laboratoires danois, allemands et italiens à l'élaboration d'un projet européen destiné à valider un appareil transportable destiné au diagnostic rapide des infections par les agents zoonotiques susceptibles d'être présents chez les volailles. Ce programme, accepté dans le cadre de l'appel à projet H2020, sera conduit de 2018 à 2020.

Les travaux consacrés à l'influenza aviaire ont été valorisés par la publication de 3 articles scientifiques dans des journaux scientifiques internationaux et par la présentation de 22 communications orales ou affichées en congrès nationaux ou internationaux.

## **2. Activités concernant la maladie de Newcastle et les paramyxovirus aviaires**

### **Activité de référence**

Comme lors du biennium précédent, le LNR a effectué une vingtaine de diagnostics virologiques et environ 3000 tests sérologiques dans le cadre essentiellement des contrôles internes des élevages EOPS et conventionnels. Le LNR a d'autre part participé à 3 EILAs européens : chaque année l'un portait sur les techniques moléculaires et l'autre sur l'identification de virus hémagglutinants (communs à ceux concernant les virus d'influenza aviaire) ainsi qu'à l'EILA national qu'il a organisé - sous accréditation selon le référentiel NF EN ISO/CEI 17043 depuis 2014 - sur le titrage des anticorps de la maladie de Newcastle (session 12017).

Le LNR a par ailleurs poursuivi l'adoption et sa contribution à la validation d'une méthode de RT PCR temps réel (EILV organisé par l'APHA Weybridge) permettant la détection à la fois des paramyxovirus aviaires de classe I et II (virus de la maladie de Newcastle). Cependant vu la diversité de ces virus (18 génotypes sont à présent recensés), il n'existe pas à ce jour de méthode moléculaire de référence au plan européen, si bien que l'ovoculture reste toujours la méthode de référence pour confirmer ou infirmer une suspicion. Sous réserve d'une évolution réglementaire, d'une caractérisation complète de la méthode développée par le LRUE (APHA Weybridge) et d'une amélioration de la méthode par le LNR Anses qui la rendrait conforme aux exigences de la norme française (inclusion d'un contrôle interne et optimisation en conséquence de sa sensibilité) cette nouvelle méthode moléculaire pourrait devenir test officiel et être transférée aux laboratoires agréés de diagnostic de première intention. Ces travaux n'ont pas été programmés au cours du biennium écoulé compte-tenu de la charge de travail relative à l'influenza aviaire. Comme mentionné plus haut pour l'influenza aviaire, le LNR a apporté autant que de besoin son soutien technique aux laboratoires agréés (réactifs de référence avec certificats qualité, réponses aux questions par voie téléphonique et mails).

Plus de détails sur cette activité de référence sont/seront fournis dans les rapports annuels 2016 et 2017 du LNR influenza aviaire/maladie de Newcastle.



## 2.2. Expertise

Pas de sollicitations dans le cadre de saisines mais participation d'un scientifique de l'unité à un groupe international de taxonomie des paramyxovirus aviaires de type 1 / virus de la maladie de Newcastle, en vue d'adopter une nouvelle classification unique par l'utilisation de méthodes standardisées de traitement des données de séquences et l'adoption des critères les plus pertinents pour définir les lignées, génotypes, etc. (1 article international en co-auteur en 2016 pour préciser la taxonomie des mononégavirales).

## 2.3. Recherche

Compte-tenu des deux crises sanitaires et des travaux de recherches qu'elles ont suscitées en matière d'influenza aviaire, les activités de recherche dévolues aux paramyxovirus aviaires ont été suspendues durant le biennium considéré

## 3. Activités concernant la Bursite Infectieuse Aviaire (IBDV)

### 3.1. Activités d'appui scientifique et technique et d'expertise

Les activités du Laboratoire de référence de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) pour la bursite infectieuse aviaire ont principalement consisté en la finalisation du projet de jumelage développé au cours de la période précédente avec le Harbin Veterinary Research Institute (Chine). Cet accord a conduit en 2016-2017 à l'accueil de 4 visiteurs chinois pour des périodes d'une semaine consacrées à des formations et à l'harmonisation (organisation, réalisation et discussion des résultats d'un mini-EILA organisé selon les principes de la norme 17043) des techniques de laboratoire consacrées à la bursite infectieuse aviaire. Une mission de conclusion a été effectuée à Harbin. Le jumelage a débouché sur la validation par l'OIE de la candidature du laboratoire chinois au titre de laboratoire de référence pour la bursite infectieuse aviaire.

Quatre souches virales en provenance d'Uruguay ont été reçues et caractérisées au cours de la mission de 2 mois d'un scientifique de l'université de Montevideo.

Neuf souches virales en provenance d'Egypte et également été caractérisées lors du post-doctorat

d'un scientifique égyptien (NLQPP, Le Caire, Egypte).

Les antigènes et antisérums de référence ont continué à être distribués aux laboratoires d'analyses vétérinaires au niveau national et international (France, Allemagne, Espagne, Chine, Ethiopie, Serbie).

### 3.2 Activités de Recherche

Une étude antérieure consacrée à la mise en évidence d'un virus réassortant inter-sérotypique détecté en France et doté d'un pouvoir pathogène diminué a été publiée.

Une enseignante-chercheuse de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger préparant un doctorat d'université a été accueillie durant une période de 16 mois, grâce au soutien du Programme National d'Enseignement algérien, pour une étude consacrée à la caractérisation des souches algériennes du virus de la bursite infectieuse. Cette étude a permis de mettre en évidence l'évolution et la diversité des virus circulant en Algérie en comparant des souches isolées en 2000 et en 2014-2015. En particulier, un groupe de virus réassortants pathogènes a été mis en évidence. Ce projet a été valorisé par une communication affichée, deux communications orales, ainsi que par un article scientifique en cours de finalisation.

Plusieurs projets de collaborations internationales ont été initiés ou réactivés. Un projet de recherche CRD est en cours de finalisation à la demande et avec l'appui de l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire. Il a porté sur l'évaluation du potentiel immunosuppresseur de souches du virus de la bursite infectieuse aviaire, dont les souches vaccinales atténuées, grâce à un système de répllication *in vitro* sur culture primaire de lymphocytes aviaires (système acquis grâce à une collaboration avec l'université de Munich, Allemagne, Prof. Bernd Kaspers). L'utilisation de ce système pour la culture et le titrage du virus IBDV a fait l'objet d'une publication scientifique. Son application à l'étude de virus issus du terrain et non adaptés à la culture cellulaire fait partie des objectifs du projet européen VetBioNet.

Deux projets de collaborations internationales ont été construits en partenariat avec l'université de Munich (Pr. Bernd Kaspers) et avec le CSIC de Madrid (Dr. JF. Rodriguez) pour caractériser la stabilité génétique de souches vaccinales du virus IBDV à l'aide du système *in vitro* (projets en



cours d'évaluation par la Région Bretagne et par l'Union Européenne).

Les travaux consacrés à l'IBDV ont fait l'objet en 2016-2017 de deux publications scientifiques internationales et de 5 communications orales ou affichées (dont deux invitées) dans des congrès internationaux.

## 4. Activités concernant les métapneumovirus aviaires (AMPV)

### 4.1. Activités d'appui scientifique et technique

Les antigènes et antisérums de référence ont continué à être distribués au niveau national. Le laboratoire a analysé par ELISA des sérums suédois vis-à-vis du sous-groupe AMPV C.

Une RT-PCR en temps réel a été développée et validée pour le dépistage du génome des quatre sous-groupes d'AMPV principalement, mais elle est également applicable pour la détection de tous les sous-groupes des métapneumovirus humains (hMPV). Elle est le premier outil de diagnostic moléculaire en temps réel spécifique à tous les virus du genre métapneumovirus et permettrait de diagnostiquer des sous-groupes aviaires inconnus ou émergents, voire même chez d'autres espèces mammifères étant donné sa capacité à détecter l'hMPV, ce qui sera utile pour des études épidémiologiques futures. De plus, ce travail a été très récemment publié dans le Journal of Virological Methods 2017/2018. Dans un second temps, en vue d'identifier quel sous-groupe aviaire a été détecté, une multiplex digital droplet (dd)RT-PCR est en cours de développement. Cette technologie en une seule étape, basée sur la répartition des molécules cibles dans 20 000 gouttelettes, limite l'inhibition de la réaction de RT-PCR et réduit la compétition entre les amorces et les sondes. Par conséquent, la méthode est très sensible. La dd RT-PCR appliquée aux AMPV est en cours de développement pour vérifier l'apport de cette technologie pour le diagnostic de routine en biologie moléculaire.

### 4.2. Activités d'expertise

Sur invitation de l'éditeur d'un ouvrage international intitulé « Avian Virology, current research and future trends », le chef d'unité et le scientifique chargé de la thématique ont rédigé un chapitre complet relatif aux métapneumovirus aviaires.

### 4.3. Activités de Recherche

Un co-financement par la région Bretagne (ARED) et le Conseil Départemental des Côtes d'Armor a permis de recruter un doctorant depuis le 1<sup>er</sup> décembre 2015 pour investiguer les bases moléculaires de la spécificité d'hôte chez les métapneumovirus aviaires. Le travail a permis de i) préciser le spectre d'hôte et le pouvoir pathogène des 4 sous-groupes d'AMPV à l'occasion d'infections expérimentales standardisées réalisées en conditions confinées chez des poulets, des dindes et des canards de barbarie exempts d'organismes pathogènes spécifiés, ii) déterminer les différences génétiques par « next generation sequencing » (NGS) en lien avec une adaptation d'un virus sur une espèce différente de l'espèce-hôte habituelle et les étudier, iii) finaliser le système de génétique inverse (GI) d'une souche pathogène française d'AMPV-C. Les virus issus de la GI ont été produits *in vitro* et des tests *in vitro* et *in vivo* en conditions confinées seront réalisés prochainement pour analyser l'impact des mutations générées sur le phénotype viral (autorisation du Haut-Commissariat aux Biotechnologies).

## 5. Activités concernant les coronavirus

### 5.1. Activités d'appui scientifique et technique

Dans le cadre du programme européen COST FA1207, l'équipe, en collaboration avec la plateforme NGS de l'UGVB, a participé à un consortium en tant qu'experts sur le NGS et les coronavirus aviaires (du 28 février au 1<sup>er</sup> mars 2017, Bruxelles, Belgique). Elle a également participé à un 2<sup>ème</sup> EILA pour tenter d'harmoniser les différentes techniques moléculaires de détection du génome des coronavirus aviaires entre les laboratoires participants en Europe. En effet, suite au 1<sup>er</sup> EILA en 2015, des difficultés de détection et de caractérisation génétique avaient été observées. L'analyse des résultats du 2<sup>ème</sup> EILA a pu démontrer l'efficacité de l'harmonisation des techniques de détection et caractérisation au niveau européen, à travers la relative cohérence des résultats de l'ensemble des participants, y compris pour notre laboratoire.

L'équipe a également répondu à i) une demande d'une équipe de recherche polonaise en tentant d'isoler sur œufs de dinde plusieurs de leurs



souches de coronavirus de la dinde (TCoV), et ii) différentes demandes de détection du coronavirus aviaires sur des échantillons de cas terrain en France.

## 5.2. Activités de recherche

Les activités de recherche de l'équipe ont pour l'essentiel été consacrées au programme de recherche ANR Epicorem consacré à l'épidémiologie des coronavirus humains et animaux.

Depuis 2016, la collaboration avec la plate-forme NGS de l'UGVB a permis de déterminer la séquence génomique complète du TCoV 080385d. La comparaison de cette souche avec d'autres coronavirus entériques proches, isolés chez la dinde aux USA ou chez la pintade en France, suggère une évolution complexe avec de multiples événements de recombinaison. Ces travaux ont donné lieu à la publication d'un article scientifique dans *Journal of General Virology*.

Les travaux visant à étudier la cinétique de transmission du TCoV 080385d in vivo chez la dinde ont été poursuivis. Lors d'une expérimentation animale, 29 dindonneaux EOPS ont pu être infectés au bout de 48 heures après les avoir mis en contact avec un dindonneau infectieux. Statistiquement (à l'aide du modèle SIR), cela signifie qu'un seul dindonneau infectieux est capable d'infecter un nouveau dindonneau sensible en 2.5 heures. Certains de ces 29 animaux ont continué à excréter des particules virales infectieuses jusque 41 jours après la mise en contact, date de fin d'expérimentation, ce qui signifie que cette longue période d'excrétion pourrait être étendue de plusieurs jours, voire semaines, comme décrit pour d'autres coronavirus (tels que le coronavirus félin). A l'occasion de ces études, il a également été démontré l'absence de transmission du virus par voie aérienne uniquement, ce qui confirme que la transmission est principalement oro-fécale, comme décrit dans littérature. L'ensemble de ces données font de cette souche un virus hautement contagieux et soulignent l'importance des bonnes pratiques sanitaires à l'entrée des bâtiments d'élevage.

Les coronavirus aviaires ayant un fort potentiel à évoluer, par des événements de sélection ou de mutation, voire de recombinaison, d'autres activités de recherche sont menées et concernent l'évolution génétique des coronavirus de la dinde (TCoV) et du poulet (IBV). Des passages

successifs sur dinde et poulet respectivement ont été réalisés avec les virus spécifiques à chaque espèce. Cependant, pour l'IBV, les poulets ont été au préalable vaccinés pour déterminer l'effet de l'immunité pré-existante sur cette évolution. L'évolution sera étudiée avec l'aide de la plate-forme NGS de l'UGVB.

## 5.3. Montage de nouveaux projets de recherche sur les coronavirus

Les études concernant le potentiel d'évolution génétique des coronavirus seront poursuivies grâce au projet de thèse « EvolCov » (co-financé par l'Anses et la Région Bretagne) qui débutera en janvier 2018 en collaboration avec l'unité GVB. Le projet étudiera les mécanismes permettant aux coronavirus aviaires (IBV et TCoV) et porcins (TGEV, PEDV), appartenant à deux genres différents de coronavirus, d'évoluer rapidement. En pratique, cette évolution pourrait leur conférer une capacité à échapper à la réponse immunitaire suite à une pression de sélection telle que la vaccination. Les connaissances acquises à l'issue du projet permettront de connaître les stratégies de contrôle les plus efficaces (notamment de mieux évaluer les risques éventuels liés à l'utilisation de vaccins vivants bivalents contre les coronavirus aviaires) vis-à-vis des coronavirus afin d'éviter ces pertes économiques et d'améliorer le bien-être des animaux.

Les travaux consacrés aux coronavirus ont été valorisés au travers de la publication d'un article dans un journal scientifique international (un autre en préparation) et de huit communications orales ou affichées en congrès nationaux ou internationaux.

## 6. Activités concernant les caliviroses des lagomorphes

### 6.1. Calicivirus responsables de la maladie hémorragique virale du lapin (RHDV)

#### 6.1.1. Activités d'appui scientifique et technique

- Fourniture sous MTA de deux souches de RHDV2 de 2013 (témoins de référence de diagnostic virologique) au NVRI (National Veterinary Research Institute) en Pologne.
- Fourniture aux laboratoires d'analyses vétérinaires français des réactifs biologiques nécessaires à la réalisation des techniques ELISA et IHA de détection du RHDV.



### 6.1.2. Activités d'expertise

- Participation au nom de l'Anses aux réunions annuelles du Groupe Filière Production Cunicole (GFPC) de l'INRA.
- Présence en tant qu'expert sur les calicivirus du lapin à une réunion organisée par la DGAL, en présence de représentants du CLIPP, de la Fenalap, du SNGTV Production cunicole, de l'ANMV, de l'ONCFS, sur la situation d'urgence sanitaire que traverse la filière cunicole avec l'arrivée du RHDV2 et le coût de la vaccination.

### 6.1.3. Activités de recherche

#### **Suivi de l'évolution génétique des RHDV et RHDV2**

Une nouvelle convention de recherche de trois ans avec l'ONCFS a débuté en septembre 2015 pour continuer l'étude de la diversité génétique des RHDV-RHDV2 et EBHSV circulant dans la faune sauvage. Elle a notamment pour but de suivre l'évolution génétique des RHDV2 et de surveiller la ré-émergence possible des RHDV classiques. Plusieurs centaines de prélèvements ont été analysés dont des échantillons de lapins infectés par du RHDV2 associés à des signalements de plus forte mortalité, notamment en élevages depuis 2016, et/ou de très jeunes lapereaux (4 semaines d'âge voire moins). Les souches récoltées dans ces élevages sont génétiquement très proches entre elles mais aussi avec des souches de la faune sauvage. Il est ainsi possible que le RHDV2 ait évolué génétiquement vers une augmentation de sa pathogénicité chez le lapin, qu'il soit d'élevage ou de la faune sauvage. Une enquête épidémiologique vient d'être proposée par l'Anses, l'ONCFS et la branche cunicole de la SNGTV afin d'améliorer la prévention et la gestion des foyers de RHD liés au RHDV2, en se basant sur une compréhension approfondie de l'épidémiologie de cette pathologie dans les élevages cunicoles et la faune sauvage. L'enjeu du projet déposé le 16 octobre 2017 à FranceAgriMer est de définir des mesures ciblées de prévention, de gestion et de décontamination basées sur l'analyse de données épidémiologiques et virologiques de terrain.

#### **Emergence des calicivirus pathogènes : poursuite du projet de recherche européen « ECALEP »**

Le projet européen ECALEP (ERA-Net Anihwa) destiné à comprendre l'émergence des

caliciviroses du lapin et du lièvre a débuté le 1<sup>er</sup> mars 2015 pour trois ans (financement ANR). Il associe l'unité (coordinateur) à sept équipes de recherche d'instituts nationaux et européens (France : ONCFS, INRA, ENVT et INSERM ; Italie : IZSLER, Portugal : CIBIO/UP et Suède : SVA). Deux hypothèses sont explorées pour tenter d'expliquer l'émergence des calicivirus pathogènes : 1) l'évolution de calicivirus non-pathogènes (NP) vers des formes pathogènes, 2) ou/et le passage de la barrière d'espèce de virus à partir d'un hôte réservoir, le lapin à queue blanche (*Sylvilagus floridanus*), espèce américaine introduite en Europe fin des années 70 et 80 peu de temps avant l'émergence de la RHD et de l'EBHS. Le projet a pour objectifs d'une part, de mieux connaître la dynamique d'évolution des calicivirus en améliorant nos connaissances sur les souches NP circulant chez les lapins des genres *Oryctolagus* et *Sylvilagus*, et les lièvres *Lepus*, et d'autre part, d'étudier les mécanismes moléculaires d'acquisition de la virulence et les relations hôte-pathogène. Plusieurs résultats intéressants ont été acquis dans les axes que nous travaillons : 1) la grande diversité génétique des lagovirus NP du lapin appartenant aux deux lignées circulant en Europe (dont l'une est proche des virus NP australiens) et l'établissement de leurs relations génétiques, 2) la détection de différents virus NP chez les lapins et chez les lièvres génétiquement trop distincts des RHDV-RHDV2 et EBHSV pour correspondre à des ancêtres communs, affaiblissant l'hypothèse d'une évolution de virus NP vers des formes pathogènes, 3) la détection de plusieurs sauts de la barrière d'espèce de lagovirus entre espèces de léporidés, puisque nous avons notamment confirmé l'infection de lièvres européens et de lièvres variables par le RHDV2. Dans le cadre de ces activités, une technicienne en CDD d'un an et des stagiaires de niveau Bac+2 et d'une licence professionnelle ont été accueillis. Des communications ont par ailleurs été présentées à deux congrès internationaux. Au cours de l'automne 2017, des prélèvements de *Sylvilagus floridanus* ont été récoltés aux USA et au Canada et la recherche de lagovirus sera entreprise à leur réception en fin d'année 2017.

#### **Proposition d'une nomenclature unifiée pour les calicivirus du lapin et du lièvre**

Plusieurs équipes internationales étudiant les calicivirus du lapin et/ou du lièvre, dont l'unité VIPAC, se sont associées pour proposer une nomenclature unifiée pour l'ensemble des



lagovirus. Un article scientifique international comprenant 52 auteurs a été publié en 2017. Cette proposition devra être validée par le Comité international de la taxonomie des virus (ICTV).

***Démarrage d'une thèse de l'Université de Rennes 1 sur les « Mécanismes évolutifs et moléculaires pouvant expliquer l'émergence des lagovirus pathogènes »***

Une thèse cofinancée par le CD22 et Saint-Brieuc Armor Agglomération a débuté le 1<sup>er</sup> janvier 2017. Elle a pour but 1) d'améliorer les connaissances moléculaires des lagovirus afin de mieux connaître leur dynamique d'évolution, 2) de caractériser des motifs génétiques potentiel de pathogénicité en ayant recours à la modélisation moléculaire, 3) de mettre au point un système de génétique inverse afin de répondre à la question de l'origine de la pathogénicité chez les lagovirus du lapin. Plusieurs séquences dont celles de génomes entiers ont été obtenues sur des lagovirus non pathogènes du lapin (Rabbit calicivirus « RCV-E1 » et « RCV-E2 ») et du lièvre (Hare calicivirus « HaCV ») très peu étudiés auparavant. En ce qui concerne la recherche d'acides aminés potentiellement impliqués dans la pathogénicité des RHDV et EBHSV, une cinquantaine de sites ont été identifiés *in silico* sur le gène codant la protéine de capsid VP60 et sont en cours d'analyse en prédiction de structure 3D à l'Inserm-Nantes. Par ailleurs, la stratégie de génétique inverse a été mise en place. Le génome de la souche RHDV sélectionnée a été amplifié en une seule PCR et la séquence obtenue a été vérifiée par séquençage.

## **6.2. Calicivirus responsable du syndrome du lièvre brun (EBHSV)**

### **6.2.1. Appui scientifique et technique**

- Développement et diffusion en mai 2017 aux trois laboratoires d'analyses vétérinaires spécialisés dans le diagnostic des caliciviroses (Inovalys-Angers, LEA Vendée, Labeo Orne) d'une méthode de RT-PCR en temps réel pour le diagnostic différentiel de l'EBHS et du RHDV2 chez le lièvre (voir paragraphe 6.2.2). Cette méthode en un seul puits et en présence d'un contrôle interne, a été validée selon la norme NF U47-600-2 « Méthodes d'analyse en santé animale – PCR (partie 2 : Exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en Santé animale). Ce travail a été co-financé par l'ONCFS (réseau

SAGIR) et l'Anses dans le cadre de la convention-cadre de partenariat établie entre les deux instituts en janvier 2014 pour 3 ans reconductibles. La mise au point de la méthode a fait l'objet d'une communication aux Journées Francophones de Virologie (mars 2017) et dans la Lettre du réseau SAGIR de mai 2017, et sera valorisée au travers d'un article scientifique international courant 2018.

- Fourniture aux laboratoires d'analyses vétérinaires français des réactifs biologiques nécessaires à la réalisation de la technique ELISA de détection de l'EBHSV et des témoins nécessaires à l'adoption et l'utilisation des RT-PCR temps réel EBHSV et EBHSV-RHDV2.
- Prestation de service pour le Réseau de Surveillance Sanitaire de la Faune Sauvage de l'Université de Liège (Pr Annick Linden) : « Détection par RT-PCR temps réel du virus de l'EBHS dans 18 prélèvements de foie de lièvre récoltés en Belgique entre 2013 et 2016 ».

### **6.2.2. Activités de recherche**

#### ***Suivi de l'évolution génétique des lagovirus du lièvre : mise en évidence de l'infection des lièvres par le RHDV2***

La nouvelle convention de recherche de trois ans avec l'ONCFS qui a démarré en septembre 2015 a aussi permis d'étudier les lagovirus circulant dans les populations de lièvres français. Ainsi, en plus du suivi des souches EBHSV qui montre la persistance de trois groupes génétiques, des cas d'infection par le RHDV2 de lièvres morts avec des signes évocateurs d'EBHS ont été caractérisés entre septembre 2013 et février 2015. Ces souches de RHDV2 sont identiques à celles qui infectent les lapins. L'étude exhaustive entreprise sur 207 échantillons de lièvres morts récoltés en 2015 par le réseau SAGIR a montré que parmi les lièvres infectés par un lagovirus, 37% l'étaient par le RHDV2 mettant en évidence une large diffusion de ce virus dans les populations de lièvres. Ces résultats ont fait l'objet d'un article scientifique dans une revue vétérinaire internationale et de deux communications à des congrès internationaux. L'étude reconduite sur les prélèvements récoltés en 2016 confirme cette forte proportion. Par ailleurs, afin d'adapter le diagnostic des cas de maladie hémorragique chez le lièvre, une convention d'étude de six mois avec l'ONCFS a été établie afin de développer une méthode de diagnostic en RT-PCR en temps réel triplex (RHDV2-EBHSV-Contrôle Interne)



permettant de diagnostiquer en une seule analyse le (les) virus responsable(s) de la mortalité observée (voir paragraphe 6.2.1).

Les travaux consacrés aux caliciviroses des Léporidés ont fait l'objet de 3 articles publiés dans des journaux scientifiques internationaux avec comité de lecture et de 8 communications orales ou affichées dans les congrès nationaux ou internationaux.

## 7. Activités concernant les coccidioses aviaires

### *Evolution de l'outil expérimental*

L'équipe a continué à travailler avec le personnel du service d'expérimentation SELEAC qui est affecté en parasitologie et la Structure Bien Etre Animal (SBEA) du laboratoire, pour faire évoluer les conditions d'hébergement des animaux utilisés pour les expérimentations en parasitologie. Un prototype de cage répondant aux besoins spécifiques des études de parasitologie et conforme à la réglementation sur le bien-être des animaux a été élaboré et testé avec des poulets et des dindonneaux. Grâce aux crédits obtenus en 2017 (soutien de Zoopôle développement et des collectivités via le CPER), à l'appel d'offre lancé au début de l'été et à la sélection d'un fournisseur pour fabriquer les nouvelles cages, l'ensemble des installations qui le nécessitent pourront être remplacées à la fin de cette année et au tout début de l'année prochaine.

Dans cette démarche d'amélioration des installations, des appareils de mesure ont été installés dans toutes les animaleries afin de faire un suivi fin et quotidien des conditions d'ambiance (hygrométrie, température et pression). L'ensemble du nouveau dispositif et des conditions de suivi a été validé lors de la dernière inspection de la DDPP en septembre 2017.

### *Partenariat avec Zoopôle développement et le CTPA, transfert de savoir-faire*

Les compétences du laboratoire de parasitologie en matière de reproduction expérimentale contrôlée de la coccidiose sont reconnues depuis de nombreuses années. Des dizaines d'essais d'efficacité de produits candidats à la maîtrise des coccidioses aviaires ont été réalisés dans nos locaux depuis la création du laboratoire. Un recentrage des missions de l'Anses et la déontologie de l'agence en matière de partenariat

public privé, ne lui permettent pas de réaliser désormais ce type d'essais. Dans le cadre de la convention qui nous lie à Zoopôle Développement, les savoir-faire correspondants à ces essais ont été transférés au Centre Technique des Productions Animales (CTPA) de la technopole de Saint-Brieuc Armor (TSBA). Les connaissances acquises permettront au CTPA de réaliser ces essais en autonomie, en accédant aux installations confinées de l'Anses selon les conditions prévues par ce partenariat.

Durant les deux années passées, le personnel de l'équipe de parasitologie a formé les agents de CTPA sur les différents aspects de ces essais, de la mise en place des poussins au nettoyage et à la désinfection du matériel et des salles après la fin des essais, en passant par la réalisation des inoculums de coccidies, la notation des lésions causées par les principales espèces, la notation des critères zootechniques et pathologiques d'intérêt en cours d'étude... Aujourd'hui, le CTPA est opérationnel et autonome pour mener à bien des essais d'efficacité sur une coccidiose clinique induite, et deux essais ont déjà été réalisés en autonomie totale. L'objectif est que CTPA puisse réaliser jusqu'à six essais par an avec les partenaires qui solliciteront la structure.

### *Suite et fin du projet de recherche sur les coccidies : MEFECOX*

Ce projet s'inscrivait dans une approche d'amélioration de la qualité sanitaire des produits avicoles par la recherche de voies alternatives de lutte contre les coccidies, et il a été baptisé MEFECOX, pour MEdcanismes de FEcondation des COCCidies. Il a été soutenu de 2013 à 2016 par un consortium constitué de grandes structures de production, de firmes services et d'organisations interprofessionnelles et financé par les Régions Bretagne et Pays de la Loire et les collectivités locales l'agglomération de Saint Brieuc. Le projet est maintenant terminé et le rapport final est en cours de rédaction.

L'objectif principal de ce projet était d'étudier l'étape de gamogonie (la reproduction sexuée du cycle de développement) de deux espèces de coccidies, l'une spécifique du poulet, *Eimeria acervulina*, et l'autre spécifique de la dinde, *Eimeria meleagridis*. Cette partie du cycle est très mal connue, peu étudiée, et n'est la cible d'aucune des approches de lutte actuelle.

La première étape a consisté à récolter des matières fécales dans les élevages des membres



du consortium, de façon hebdomadaire, afin de suivre la cinétique d'excrétion des parasites mais surtout de collecter des isolats et d'étudier leur aptitude à sporuler.

Cette étape a permis de constater que les cinétiques d'excrétion d'oocystes sont très diverses entre élevages, et même entre bandes consécutives dans un même bâtiment.

La seconde étape qui visait à étudier la variabilité de l'aptitude à sporuler a été réalisée après avoir purifié les coccidies ciblées dans les isolats collectés. Ici aussi, nous avons constaté que cette aptitude à sporuler était variable et apparemment pas liée au potentiel pathogène des parasites.

Par la suite, afin de mettre au point un modèle de fécondation *in vitro*, nous avons développé et optimisé une méthode de purification des gamètes mâles. Des essais de mise en contact avec des macrogamètes et des oocystes jeunes ont été réalisés dans différentes conditions (milieux, températures...) mais aucune différence dans les pourcentages de sporulation n'a pu être observée par rapport à des oocystes jeunes peu aptes à sporuler. Le modèle a été réorienté afin d'étudier la viabilité au cours du temps des gamètes mâles pour tester des produits susceptibles d'agir directement sur ces stades parasitaires. Les quelques produits testés n'ont pas permis d'obtenir de résultats intéressants.

Nous avons alors testé *in vivo* des produits susceptibles d'avoir un effet sur les microgamètes mâles et suivi l'excrétion d'oocystes et leur aptitude à sporuler, de même que les critères zootechniques et pathologiques chez les oiseaux infectés ou non, recevant ou non les produits à différentes concentrations. Les résultats n'ont pas été concluants, mais nous avons observé une toxicité de certains composés à forte dose.

Bien que tous les objectifs de ce projet n'aient pas été atteints, des éléments essentiels pour la poursuite de cette approche ont été obtenus : la purification efficace des gamètes mâles des deux espèces de coccidies et la mise au point de tests *in vitro* permettant de mesurer leur survie au cours du temps. Ce travail nous a permis également de mettre en évidence des phénomènes non décrits jusqu'à présent lors de la gamogonie, comme la présence conjointe de deux formes de gamètes mâles : une forme biflagellée déjà décrite et nouvelle une forme munie d'une queue. De même, des observations sur l'évolution du micropyle chez l'oocyste jeune nous font supposer

que la fécondation pourrait avoir lieu au niveau de cette structure, et que le modèle de fécondation *in vitro* pourrait être repensé en tenant compte de ces données (la survie des gamètes mâles étant à présent maîtrisée, il est prévu de travailler sur l'obtention de jeunes oocystes avec un micropyle ouvert).

Valorisation

Communication au Poultry Parasite Symposium à Vienne (Autriche) en juillet 2016

Communication au congrès ApiCOWplexa à Madrid (Espagne) en octobre 2017

Un article re-soumis, deux en préparation sur les thèmes abordés dans les communications au congrès de 2016 et 2017

Dépôt d'un projet PhaSeAp (étude de la Phase Sexuée des Apicomplexa) auprès de l'ANR pour faire suite à MEFECOX, non retenu (10-2016)

### ***Implication dans un projet en partenariat avec l'unité EBEAC***

Projet CASDAR – Synergies pour la santé des élevages biologiques

Ce projet qui vise à mieux comprendre les spécificités de l'élevage biologique de poulets de chair, afin d'identifier des éléments susceptibles d'améliorer la santé dans les élevages, s'est terminé en 2016. Piloté par l'ITAB (Institut Technique de l'Agriculture Biologique), son volet épidémiologique avec recherche de parasites indicateurs de l'état de santé digestive, a été conduit par l'Unité EBEAC avec support de notre équipe pour la recherche et l'identification de ces parasites. La restitution finale des résultats de tout le projet a eu lieu le 7 juin 2016 à Paris. Un cahier technique sur la santé des volailles en agriculture biologique a été édité par l'ITAB, intitulé « Gestion Sanitaire des Elevages de Volailles de Chair en Agriculture Biologique et Méthodes de Prévention Sanitaire » avec illustrations fournies dans le chapitre 2, et corédaction du chapitre 5. Réalisation de cinq fiches pédagogiques (coccidioses, histomonose, cestodes, nématodes et entérite nécrotique).

### ***Mise en place d'un observatoire des helminthes en aviculture***

En partenariat avec l'ITAVI, un projet de suivi des infestations à helminthes chez les volailles a été envisagé. Cette réflexion part d'un constat remontant du terrain de la recrudescence de la



présence de ces parasites, qui risque de s'accroître avec le développement de pratiques qui leur sont favorables : élevage en plein air, bio, label... Dans ce projet, un premier volet est dévolu à notre laboratoire, pour développer, valider et transférer une méthodologie efficace et simple pour mettre en évidence et identifier les helminthes présents dans les élevages. En effet, le dépistage de certains genres et l'identification de certaines espèces semble poser de gros problèmes, notamment pour les capillaires et l'identification de certains cestodes. Or, il est capital de pouvoir dépister et identifier les vers présents, afin de juger de l'intérêt ou non de traiter le troupeau.

Les étapes suivantes seront la mise en place d'un outil de collecte de résultats utilisable par les laboratoires qui auront adhéré au projet afin de collecter des informations sur la prévalence des différents helminthes, et d'avoir un recul sur les productions les plus à risque et à terme d'appréhender d'éventuelles résistances aux anthelminthiques utilisés. Ces aspects seront pilotés par l'ITAVI, en partenariat étroit avec l'Anses Ploufragan-Plouzané et nous interviendrons également dans la restitution des informations aux laboratoires partenaires.

### **Projets collaboratifs prévus**

Dans les travaux sur le botulisme aviaire menés par l'U HQPAP (C. Le Maréchal), un modèle d'infection durable avec *Clostridium botulinum* doit être développé. Un essai de co-infection avec une souche non toxigène de la bactérie et *Eimeria tenella* (qui a un tropisme caecal) est envisagé dans le premier trimestre 2018, pour étudier la possibilité d'induction de l'implantation durable de *C. botulinum* grâce à la coccidie.

Dans le cadre du projet Qualicouv conduit par l'U EBEAC et l'ITAVI de Ploufragan, un essai de suivi de la résistance du poussin en fonction des conditions de pré-incubation est envisagé avec infection expérimentale des oiseaux avec des coccidies. Cet essai doit être réalisé dans le courant de l'année 2018.

### **Activités complémentaires**

*Formations pratiques au diagnostic de coccidiose chez le poulet :*

Ces formations sur une journée sont organisées en partenariat avec Avipôle Formation et l'ISPAIA,

et comportent une partie de rappels théoriques (1h30) et des observations d'animaux infectés avec différentes espèces de coccidies administrées à différentes doses et l'observation des lésions associées à leur développement dans les différentes parties du tube digestif cibles de ces parasites. Les participants sont des acteurs de l'aviculture (vétérinaires, technicien et personnel de laboratoires d'analyses vétérinaires) de France mais aussi régulièrement de l'Union Européenne. Elles sont dispensées en français ou en anglais. Pour pouvoir, conformément à la réglementation, limiter l'utilisation des animaux dans un cadre de formation, tout en répondant à une demande de formation toujours soutenue, un projet de module e-Learning envisagé et initié lors du précédent biennium en partenariat avec l'ISPAIA est toujours en cours d'élaboration. Plusieurs modules sont pratiquement finalisés grâce au travail réalisé par l'ISPAIA. Une première version du projet (en anglais) devrait voir le jour dans le premier trimestre 2018.

*Interventions dans des cours de spécialisation en pathologie aviaire :*

CEAV de Nantes Oniris (03-2017), DE de Pathologie Aviaire de l'ENV Alfort (05-2017), Formation TSA d'Avipôle Formation, Actualités « terrain » en pathologie aviaire avec Avipôle Formation (06-2016), intervention dans la formation « Master Poultry : intestinal integrity » avec ISPAIA (11-2016), intervention dans le Master Ingénierie et Nutraceutique de l'Université de Rennes I (03-2017)

Poursuite de la collaboration à distance avec un laboratoire en Norvège pour la mise au point d'un modèle d'entérite nécrotique chez la dinde, faisant suite à nos travaux antérieurs sur l'entérite nécrotique (communication à la 1st International Conference on Necrotic Enteritis in Poultry à Copenhague au cours du biennium précédent - juin 2015). Cependant, les nouvelles normes d'hébergement s'imposant depuis janvier 2017 pour les expérimentations sur dindes ayant réduit les effectifs qu'il est possible d'étudier dans nos locaux ainsi que notre capacité à produire des oocystes de coccidies de dindes, nos partenaires norvégiens se tournent aujourd'hui vers d'autres laboratoires plus aptes à fournir le matériel nécessaire à la poursuite de leurs études.



## SERVICE D'ELEVAGE ET D'EXPERIMENTATION AVICOLE ET CUNICOLE

Effectif : 21 personnes

Chef de service : Alassane KEÏTA

Responsables de secteur : Secteur confiné (Michel AMELOT)

Secteur conventionnel (Manuel TAVARES)

Secteur EOPS (Lionel LE MOAL)

Le SELEAC conduit des études et des expérimentations, au service des unités de l'Anses Ploufragan travaillant sur les volailles et les lapins (voir rapports des unités EBEAC, GVB, HQPAP, MB et VIPAC) mais il génère aussi des projets de recherche dans son champ de compétence. Ce service est également partie prenante de l'Unité Mixte Technologique (UMT) SANIVOL dont le but est d'optimiser la gestion sanitaire des élevages avicoles au travers de la santé de l'animal, de l'éleveur et du consommateur, en partenariat avec l'unité EBEAC et l'ITAVI.

Après une description des moyens expérimentaux, les projets propres développés par le service sont présentés.

### 1- Les moyens expérimentaux du SELEAC : situation actuelle et évolution future

Le service est divisé en 3 secteurs :

#### 1.1. SECTEUR EOPS

Il est consacré aux animaux exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) pour la production d'animaux à statut microbiologique contrôlé. Il comprend 3 bâtiments protégés :

- La période 2015-2017 a été marquée par la mise en service et le test de nouvelles cages pour les dindes reproductrices, dans le but d'être en conformité avec Directive 2010/63 UE (bien-être des animaux en expérimentation). Cette unité EOPS dindes mesure 354 m<sup>2</sup> et abrite un incubateur et un éclosoir). L'effectif de dindes reproductrices est passé de 110 à environ 55. Cet effectif permet de couvrir les besoins du laboratoire.
- Une unité EOPS poules qui comporte deux zones indépendantes : une partie démarrage et une partie ponte, séparées par des locaux de

stockage, d'incubation etc. Elle abrite un incubateur et un éclosoir, pour un effectif d'environ 480 pondeuses et une surface de près de 1000 m<sup>2</sup>. Ces installations sont conformes aux normes d'élevage des volailles en expérimentation.

- Une unité EOPS canes (180 reproductrices) avec un bâtiment de 196 m<sup>2</sup>, un incubateur et un éclosoir.

Par ailleurs, ce secteur EOPS comprend un bâtiment protégé de 164 m<sup>2</sup> avec 8 isolateurs d'environ 4m<sup>2</sup> chacun, un incubateur et un éclosoir. Ce bâtiment sert à héberger les poulets EOPS pendant leur élevage avant expérimentation.

#### 1.2. SECTEUR CONFINE

Il est consacré aux infections expérimentales bactériennes et virales. Il comprend:

- Des installations ayant un niveau de confinement 2 : huit animaleries (25 m<sup>2</sup> chacune) et neuf isolateurs (1,4 m<sup>2</sup> chacun). Ces installations permettent de réaliser des infections bactériennes ou virales.
- Des installations ayant un niveau de confinement 3, en cours de validation : trois animaleries (25 m<sup>2</sup> chacune) et quatre isolateurs (4 x 1,4 m<sup>2</sup>). Cet outil permet de réaliser des travaux sur des virus hautement pathogènes (influenza aviaire) ou zoonotiques dans des conditions optimales de sécurité, l'ensemble de la zone de confinement 3 étant doté d'une filtration atmosphérique renforcée (double filtration HEPA à l'extraction), d'un sas de douche et changement de vêtements spécifique et d'un autoclave en frontière pour la stérilisation des déchets solides issus de cette zone.

Afin d'éviter les risques de contamination de l'environnement, l'ensemble des effluents liquides



issus de ces différentes animaleries est collecté et stérilisé par traitement thermique, les déchets solides issus des animaleries et isolateurs étant détruits – après autoclavage pour ceux issus de la zone A3 – à l'aide d'un incinérateur situé dans le bâtiment expérimental lui-même.

### 1.3. SECTEUR CONVENTIONNEL

Il comporte des installations dont les conditions sont proches de l'élevage en grandeur réelle.

La période 2015-2017 a été marquée par :

- La fermeture de la fabrique d'aliment. De l'aliment thermisé, en vrac, est désormais fourni aux volailles et porcs en secteur expérimental par une fabrique commerciale d'aliment sous la forme d'un contrat établi avec l'Anses. Un local a été construit en vue de mettre en sacs ces aliments avant acheminement vers les troupeaux concernés.
- La destruction d'environ 5000 m<sup>2</sup> de bâtiments anciens
- La définition du cahier des charges en vue de la construction du bâtiment destiné à évaluer le bien-être et la santé des volailles de chair à l'aide de capteurs destinés à l'élevage de précision. La maîtrise d'œuvre a également été recrutée pour une construction du bâtiment sur l'année 2018.
  - Ce bâtiment, d'environ 1500 m<sup>2</sup> avec six salles indépendantes pour un total de 48 parquets, aura comme innovations principales :
  - La possibilité d'accéder à un parcours extérieur (« jardin d'hiver ») pour la moitié des animaux
  - Des systèmes économes en énergie (lampes LED, échangeurs récupérateurs de chaleur, trappes d'entrée d'air à ouverture variable, ventilateurs économes et progressifs etc)
  - Un système de chauffage n'entraînant pas de vapeur d'eau dans le bâtiment par l'utilisation d'aérothermes à eau chaude plutôt que des aérothermes à gaz à combustion interne
  - Des innovations pour un bien-être animal renforcé dans le cadre de l'élevage de précision: plancher chauffant, lumière naturelle, suivi automatique d'un certain nombre de paramètres (eau, aliment, conditions d'ambiance, activité et

comportement des animaux avec logiciel d'analyse).

Par ailleurs, le travail pour définir le cahier des charges d'un autre bâtiment, destiné à évaluer le bien-être des volailles reproductrices, en lien avec leur descendance, a également commencé.

Ces opérations de construction et de rénovation sont faites dans le cadre d'un financement du CPER 2016-2020, conjointement avec l'INRA, Zoopôle développement et Laboce.

Ce secteur conventionnel comprend également un couvoir, équipé de deux incubateurs d'une capacité de 9000 œufs chacun.

## 2. Les projets pilotés par le service

### 2.2. Ambiance en bâtiment dynamique et statique pour les poules reproductrices : relation avec la santé et le bien-être

Le bien-être animal est un sujet de préoccupation majeur pour de plus en plus de citoyens européens. L'aviculture et en particulier l'élevage des reproducteurs sont fréquemment la cible de critiques de la part d'associations de défense de la cause animale. Un rapport de l'Autorité européenne de sécurité des aliments a mis en évidence les aspects critiques liés au bien-être en élevage reproducteur (rationnement alimentaire, mutilations zootechniques, besoin d'enrichissement du milieu de vie, etc.) (EFSA, 2010).

Les conditions de vie des animaux sont conditionnées par le logement dans lequel ils évoluent. En effet, pour le moment, il n'existe pas de norme européenne spécifique pour l'élevage reproducteur. Ainsi, les éleveurs sont libres de choisir le type de bâtiment et d'enrichir ou non le milieu de vie des animaux, tant qu'ils rentrent dans le cadre réglementaire défini par les textes européens concernant l'élevage d'animaux de rente (Journal officiel des Communautés européennes, 1998). Deux types de ventilation sont utilisés en bâtiments de reproducteurs actuellement : la ventilation statique (par les courants d'air naturels) et la ventilation dynamique (par des turbines). Dans les pays d'Europe du nord, pour des raisons climatiques, la ventilation dynamique est utilisée avec succès en élevage reproducteur. Elle se développe également de plus en plus en France où la plupart des élevages disposent néanmoins encore d'une



ventilation statique. Celle-ci étant dépendante des conditions météorologiques, elle ne permet pas, *a priori*, de régler aussi finement les paramètres d'ambiance que la ventilation dynamique. Ainsi, on peut supposer que les conditions d'ambiance sont meilleures en bâtiment dynamique qu'en bâtiment statique, en particulier pendant l'hiver. Si cela se vérifie, le bien-être, la santé et les performances des animaux élevés en bâtiment dynamique devraient être meilleurs.

En collaboration avec le couvoir Perrot (Pommerit Jaudy) et l'ITAVI, dans le cadre d'un financement de la Région Bretagne, nous avons mis en place une étude pour comparer l'ambiance en bâtiment entre la ventilation statique et la ventilation dynamique, et voir son impact sur le bien-être, la santé et les performances de poules reproductrices chair et leurs issus.

### **2.2.1. Bâtiments suivis**

Nous avons suivi deux bandes complètes de poules et de coqs reproducteurs, élevés dans deux types de bâtiments différents.

Les deux bâtiments étudiés sont respectivement un bâtiment à ventilation naturelle (VN) d'une vingtaine d'année, et un bâtiment à ventilation dynamique (VD) récent, n'ayant effectué qu'une seule bande d'élevage et doté d'un système de chauffage. L'étude a été réalisée sous la bannière de l'UMT Sanivol, en collaboration avec l'ITAVI (enregistrement des paramètres d'ambiance et de consommation d'énergie) et les unités EBEAC (conseils sur le protocole vis-à-vis de critères du bien-être animal), MB (suivi de la contamination E. coli des OAC), GVB (réalisation des PCR sur certains marqueurs de stress, étude transcriptomique) de l'Anses Ploufragan. Pour la première bande, des œufs provenant des deux bâtiments ont été incubés à l'Anses pour voir si une éventuelle différence constatée au niveau des reproducteurs pouvait se répercuter sur les issus mais ces résultats ne sont pas présentés dans ce rapport.

### **2.2.2. Paramètres d'ambiance**

Pour chaque bande suivie, la température et l'hygrométrie ont été mesurées en continu (mesures sur un pas de temps de 2 min, moyennées toutes les 30 min), dès la mise en place de animaux jusqu'à leur départ, à l'aide de capteurs (KIMO KTH 350 et KH 200®) placés à l'intérieur (4 capteurs), et à l'extérieur (1 capteur) de chacun des bâtiments. De plus, les concentrations en poussières totales ont été

mesurées dans les deux bâtiments en simultanée, lors de campagnes de mesures de 24 heures : début de ponte, milieu de ponte et fin de ponte, en utilisant un capteur CIP 10® Tecora, ainsi qu'un capteur Sidepack AM 510®.

Enfin, les concentrations en dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), ammoniac (NH<sub>3</sub>), et eau (H<sub>2</sub>O), ont été mesurées en continu sur plusieurs périodes des lots suivis, à l'aide d'un analyseur de gaz INNOVA 1412® (spectrométrie infrarouge) couplé à un échantillonneur INNOVA 1309®. Ces mesures de concentrations gazeuses ont été réalisées lors de 3 campagnes de mesures d'une semaine successivement dans chacun de bâtiments étudiés : début de ponte, milieu de ponte et fin de ponte.

Les consommations énergétiques ont également été notées dans les deux bâtiments.

### **2.2.3. Evaluation de la maîtrise sanitaire des bâtiments**

Pour les deux bâtiments, un suivi cinétique de la pression de contamination a été réalisé pour chacune des bandes suivies, en début, milieu et fin de ponte. Des chiffonnettes pour recherches bactériologiques ont ainsi été effectuées sur les entrées et sorties d'air, les parois du bâtiment, le matériel d'alimentation et d'abreuvement et le convoyeur d'œufs. Enfin, des analyses physico-chimiques et bactériologiques ont été réalisées sur des prélèvements d'eau d'abreuvement.

### **2.2.4. Paramètres de santé et de bien-être des reproducteurs**

Les paramètres suivants ont été suivis dans chaque élevage:

- Etat d'emplumement et lésions de pododermatites : 20 poules tous les mois
- Suivi de la contamination bactériologique des œufs avec isolement d'E. coli: 30 œufs par mois
- Evaluation du stress physiologique à travers le niveau d'expression des protéines de stress : 20 poules en début, milieu et fin de ponte
- Evaluation de la prise vaccinale vis-à-vis de la maladie de Newcastle par la mesure de la quantité d'anticorps protecteurs : 20 poules en début, milieu et fin de ponte
- Résultats techniques de production : mortalité, nombre d'œufs pondus par poule et par semaine, résultats d'incubation et d'éclosion



## 2.2.5. Résultats

### 2.2.5.1. Paramètres d'ambiance

#### Température et hygrométrie

En période hivernale, l'analyse d'une période de quatre jours froids et humides a montré que la température ambiante moyenne, bien que similaire dans les deux bâtiments, était cependant mieux contrôlée dans le bâtiment VD, avec des amplitudes beaucoup plus élevées dans le bâtiment VN. Ces températures sont maintenues dans le bâtiment VD par le chauffage, en conservant une ventilation permettant de maintenir des conditions d'hygrométrie acceptables. Dans le bâtiment VN par contre les taux d'hygrométrie (autour de 90%) sont révélateurs d'une ambiance "confinée" avec un renouvellement d'air limité pour maintenir les températures au niveau souhaité. Ce confinement génère probablement une humidification plus forte des litières.

En période estivale, l'analyse d'une période de deux jours au cours desquels la température extérieure a été supérieure à 30°C, a montré un comportement similaire des deux bâtiments quant à la gestion de ce paramètre.

#### NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>, consommation d'énergie

D'une manière générale, on observe des concentrations moyennes en CO<sub>2</sub> à l'intérieur des deux bâtiments plus élevées en hiver par rapport au reste de l'année, ce qui s'explique par des débits d'air relativement faibles pendant cette période à cause des températures extérieures basses. La comparaison des deux bâtiments montre des concentrations moyennes plus élevées en CO<sub>2</sub> à l'intérieur du bâtiment VN en hiver et au printemps mais l'effet inverse est observé en été. Il est à noter que ces valeurs moyennes de concentration de CO<sub>2</sub> restent inférieures à la limite maximale autorisée par la réglementation européenne relative au bien être des poulets de chair (3 000 ppm pour le CO<sub>2</sub> selon la directive 2007/43).

Comme pour le CO<sub>2</sub>, La comparaison des deux bâtiments montre des concentrations moyennes plus élevées en NH<sub>3</sub> à l'intérieur du bâtiment VN en hiver et au printemps mais l'effet inverse est observé en été. Il est à noter que les valeurs moyennes hivernales et printanières de concentration en NH<sub>3</sub> sont supérieures à la limite maximale autorisée par la réglementation européenne relative au bien être des poulets de

chair quel que soit le bâtiment (entre 40 et 70 ppm au lieu 20 ppm maximum selon la directive 2007/43).

Les consommations d'énergie, comme cela était attendu, sont en revanche défavorables au bâtiment VD. Les gains obtenus au niveau de la gestion de l'ambiance, grâce à l'utilisation des ventilateurs et du chauffage, sont réalisés inévitablement au détriment de consommations énergétiques supplémentaires.

### 2.2.5.2. Evaluation de la maîtrise sanitaire des bâtiments

Bien que les protocoles de nettoyage et désinfection mis en place dans chacun des bâtiments soient similaires, une moins bonne réduction de la pression de contamination en flore aérobie mésophile et en coliformes présumés à 30°C est observée dans le bâtiment VN. Les surfaces plus neuves présentes dans le bâtiment VD pourraient contribuer à une meilleure aptitude du bâtiment au nettoyage et à la désinfection, et donc à la réduction de la pression de contamination entre deux bandes consécutives.

### 2.2.5.3. Paramètres de santé et de bien-être des reproducteurs

#### Etat d'emplumement et lésions de pododermatites

Il n'y a pas de différence notable entre les deux bâtiments quant à l'évolution de ces deux paramètres. A partir de la moitié de la bande, toutes les poules inspectées présentaient des pododermatites à un stade plus ou moins avancé.

#### Résultats techniques de production

Le taux de mortalité est significativement moins élevé dans le bâtiment VD, comparativement au bâtiment VN ;

L'évolution du nombre hebdomadaire d'œufs pondus par poule mise en place n'est pas différente entre les deux bâtiments (163 dans le bâtiment VN *versus* 164 dans le bâtiment VD) ;

Au cours de la bande d'élevage, le nombre cumulé d'éclosions évolue de façon identique dans les deux bâtiments, de telle sorte qu'au final, les poules des deux lots atteignent le même nombre d'éclosions ;

Le suivi de la contamination bactériologique des œufs montre une évolution similaire dans les deux bâtiments (flore aérobie mésophile totale). En



particulier, aucun isolement d'E. coli résistant aux céphalosporines de troisième génération n'a été réalisé.

Pour l'évaluation du stress physiologique, le niveau d'expression des ARNm des protéines de stress (HSP70, HSP90alpha et bêta et HMGCR) n'est pas significativement différent entre les poules des deux bâtiments, quelle que soit la phase de prélèvement (juste après mise en place des poules ou en cours de bande)

Les résultats d'analyses concernant la prise vaccinale montrent que la protection contre la maladie de New Castle est assurée quel que soit le type de bâtiment. Aucune différence n'est donc notée selon le type de bâtiment.

### 2.2.6. Conclusion

Le bâtiment VD confirme un potentiel plus important de gestion de l'ambiance, en particulier au niveau de la maîtrise des paramètres température et hygrométrie en période froide. Les concentrations d'ammoniac restent cependant un paramètre difficile à maîtriser, bien que le bâtiment VD semble apporter un léger gain par rapport au bâtiment VN. Le bâtiment VD étant neuf au moment de l'étude, il s'agissait des deux premières bandes conduites par l'éleveur. De ce fait, il est possible d'imaginer des marges de progrès quant à la gestion de l'ambiance et en particulier sur la maîtrise des concentrations d'ammoniac, en considérant que l'éleveur affinera ses réglages au fur et à mesure des bandes, et ainsi optimiser le fonctionnement du bâtiment (renouvellement d'air, gestion du chauffage). Cet avantage du bâtiment VD ne s'est pas traduit en termes de santé et de bien-être pour les animaux, excepté le taux de mortalité plus faible dans le bâtiment VD. Ce projet nous a cependant permis d'accroître nos connaissances sur la production des poules reproductrices avec, par exemple la définition de marqueurs de stress physiologiques.

### 2.3. Améliorer la conduite de l'élevage des poulets de chair en intégrant la mesure de la concentration en CO<sub>2</sub> dans la régulation de la ventilation du bâtiment

La production de poulets à fort potentiel génétique nécessite une conduite fine pour subvenir à leurs besoins, notamment en oxygène pour éviter des désordres sanitaires et de bien-être et pour optimiser la production. Différents capteurs

(Température, hygrométrie...) sont déjà utilisés pour donner des informations sur l'ambiance.

Alors que la Directive européenne 2007/43/CE (relative au bien-être des poulets de chair et transcrite en droit français par l'arrêté du 28 juin 2010) prévoit un taux maximum de 3000 ppm de CO<sub>2</sub> dans les bâtiments, il n'existe pas encore de méthode fiable de mesurage de ce gaz. Depuis la mise en application de cet arrêté, quelques constructeurs de matériel de régulation ont intégré des capteurs de CO<sub>2</sub> à leurs boîtiers. Jusqu'à ce jour, sauf dans de rares cas, ces capteurs délivrent uniquement une information à l'éleveur sans agir sur la chaîne de régulation des organes du bâtiment en raison de la méconnaissance des niveaux de CO<sub>2</sub> atteints mais aussi et surtout en raison du fort risque d'handicaper la rentabilité de l'élevage du fait d'une possible surconsommation de chauffage.

En collaboration avec l'ITAVI au sein de l'UMT Sanivol, l'INRA (UMR SAS), la chambre d'Agriculture de Bretagne et Avipole formation dans le cadre d'un financement Casdar, le projet GestCO<sub>2</sub> se propose i) d'élaborer une méthodologie de mesurage du CO<sub>2</sub> adaptée aux contraintes des bâtiments avicoles ii) de proposer des outils d'aide à la conception pour les équipementiers et à l'utilisation pour les éleveurs, permettant d'utiliser la concentration en CO<sub>2</sub> dans le boîtier de régulation de la ventilation. L'objectif final est donc d'optimiser la ventilation pour améliorer la santé et le bien-être des poulets de chair en intégrant la concentration en CO<sub>2</sub> dans le pilotage de l'ambiance.

#### 2.3.1. Mise au point d'une méthodologie de mesurage du CO<sub>2</sub> dans un bâtiment de poulets

Après une phase de recherche bibliographique ayant permis de sélectionner 5 capteurs commerciaux (4 autonomes et un dépendant) selon les critères suivants : technologie « infra-rouge non dispersif », plage de mesure de 0 à 10 000 ppm, précision de mesure de  $\pm 100$  ppm ou  $\pm 5\%$  de la mesure effectuée, une méthodologie de mesurage du CO<sub>2</sub> a été mise au point en bâtiment expérimental à l'Anses.

##### 2.3.1.1. Protocole

Deux salles indépendantes (ventilation, chauffage, régulation etc) d'un même bâtiment ont été utilisées. L'une des salles a été brassée vers le haut (à l'aide d'un ventilateur pour déstratifier l'ambiance) et l'autre non. La même conduite a



été appliquée dans les deux salles, avec un débit de renouvellement d'air minimum de 0,8 m<sup>3</sup> par kg de poids vif et par heure.

Un analyseur de gaz photo acoustique (Innova 1412 ND), validé par l'INRA pour le suivi en continu du taux de CO<sub>2</sub>, a été utilisé comme référence. Il a été relié à deux voies extérieures, 3 voies dans la salle brassée (15 cm et 80 cm du sol et à l'extraction) et 7 voies dans la salle non brassée (80 cm entrée, 80 cm centre, 80 cm fond de la salle, 10 cm, 20 cm, extraction, 1m60 couloir). Ce dispositif permettait ainsi de suivre l'évolution de la variabilité spatiale et temporelle des concentrations de CO<sub>2</sub> au cours du lot. Pour les comparaisons de capteurs, ceux-ci ont été regroupés en un point de la salle brassée dans un grillage en effectuant une mesure toutes les 10 mn. Cet essai a été également l'occasion de vérifier l'effet de différents facteurs sur la concentration du CO<sub>2</sub> dans un bâtiment de poulets, comme l'augmentation ou la diminution du débit de ventilation minimum.

### **2.3.1.2. Résultats**

Dans les conditions de notre étude (chauffage direct et ventilation séquentielle), les premiers résultats montrent que :

- En début de lot, les mêmes variations spatio-temporelles des concentrations en CO<sub>2</sub> sont mesurées aux différentes hauteurs et à l'extraction. Par ailleurs, les concentrations mesurées à 80 cm sont similaires à celles mesurées à 10 cm correspondant à ce que respire l'animal. On peut donc dire qu'en début de lot, la variabilité de la concentration en CO<sub>2</sub> est essentiellement due au couple chauffage-ventilation
- En fin de lot, il y a une différence de concentration entre la mesure à 80 cm et celle 10-20 cm en raison de l'émission de CO<sub>2</sub> par la litière. Cependant, les concentrations mesurées à 80 cm sont voisines des valeurs de l'extraction. On peut dire qu'en fin de lot, la variabilité de la concentration en CO<sub>2</sub> est essentiellement due au couple animaux-litière

Ainsi, la position optimale retenue est celle à 80 cm du sol au centre du bâtiment entre les

lignes de mangeoires et de pipettes, représentative de la concentration à l'extraction du bâtiment donc de l'ambiance globale du bâtiment.

En fonction de l'utilisation du capteur (suivi automatique dans le cadre d'une régulation de l'ambiance ou mesure manuelle), il sera important de tenir compte de son inertie à répondre. Par rapport à un capteur présentant une inertie élevée, un capteur présentant une inertie faible permet par exemple une forte réactivité, l'anticipation des variations du taux de CO<sub>2</sub> et serait donc plus adapté à des mesures manuelles.

En plus de ce critère portant sur l'inertie du capteur, nous avons également vérifié, pour des valeurs de CO<sub>2</sub> faibles, moyennes ou élevées, la fiabilité de la valeur de CO<sub>2</sub> relevée. Celle-ci a été évaluée par rapport à la valeur trouvée par l'analyseur de gaz utilisé comme référence. On constate, selon les capteurs, des différences plus ou moins importantes. Au final, dans l'objectif de choisir des capteurs à intégrer dans le boîtier de ventilation des bâtiments de volailles, il a été décidé de retenir deux capteurs présentant une faible inertie et peu d'écart par rapport à la référence.

Les autres phases du projet se poursuivent pour valider ces résultats en élevages commerciaux et dans d'autres configurations (types de bâtiments et de ventilation notamment). Par ailleurs, la suite de ce projet pour l'Anses sera de se focaliser, à partir de capteurs fiables, sur l'effet du taux de CO<sub>2</sub> sur la santé et le bien-être des volailles ainsi que sur les moyens de maîtrise de ce taux dans des limites inférieures à ce qu'autorise la réglementation.

### **3- Dissémination des résultats**

L'étude sur les poules reproductrices a fait l'objet d'une thèse de doctorat en médecine vétérinaire. D'autres communications sont en cours de préparation. Celle sur les capteurs de CO<sub>2</sub>, toujours en cours, a fait l'objet d'une présentation à la journée volailles de chair de l'Itavi en novembre 2017.



## UNITE EPIDEMIOLOGIE ET BIEN-ETRE DU PORC

Activités de Pharmaco-Epidémiologie

Chef d'unité : Nicolas ROSE

Responsable des travaux de pharmaco-épidémiologie : Claire CHAUVIN

### 1. Les activités de recherche

Les activités de recherche en pharmaco-épidémiologie sont orientées, pour ce qui concerne les filières avicoles et cunicoles, vers l'acquisition de connaissances relatives aux usages des antibiotiques en élevage et les déterminants de leur évolution et à la relation entre usage antibiotique et résistance bactérienne. Les travaux sont menés en étroite collaboration avec les autres unités de l'Anses des sites de Ploufragan et Fougères ainsi qu'avec l'ITAVI. Les fonds qui financent cette recherche sont publics (nationaux ou européens).

#### 1.1. Etude des usages antibiotiques en filière cunicole

Depuis plusieurs années des travaux sont conduits avec l'unité EBEAC en partenariat avec la filière cunicole fortement mobilisée autour de la réduction de l'usage des antibiotiques.

La caractérisation des trajectoires de réduction des usages des élevages transmettant leurs IFTA et données de GTE a été mise à jour. Les classes se distinguent par le niveau d'usage et sa dynamique sans qu'un lien aux performances ne puisse être établi, confirmant les précédents résultats.

Afin de comprendre les déterminants humains, techniques et sanitaires de la variabilité de trajectoires, une étude (enquête postale) avait été menée auprès des éleveurs (n=405), en collaboration avec l'Université de Rennes 2, sur la perception du métier d'éleveur (modèle « Demande – ressources au travail »), les caractéristiques structurelles et sanitaires de l'élevage ainsi que leur évolution, l'évolution des usages antibiotiques et les leviers individuellement mis en œuvre et/ou freins rencontrés à la démarche de réduction des usages antibiotiques. La mise en relation de ces éléments à partir des réponses reçues (n=180) a montré que l'usage des antibiotiques en 2015 était principalement déterminé par 1) la situation

sanitaire, elle-même influencée par la structure de l'élevage, 2) la perception de (/adhésion à) la démédiation et ses freins, elle-même liée aux revenus, 3) la mise en œuvre de modifications (telles que l'amélioration de l'hygiène, de la ventilation, la mise en œuvre de vaccins ou alternatives).

#### 1.2. Mise en œuvre d'un projet européen EFFORT (Julie DAVID)

L'Anses (laboratoire de Ploufragan-Plouzané et Fougères) est partenaire du projet Européen EFFORT (<http://www.effort-against-amr.eu/>) « Ecology from Farm to Fork Of microbial drug Resistance and Transmission ». Ce projet vise à mieux comprendre l'écologie complexe de l'antibiorésistance en utilisant les outils modernes de microbiologie et les approches épidémiologiques.

La première composante du projet mise en œuvre en France (étude transversale réalisée en élevages (n=20/filière) avec collecte d'échantillons de fientes et de données sur l'usage des antibiotiques et la biosécurité) apporte ses premiers enseignements. Les outils de métagénomique permettant l'analyse de l'abondance et de la diversité des gènes de résistance au sein des échantillons (n=178 pour le poulet de chair) collectés dans les neuf pays partenaires montrent un large effet du pays d'origine, partiellement lié à l'usage rapporté des antibiotiques (données ESVAC) (Munk *et al.*, 2017).

Le second volet consiste en une étude d'intervention pilotée par la France. La collecte de données en élevages de poulets de chair est en voie d'achèvement en France en collaboration avec les GTV, ainsi qu'en Espagne et Belgique. L'analyse de ces données visera à mesurer l'impact de mesures de réduction de l'usage des antibiotiques sur les usages et les performances techniques et économiques des élevages, tout en documentant les difficultés rencontrées.



### 1.3. Analyse conjointe des données de surveillance des usages antibiotiques et de la résistance bactérienne

Dans le cadre du plan EcoAntibio 2017 (projet LURA) les données issues i) du suivi des ventes de médicaments contenant des antibiotiques, ii) des plans de surveillance de la résistance à l'abattoir et iii) du RESAPATH, collectées de 1999 à 2014, ont été conjointement analysées. Les résultats mettent en lumière la difficulté d'interprétation des données en aviculture, compte tenu de la nature des données (distinction des ventes annuelles délicates entre les différentes espèces avicoles) et de la possible diffusion de résistances au sein de la filière.

## 2. Activités d'expertise, d'appui scientifique et technique

### 2.1. Appui scientifique et technique à la surveillance de l'usage des antibiotiques

Depuis quelques années, l'Anses apporte son concours technique à la mise en œuvre d'un dispositif professionnel de collecte d'informations sur les utilisations antibiotiques au sein de la filière et mis en œuvre par l'ITAVI (le projet RefA<sup>2</sup>vi).

L'Anses participe aussi activement au projet européen ESVAC de collecte de données des Etats Membres mis en place par l'Agence Européenne du médicament (EMA). Elle a assuré l'animation du groupe de travail relatif à la collecte de données d'usage en élevage (EMA, 2017).

L'Anses est en outre membre d'AACTING, consortium relatif aux dispositifs de collecte de données en élevages, mis en œuvre grâce au programme européen JPI-AMR.

### 2.2. Activités d'expertise

L'unité a pris part au groupe de travail JIACRA (Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis) mandaté par la Commission Européenne, pour son second rapport portant sur les données 2013-2015 collectées par les 3 Agences européennes (EFSA, EMA, ECDC). Elle a apporté son concours à l'analyse des données et la réalisation de modèles multivariés (PLS-PM) afin d'estimer les rôles respectifs des résistances chez l'animal, des usages antibiotiques chez l'homme et chez l'animal, dans les taux de résistance chez l'homme observés dans les Etats Membres, pour les bactéries *Escherichia coli*, *Salmonella* et *Campylobacter* et quelques résistances (céphalosporines, fluoroquinolones, tetracyclines, macrolides).

### 2.3. Activités de formation et de soutien à la recherche

Divers cours sur la pharmaco-épidémiologie et l'usage des antibiotiques ont été dispensés, des travaux d'étudiants ingénieurs (4), et de Master (4) ont été encadrés et des relectures d'articles, participations à des comités de thèse ont été effectuées.

## References

EMA, 2017. Draft guidance on provision of data on antimicrobial use by animal species from national data collection systems.

ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. 2017.

Munk P. and coll. 2017. Abundance and diversity of the fecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. <https://doi.org/10.1101/194647>.

