

SESSION

PATHOLOGIE - PREVENTION

SESSION

PATHOLOGIE - PREVENTION

Communications orales

FREINS ET MOTIVATIONS DES ÉLEVEURS DE POULETS A METTRE EN PLACE DES MESURES PRÉVENTIVES CONTRE LA COLIBACILLOSE AVIAIRE ET TYPOLOGIE DES ÉLEVEURS EN VUE D'APPORTER UN CONSEIL ADAPTÉ

**Géry-Choquet Aline¹, Rousset Nathalie¹,
Leblanc-Maridor Mily², Bonnet-Beaugrand Florence²**

¹ ITAVI, Antenne Ouest - 41 rue de Beaucemaine, 22440 Ploufragan, France

² BIOEPAR, INRA, Oniris, Université Bretagne Loire, 44307, Nantes, France

aline.gery@yahoo.fr

RÉSUMÉ

Dans un contexte de réduction d'usage des antibiotiques, il est important d'optimiser la prévention de la colibacillose en élevage de poulets de chair, maladie majeure et fréquemment traitée avec des antibiotiques. Ce travail a pour objectif de comprendre le contexte psycho-social dans lequel les éleveurs évoluent pour mieux gérer la colibacillose aviaire en leur proposant un conseil adapté selon leur motivation à changer de pratiques. Une première phase d'enquête qualitative a été conduite auprès de 14 éleveurs de poulets de chair en production conventionnelle. 75 éleveurs du Grand Ouest de la même production ont ensuite répondu à un questionnaire quantitatif construit à partir des résultats de l'enquête qualitative.

Alors qu'elle survient fréquemment en élevage (3,5 lots sur 10), les résultats du questionnaire quantitatif indiquent que 85% des éleveurs ne connaissent pas bien l'origine et la pathogénie de la maladie. Ce manque de connaissances et le sentiment d'un manque d'implication de la filière à maîtriser cette maladie apparaissent comme les freins majeurs à l'application de mesures de prévention en élevage. L'envie d'améliorer leur revenu et de réduire l'usage d'antibiotique sont les motivations majeures des éleveurs pour mettre en place des mesures préventives. L'analyse statistique révèle cinq profils d'éleveurs pouvant se distinguer par leur motivation à changer leurs pratiques selon la taille de l'atelier, la fréquence des épisodes de colibacillose, le nombre de freins et motivations à changer leurs habitudes et l'envie d'apprendre sur la maladie. Le conseil sera à adapter selon ces différents profils d'éleveurs : « éleveurs expérimentés peu motivés », « jeunes éleveurs indépendants », « éleveurs avec d'autres priorités », « éleveurs motivés avec un petit atelier » et « éleveurs preneurs de risque ».

ABSTRACT

Obstacles and incentives for broiler farmers to set up preventive measures against the avian colibacillosis

In a context of antibiotic restraint, it seems significant to optimize colibacillosis prevention in chicken farms. This major disease is indeed still commonly treated with antibiotics. The aim of this work has been to understand the psycho-social context in which farmers operate so that advice about better management of avian colibacillosis may be adapted to farmer's motivations to change practices. A first survey (qualitative study) was carried out involving 14 chicken conventional production farmers. 75 western France farmers of the same production replied then to a quantitative questionnaire built thanks to the results of the qualitative survey.

Despite a frequent occurrence of the pathology on their farms (3,5 lots out of 10), the quantitative survey revealed that 85% of farmers did not know the colibacillosis origin nor pathogenesis. These missing knowledges and the feeling of a lack of whole sector involvement to control this disease emerged as the major brakes in the application of the preventive measures on farms. The major incentives to prevent the avian colibacillosis were the desire to improve farm income and to reduce antibiotic use. Statistical analysis showed five farmers profiles built on the chicken house size, the frequency of colibacillosis episodes, the number of brakes and incentives to change their habits and the desire to learn about the disease. Advice should be adapted according to these profiles : « experimented little motivated farmers », « young and independent farmers », « farmers with others priorities », « motivated with small chicken house farmers » and « risk taker farmers ».

INTRODUCTION

La lutte contre l'antibiorésistance constitue un enjeu majeur de santé publique. La filière avicole s'est pleinement engagée dans le plan Ecoantibio2017, lancé par le Ministre de l'Agriculture et de l'Alimentation en 2012. Une réduction de 49% des usages des antibiotiques dans cette filière a ainsi été atteinte entre 2011 et 2017 (Anses, 2018a). La colibacillose aviaire est une maladie majeure en production de poulet de chair. La gestion de cette maladie est loin d'être évidente, et son impact économique est préoccupant pour la filière. C'est la principale cause de traitement antibiotique, qui constitue actuellement le moyen de lutte le plus utilisé en curatif (Anses, 2018a). Les alternatives aux antibiotiques existent (huiles essentielles, vaccins) ou sont toujours en cours de recherche comme les probiotiques, la flore de barrière, les bactériophages (Anses 2018b, Kaikabo 2017) mais demeurent sous-utilisées.

La prévention de la colibacillose repose essentiellement sur des mesures de prophylaxie sanitaire (biosécurité et hygiène générale de l'élevage) et zootechniques (alimentation, minimisation du stress des animaux...). Mais son contrôle reste difficile et dans un contexte d'incertitude sur les facteurs de déclenchement de la maladie, les éleveurs ont besoin d'être mieux accompagnés. L'objectif de ce travail est de comprendre le contexte psycho-social dans lequel les éleveurs évoluent pour gérer la colibacillose (représentations, freins, motivations) puis de proposer une typologie d'éleveurs en vue de leur apporter un conseil pertinent et ciblé. Cette étude s'inscrit dans le projet Colisée qui a pour but de proposer des pistes pour la maîtrise de la colibacillose aviaire en élevage de poulets de chair (Puterflam, 2016).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Cadre théorique

En partant de la théorie du deuil de Kübler-Ross (Marsan, 2008) et du cercle de déclenchement du changement (Sutherland, 2012), nous avons construit un cadre théorique permettant de recueillir et d'analyser les avis des éleveurs. Selon ce modèle, trois temps sont nécessaires à l'individu pour faire évoluer ses pratiques de façon durable : 1/ les pratiques initiales sont ancrées dans des habitudes et des automatismes, 2/ un événement extérieur, une pression sociale provoque le basculement, avec une perte d'équilibre pour l'individu, qui est amené à 3/ réaliser une transformation intérieure de ses façons de penser (Figure 1). De nouveaux automatismes peuvent s'installer. Quatre concepts théoriques ont été retenus pour faire des hypothèses sur la propension au changement de pratiques (Figure 1) :

1/ La théorie des traits de personnalité des Big Five part du principe que les individus ont des caractéristiques constantes tout au long de leur vie. Les sujets les plus susceptibles de changer sont ceux qui ont la plus

grande « ouverture d'esprit » (McCrae et al., 2006) – hypothèse retenue ici via le proxy diversité des sources d'information.

2/ La théorie du comportement planifié (Fishbein et Ajzen 1991) suppose que le comportement humain est induit par i/ les attitudes et croyances (ici : la perception de la maladie), ii/ les normes subjectives (ensemble des pressions sociales perçues par l'individu, en particulier pour les éleveurs (Garforth et al. (2013) – ici : les attentes sociétales poussant à la réduction d'antibiotiques et le rôle de la filière) et iii/ le contrôle comportemental perçu (perception de l'individu sur sa propre capacité – ici : la formation et l'expérience, les connaissances, la prise de décision autonome, le temps dédié, l'absence de mesure préventive efficace identifiée, le nombre d'actions nécessaires, la trésorerie disponible).

3/ La théorie face au risque et la perception de bénéfices (Bouyssou, 2006) explique que le changement s'opère lorsque l'individu perçoit plus de bénéfices qu'il ne perçoit de risques. Nos hypothèses ont porté sur l'importance relative du revenu de l'atelier, les aléas climatiques ou sanitaires (fréquence des épisodes de colibacillose), l'incertitude sur les mesures de maîtrise efficaces, les frais en cause lors d'un épisode, l'aversion au risque (estimée via le nombre de freins et un déclaratif).

4/ La théorie de l'intelligence distingue l'individu qui pense ne plus rien avoir à apprendre « fixed mindset » et celui qui pense qu'il apprendra chaque jour « growth mindset » (Dweck et al., 2016) – distinction retenue ici.

1.2. Construction des enquêtes qualitative et quantitative

Une première enquête qualitative a été conduite auprès de 14 éleveurs de poulets de chair en production conventionnelle recrutés sur la base du volontariat, parmi un échantillon d'éleveurs impliqués dans une enquête épidémiologique sur les facteurs de déclenchement de la colibacillose aviaire. Des entretiens semi-directifs ont permis de recueillir les points de vue des éleveurs sur plusieurs thèmes : l'environnement et l'exploitation ; la colibacillose (fréquence, détection et diagnostic) ; les connaissances (origine et facteurs de risque) ; les mesures réalisées (prévention et usage des antibiotiques) ; les moyens de communication des éleveurs (sources d'information) et souhaits futurs.

Une analyse du discours a été réalisée pour chaque thème, puis une analyse transversale a permis de regrouper les éleveurs en cinq profils-types sur la base des similitudes de leurs discours.

Une enquête quantitative a ensuite été conduite auprès de 75 éleveurs volontaires du Grand Ouest ayant des poulets de chair en production conventionnelle, afin de valider les profils obtenus à l'issue de l'enquête qualitative et d'en estimer la répartition dans la population générale. Ces éleveurs ont répondu à un questionnaire en ligne. Notre échantillon comprend un biais de représentativité en faveur des jeunes éleveurs,

des élevages bretons et des poulaillers de grande taille (Chambre d'Agriculture, 2017) ; nous n'avons pas corrigé ce biais pour ne pas perdre de puissance statistique dans un échantillon de faible taille.

Le questionnaire quantitatif abordait les mêmes thèmes que le guide d'entretien qualitatif sous la forme de questions fermées, à choix multiples ou de questions ouvertes laissant place à d'autres avis et commentaires. Les données sur la représentation de la maladie par les éleveurs obtenues dans l'étude qualitative ont pu être évaluées quantitativement via le questionnaire, confirmant les points de vue des éleveurs répertoriés. Une typologie a été réalisée sur la base des résultats de cette enquête quantitative en réalisant une analyse des correspondances multiples (ACM) entre 38 variables, puis une classification ascendante hiérarchique (CAH) à l'aide du logiciel R (Cornillon, 2012). Une analyse des similitudes et des différences entre les deux typologies obtenues entre l'enquête qualitative et quantitative a été réalisée. Cette combinaison des deux études a ainsi permis d'établir des profils robustes. Une hiérarchisation des profils en terme de propension au changement (motivation) a été établie en comptabilisant respectivement le nombre de caractéristiques favorables au changement (en positif) et le nombre de caractéristiques défavorables au changement (en négatif).

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1. Représentations et gestion de la colibacillose par les éleveurs

Au sein des 89 élevages de cette étude (enquêtes qualitative + quantitative), 91% des éleveurs ont été confrontés à cette maladie, avec une fréquence moyenne de 3,5 lots atteints sur les 10 derniers lots élevés (avec un écart type de 2,5 ; 80% des éleveurs ont connu 5 épisodes au plus). L'origine de la maladie semble connue de façon peu précise pour la plupart d'entre eux.

Lors de l'étude quantitative (n=75 éleveurs), parmi un ensemble de propositions, seulement 16% des éleveurs ont coché les deux origines possibles de la colibacillose (portage sain et transmission des reproducteurs aux poussins). A l'inverse, 65% pensent que les poussins se contaminent au couvoir, ce qui n'est pas le cas en réalité (Figure 2). Concernant leurs attitudes sur les usages des antibiotiques contre cette maladie, il est possible de distinguer trois types d'éleveurs : en faveur de l'usage des antibiotiques (41%), contre (48%) et ceux sans avis net (position neutre) (11%). Néanmoins, 31% des éleveurs disent administrer un antibiotique de façon strictement préventive dans l'eau de boisson, notamment pendant la période critique du démarrage. La majorité des éleveurs réalisent des mesures de prévention non spécifiques (faire manger et boire rapidement les poussins, maintenir une litière sèche, vérifier la qualité de l'eau, éviter de stresser les animaux, appliquer les mesures de biosécurité...) sans forcément les relier à la prévention de la maladie. Dans

notre étude, seulement 10% des éleveurs vaccinent leurs poulets contre la colibacillose. Ce vaccin, disponible sur le marché, est efficace mais reste trop coûteux actuellement en élevage de poulets de chair standard.

2.2. Freins et motivations à combattre la colibacillose

L'envie de répondre à l'attente sociétale et l'envie d'augmenter leurs revenus sont les motivations principales des éleveurs (Figure 3). En revanche, le sentiment d'un manque d'implication de la filière et le manque de connaissances de l'éleveur sur l'origine de la maladie, les facteurs de risque ou la vaccination sont les freins majeurs à la mise en place de la prévention.

2.3. Préférences en matière de conseil

Si 88% des éleveurs cherchent de l'information à partir de deux ou trois sources différentes, 57% d'entre eux disent prendre des décisions seuls face à un problème. La quasi totalité des éleveurs ont pour habitude d'échanger avec leurs collègues, d'écouter leur technicien et/ou leur vétérinaire, ainsi 80% attendent des conseils de leur technicien et 96% accordent de l'intérêt au bilan sanitaire d'élevage réalisé par leur vétérinaire. Cependant, 60% des éleveurs souhaitent recevoir des informations complémentaires sur la colibacillose, notamment sur son origine, les facteurs de risque de déclenchement de la maladie et les moyens de prévention. Les éleveurs ont également exprimé leurs préférences sur les outils de communication (Figure 4).

2.4. Typologie en cinq profils d'éleveurs

L'analyse statistique basée sur les modalités sous et sur-représentées dans chaque groupe révèle cinq profils d'éleveurs, présentés ici par propension au changement croissante (selon le score établi et représenté en figure 5) :

1/ Éleveurs « expérimentés peu motivés » (25%)

Ils ont un atelier avicole important (75-100% du revenu, surface > 3000 m²). La colibacillose est fréquente chez eux (> 2 lots/10). Ils se prononcent en faveur de l'utilisation des antibiotiques et identifient plus de cinq freins à mettre en place des mesures préventives. Ils ne critiquent pas le conseil mais estiment en savoir assez et prennent seuls leurs décisions. Ces éleveurs ont plus de 50 ans et plus de 10 ans d'ancienneté.

2/ Éleveurs « jeunes indépendants » (18%)

Ils ont un atelier avicole avec une surface entre 2000 et 3000 m², souvent avec des poulaillers achetés d'occasion. Sans tension ni stress, ils ne souhaitent pas en apprendre plus sur la colibacillose. Ils agissent seuls et critiquent le conseil donné. La fréquence des épisodes (< 2 lots/10) leur paraît acceptable, ces épisodes peu répétitifs ne les incitent pas à changer. Ces éleveurs ont entre 20 et 40 ans, un niveau bac minimum et ils ont acquis de l'expérience en aviculture avant de s'installer.

3/ « Éleveurs avec d'autres priorités » (15%)

Ils possèdent un atelier mixte (30-70% du revenu, un poulailler dont la dernière rénovation remonte à plus de 5 ans). Ils ne prennent pas de risque mais n'utilisent pas d'antibiotiques en prévention car la fréquence des colibacillooses dans leur élevage est faible (< 2 lots sur 10). Le manque de temps et l'incertitude sur une hausse de revenu éventuelle les incite à ne pas mettre en place de mesures préventives.

4/ Éleveurs « motivés avec un petit atelier » (11%)

Ils élèvent du poulet standard dans un poulailler unique (taille < 2000 m²) rénové récemment (< 5 ans). 5 des 8 éleveurs de ce groupe vaccinent leurs poulets contre la colibacilliose. Plus de cinq freins ressortent comme le manque de trésorerie et le fait que la maladie soit déjà maîtrisée chez eux. Ils sont motivés par plus de deux propositions à prévenir la maladie comme le désir d'avoir des animaux sains. Ils discutent toujours avec leurs pairs mais ne s'investissent pas dans les réunions collectives organisées. Ils s'informent sur internet.

5/ Éleveurs « preneurs de risque » (31%)

Ils élèvent du poulet lourd dans des poulaillers rénovés il y a moins de 5 ans. Ils disent prendre des risques, réalisent des essais à la ferme et ressentent de la tension voire du stress. Ils ont envie d'en apprendre plus sur la colibacilliose. La fréquence des épisodes (> 2 lots/10) ne leur paraît pas acceptable. Leurs freins à la prévention sont le manque de connaissances, l'hésitation sur les mesures prioritaires et le sentiment d'un manque d'implication de la filière. Ils sont motivés par plus de quatre propositions (notamment la hausse du revenu ou l'importance de la colibacilliose chez eux). Ils ne prennent pas de décision seuls et sont prêts à recevoir du conseil par plus de quatre moyens (notamment les réunions de groupe, des fiches techniques, des formations).

2.5. Discussion

Le modèle théorique mis en place dans cette étude devra être confronté avec d'autres études terrain. Par ailleurs, d'autres théories sur le changement pourraient être intégrées dans l'analyse comme la théorie du *nudge* (Leonard, 2008) qui suggère que le comportement et la prise de décision des personnes sont davantage influencés par des propositions indirectes sans pression plutôt que par des instructions directes.

Dans notre étude : les éleveurs « expérimentés peu motivés » et les « éleveurs avec d'autres priorités » sont sous représentés et il se peut qu'il existe des variations de répartition de la proportion de ces profils sur le terrain voire une apparition d'autres profils. Néanmoins les cinq profils obtenus soulignent la diversité des attitudes face à la gestion de la maladie. La première motivation à mieux gérer cette maladie est économique puis sociétale afin de répondre à la demande de réduction des antibiotiques. Ce résultat souligne la prise de conscience sur ce point par les éleveurs. Les freins ralentissant le processus sont issus du contexte d'incertitude en matière de connaissances

sur la colibacilliose, notamment en ce qui concerne l'origine de la maladie, les facteurs de risque, la vaccination et les mesures préventives les plus efficaces. Une majorité des éleveurs trouvent que la filière ne prend pas assez en main le problème. Une meilleure communication sur les travaux mis en place pour trouver des solutions et une plus grande transparence sur les recherches réalisées par les acteurs de la filière semblent nécessaires. Tous les éleveurs de poulets de chair sont en attente de conseil sur la maladie, quel que soit leur motivation. Une sensibilisation à un usage raisonné des antibiotiques en expliquant l'apparition de l'antibiorésistance et de ses conséquences serait nécessaire pour les profils « expérimentés peu motivés » et « jeunes indépendants » (profils d'éleveurs qui semblent satisfaits de maîtriser la colibacilliose avec des antibiotiques). Le profil « éleveurs avec autres priorités » est à motiver en les informant et en expliquant l'importance de cette maladie au sein de leur élevage. Les « éleveurs motivés avec un petit atelier » sont à aider en ciblant leur frein principal, souvent sur la trésorerie, et en leur décrivant précisément le temps à passer ou les frais à réaliser en priorité. Enfin le dernier profil « éleveurs preneurs de risque » est déjà dans l'action, ils ont uniquement besoin de clés pour réaliser chez eux des tests pour prévenir la maladie. Le projet Colisée a également pour objectif de travailler sur le développement de mesures préventives autour de la vaccination qui pourraient notamment être mises en avant chez ces « éleveurs preneurs de risque ».

CONCLUSION

La colibacilliose est une maladie qui concerne pratiquement tous les éleveurs ayant répondu à l'enquête. Etant donné que la gestion sanitaire de la colibacilliose ne dépend pas uniquement des décisions de l'éleveur, il serait intéressant de questionner les acteurs de la santé animale impliqués (vétérinaires, techniciens, dirigeants...) pour avoir une vue d'ensemble du contexte et permettre une action collective pour lutter contre la colibacilliose.

REMERCIEMENTS

Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet « Colisée », projet multipartenarial Casdar financé par le ministère de l'agriculture et le CIPC, qui étudie les modalités de maîtrise de la Colibacilliose aviaire (Puterflam, 2016). Ce projet est réalisé dans le cadre du programme de travail de l'UMT SANIVOL. Les auteurs remercient l'ensemble des éleveurs ayant participé à l'étude, les techniciens de l'ITAVI, de l'Anses et de BIOEPAR (Loïc Balaine, Pascal Galliot, Anne Lehebel, Nadine Brisseau) ainsi que les vétérinaires (Jacques Roberton, Jérôme Durand) et responsables d'organisations de production pour leur implication et leur aide.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ajzen I. and Fishbein, 1991., Organizational behavior and human decision processes, (50), 179–211.
- Anses, 2018a, *Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2017*, Rapport annuel, Edition scientifique, Novembre 2018, 100 p.
- Anses, 2018b, *Etat des lieux des alternatives aux antibiotiques en vue de diminuer leur usage en élevage, élaboration d'une méthode d'évaluation des publications scientifiques et résultats*, Avis de l'ANSES Rapport d'expertise collective, Edition scientifique, Février 2018, 186 p.
- Bouyssou D., 2006. Diaporama du CNRS Paris. <http://www.lamsade.dauphine.fr/~bouyssou/Risque.pdf>
- Chambre d'Agriculture, 2017. *Résultats de l'enquête avicole : enquête réalisée auprès des aviculteurs du Grand Ouest*, Agriculture & Territoires : Chambres d'Agriculture.
- Dweck C., 2016. Harvard Bus. Rev., (Jan. 13, 2016), 4.
- Garforth C. J., Bailey A. P. and Tranter R. B., 2013. Preventive Veterinary Medicine, 110(3–4), 456–466.
- Géry A., 2018. Thèse d'exercice vétérinaire, Ecole nationale vétérinaire-Oniris, Nantes, 193 pages.
- Kaikabo A. A., AbdulKarim S. M. and Abas F., 2017. Poultry Science Association.
- Leonard, T.C. Const Polit Econ (2008) 19: 356. <https://doi.org/10.1007/s10602-008-9056-2>
- Marsan C., 2008. *Réussir le changement : Comment sortir des blocages individuels et collectifs ?* De Boeck U. Edited by Manager RH.
- McCrae R. and Costa P., 2006. Psychologie française, (51), 227–244
- Méheust S., Chevance A. and Moulin G., 2017. Anses, p.102.
- Puterflam J. and Richard A., 2016. *Maîtrise de la colibacillose aviaire en élevage de poulet de chair (Colisée) Projet déposé en réponse à appel à projet Casdar*.
- Resapath, 2017. *Bilan 2016 du Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales*, Anses.
- Sutherland L. A., 2012 Journal of Environmental Management. Elsevier Ltd, (104), 142–151.

Figure 1. Processus dynamique de changement de pratiques avec les caractéristiques inhibant ou favorisant le changement (Gery, 2018)

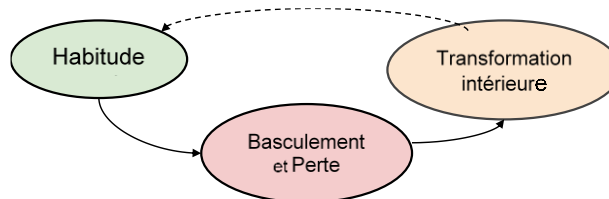


Figure 2. Liste des propositions choisies sur l'origine de la Colibacillose (données de l'enquête, nombre de répondants = 75)

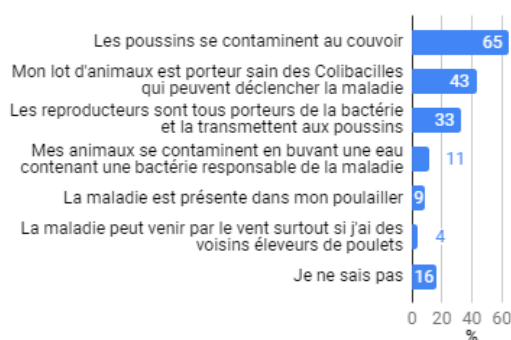


Figure 4 : Préférences sur les moyens proposés pour diffuser l'information (données de l'enquête, nombre de répondants = 75)

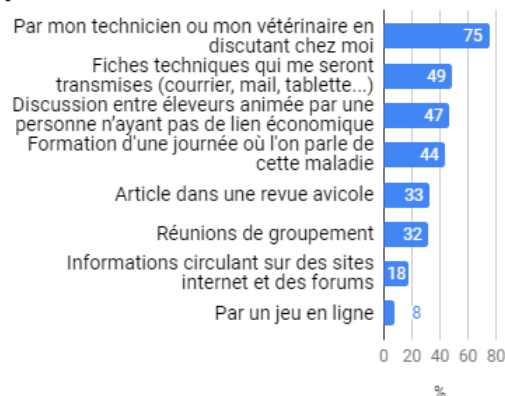


Figure 3 : Liste des motivations et freins des éleveurs (n=75) à la gestion préventive de la Colibacillose

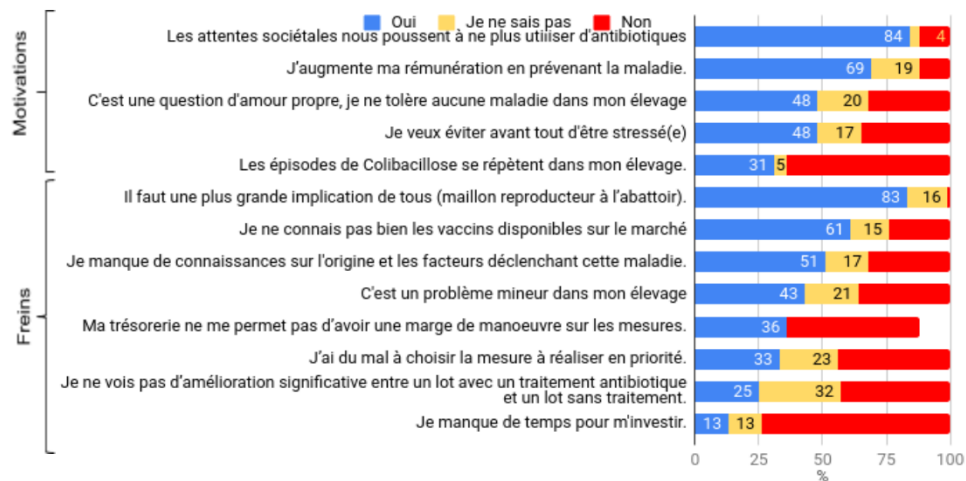
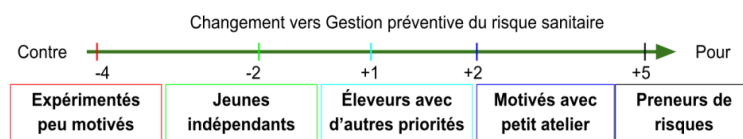


Figure 5 : Score de motivation à changer la gestion de la Colibacillose selon les profils



ENTEROCOCCUS CECORUM CHEZ LE POULET DE CHAIR : ENQUETE EN ELEVAGE POUR IDENTIFIER DES PRATIQUES ZOOTECHNIQUES A RISQUE

Remiot Paul¹, Panaget Glenn¹, Dr. Chataigner Eric², Chevalier Denis¹

¹MG2MIX, Zone d'activité de la Basse Haye, 35220 Chateaubourg, France

²Chêne Vert Conseil, Zone Industrielle de Bellevue, 35220 Chateaubourg, France
p.remiot@mg2mix.fr

RESUME

Enterococcus cecorum est une bactérie responsable de troubles locomoteurs chez le poulet de chair à croissance rapide et qui peut provoquer des contre-performances zootechniques (mortalité, hétérogénéité et saisie à l'abattoir). Une enquête a été menée auprès de 50 élevages de poulets de chair en Bretagne et dans les départements limitrophes afin d'identifier les pratiques d'élevage qui représentent des facteurs de risque d'apparition de ces troubles locomoteurs. Ces 50 élevages ont été répartis en 2 groupes selon leur niveau de risque vis-à-vis d'*E. cecorum* : 26 ont présenté au moins un épisode clinique d'*E. cecorum* au cours de l'année 2017 (CecoRisk+) et 24 n'ont pas été exposés à cette problématique durant cette même période (CecoRisk-). Pour chaque bâtiment d'élevage enquêté, 3 visites ont été réalisées afin d'évaluer la qualité de décontamination (boîtes contact flore totale), les conditions de démarrage, et la gestion zootechnique du lot, respectivement avant paillage du bâtiment, 1 jour après la mise en place des animaux, et après 28 jours d'âge. Les données ont été analysées par le test du Chi² puis par une analyse des correspondances multiples pour les données qualitatives, et par le test de Wilcoxon pour les données quantitatives (au seuil de risque $\alpha < 10\%$). L'analyse des boîtes contact révèle que le soubassement des bâtiments et les équipements d'abreuvement et d'alimentation ont obtenu de meilleures notes de propreté chez les éleveurs CecoRisk- que chez les éleveurs CecoRisk+ ($p < 0,1$). Par ailleurs, un renouvellement d'air insuffisant au démarrage est un facteur associé aux éleveurs CecoRisk+ : les teneurs en CO₂ mesurées lors de la deuxième visite chez ces éleveurs sont en effet supérieures à celles enregistrées chez les éleveurs CecoRisk- (3585ppm vs 2730ppm, $p < 0,1$). La gestion du programme lumineux est également un facteur important dans la description du groupe d'éleveurs CecoRisk+ : le fait de réaliser quotidiennement moins de 6h de coupures lumineuses à 10 jours d'âge constitue une pratique aggravante ($p < 0,1$).

ABSTRACT

***Enterococcus cecorum* in broilers: a survey in farm to identify risky zootechnical practices**

Enterococcus cecorum is a bacterium responsible for locomotors disorders on the rapid growth broiler and can cause zootechnical under-performances (mortality, heterogeneity and non-conformities at slaughterhouse). An investigation was carried out of 50 broiler farms in Brittany and neighbouring departments to identify the farming practices representing the risk appearance factors of these locomotors disorders. These 50 farms were divided into 2 groups according to their *E. cecorum* risk level: 26 showed at least one *E. cecorum* clinical event over the year 2017 (CecoRisk+) and 24 were not exposed to this issue during this same period (CecoRisk-). For each investigated poultry house, 3 visits were conducted to evaluate the decontamination quality (Plate Count Agar – PCA), the starting conditions, and the zootechnical management of the lot, respectively before the mulching of the barn, one day after the animals introduction, and after 28 days old. Data were analysed with a Chi² test followed by a multiple correspondence analysis for the qualitative data, and by the Wilcoxon test for the quantitative data (risk threshold $\alpha < 10\%$). The analysis of PCA reveal that the substructure of the barn and the drinking and feeding materials received better cleanliness scores for CecoRisk- farmers than for CecoRisk+ farmers ($p < 0,1$). Furthermore, an inadequate air turnover at starting is a factor linked to CecoRisk+ farmers : the CO₂ levels measured during the second visit for these farmers are higher than the ones registered for CecoRisk- farmers (3585ppm vs 2730ppm, $p < 0,1$). The lighting program management is also an important factor in the description of the CecoRisk+ farmers group : to carry out less than 6h of daily light breaks at 10 days old is an aggravating factors ($p < 0,1$).

INTRODUCTION

Enterococcus cecorum est une bactérie commensale de la flore intestinale (Devriese *et al.*, 1991), et peut être à l'origine d'infections du système locomoteur chez les poulets de chair et les reproducteurs de poulets de chair (Borst *et al.*, 2017).

Sur ces animaux, *E. cecorum* peut être isolée à partir de différents types de lésions et sites d'inflammation : septicémie, péricardite, nécrose de la tête fémorale, arthrite, ténosynovite ou ostéomyélite des vertèbres thoraciques (Guérin *et al.*, 2011 ; Balloy, 2015).

En élevage, les infections provoquées par *E. cecorum* provoquent des cas de septicémie (pendant la période de démarrage) ou de déshydratation liée à l'immobilité (après 2 semaines d'âge) chez les animaux atteints. Il en résulte une augmentation de l'hétérogénéité et de la mortalité des lots touchés, voire également de la saisie à l'abattoir (Jung *et al.*, 2018).

Le signe clinique caractéristique associé à une infection par *E. cecorum* est une paralysie des membres inférieurs provoquée par une spondylite au niveau des vertèbres thoraciques. Cette arthrite vertébrale d'origine infectieuse engendre en effet la formation d'une masse inflammatoire pouvant comprimer la moelle épinière, et certains auteurs parlent dès lors de spondylite « enterococcique » (Guérin *et al.*, 2011 ; Balloy, 2015 ; Jung *et al.*, 2018). Lorsque l'élevage est atteint, le recours à l'antibiothérapie est parfois indispensable pour enrayer l'évolution de la morbidité et de la mortalité en cas d'évolution aiguë (Balloy, 2015).

Le mode de contamination et de dissémination de la bactérie dans l'environnement reste aujourd'hui encore peu clair malgré l'augmentation du nombre d'études de cas publiées ces dernières années.

L'enquête menée s'est focalisée sur les pratiques d'élevage usuelles (protocole de décontamination, gestion de l'ambiance au démarrage, programme lumineux) qui peuvent favoriser ou minimiser l'émergence d'infections par *E. cecorum* en élevage de poulets de chair. L'objectif de cette étude est donc d'identifier des pratiques d'élevage qui constituent des facteurs de risque d'apparition de ces troubles locomoteurs.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Echantillonnage

Les représentants de cinq organisations de productions avicoles (OPA) du Grand Ouest de la France ont été sollicités pour constituer une liste d'éleveurs divisée en deux groupes d'effectifs équilibrés en fonction de leur niveau de risque vis-à-vis d'*E. cecorum*. Entre Février et Juin 2018, 50 élevages ont ainsi été enquêtés en Bretagne et dans les départements limitrophes.

Les éleveurs qui ont présenté au moins un épisode clinique d'*E. cecorum* au cours de l'année 2017 et qui étaient susceptibles d'avoir des pratiques d'élevage à risque ont été associés à la catégorie CecoRisk+ (n=26). Les éleveurs qui n'ont pas été exposés à cette problématique au cours de cette même période, et qui sont susceptibles d'avoir des pratiques d'élevage minimisant le risque d'infection, ont été regroupés dans la catégorie CecoRisk- (n=24).

1.2. Visites en élevages et questionnaires

Pour chaque bâtiment d'élevage enquêté, 3 visites ont été réalisées. La première visite (V1) s'est déroulée avant le paillage du bâtiment. Des prélèvements de surfaces par des boîtes contact flore totale ont été effectués en 10 points du bâtiment : 4 au niveau du soubassement, 4 au niveau des murs, 1 sur une mangeoire et 1 sur l'équipement d'abreuvement. Après l'analyse bactériologique en laboratoire, une note allant de 0 (aucune colonie, très bien) à 4 (>100 colonies, très mauvais) a été attribuée à chaque boîte en fonction du nombre de colonies bactériennes s'y développant. Ces notes ont ensuite été comparées pour évaluer la propreté des différentes zones du bâtiment après décontamination (nettoyage et désinfection).

La deuxième visite (V2) a été réalisée après la mise en place du lot à J1. Des mesures ont été effectuées sur les paramètres d'ambiance dans le bâtiment au démarrage notamment la température (T°C), l'hygrométrie (H%), et la teneur en CO₂.

La troisième visite de fin de lot (V3) s'est déroulée après J28 et a permis de récupérer les données de gestion zootechnique du lot : programmes lumineux, de gestion de la ventilation (besoin d'air), de gestion de la température, et collecte des poids moyens du lot en cours.

1.3. Analyses statistiques

Une analyse descriptive des données a été menée par l'étude de la distribution des variables, en utilisant les logiciels R et Excel. Une analyse bivariable au seuil de risque $\alpha < 10\%$ a été réalisée pour étudier les relations entre les variables. Des tests de comparaison de moyennes ont été menés sur les variables quantitatives dont la normalité des distributions a été préalablement vérifiée par le test de Shapiro-Wilk. Le test de Wilcoxon (2 échantillons) et le test de Kruskal-Wallis (>2 échantillons) ont été utilisés pour comparer les moyennes des variables ne suivant pas une loi Normale.

Les variables qualitatives ont été comparées via des tris croisés (tableaux de contingence), puis des tests d'indépendance du Chi-2 ou des tests exacts de Fisher dans le cas d'effectifs inférieurs à 5. Les relations entre toutes les variables d'intérêt ont été étudiées par une analyse des correspondances multiples (ACM) pour identifier un profil d'éleveurs avec des pratiques à risque vis-à-vis de la problématique.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Pratiques de décontamination

Afin de réduire la pression bactérienne entre 2 lots, la réalisation et le suivi d'un protocole de nettoyage-désinfection de l'unité de production est indispensable. Les boîtes contact permettent d'évaluer la qualité de décontamination du bâtiment avant que le substrat de litière ne soit mis en place (Tableau 1). Lors de la V1, il a été constaté que les bâtiments des éleveurs CecoRisk+ obtenaient une note moyenne de propreté moins bonne que ceux des bâtiments des éleveurs CecoRisk- (2,6 vs 2,0 ; $p < 0,1$ – test de Wilcoxon). De plus, les notes moyennes des boîtes contact réalisées au niveau du soubassement (2,8 vs 2,2 $p < 0,1$ – test de Wilcoxon) et de celles réalisées au niveau du matériel (2,7 vs 1,9 $p < 0,1$ – test de Wilcoxon) sont significativement moins bonnes chez les éleveurs CecoRisk+ que celles des éleveurs CecoRisk-. La décontamination de ces surfaces est essentielle parce qu'elles sont à proximité directe des animaux, mais n'en reste pas moins difficile. Le soubassement est en effet l'élément de la coque qui est à la fois au contact de la litière et des animaux, et où la matière organique s'incruste et devient difficile à retirer. Le matériel d'abreuvement et les mangeoires forment quant à eux des rebords et des angles difficiles d'accès où l'eau peut éventuellement stagner.

Ces résultats montrent qu'il est d'intérêt pour les éleveurs de suivre un programme de décontamination rigoureux et efficace. Après le nettoyage du bâtiment, 46/50 éleveurs de l'enquête ont réalisé une désinfection de la coque avant l'installation de la litière (Désinfection 1). Pour appliquer le désinfectant 1 dans le bâtiment, les éleveurs de l'enquête ont utilisé : un canon à mousse ($n=13/46$), un pulvérisateur agricole avec une lance ($n=14/46$), un atomiseur ($n=8/46$), ou du matériel considéré comme peu adapté (pulvérisateur agricole à rampes, pulvérisateur à dos et système de refroidissement par brume du bâtiment ; $n=11/46$). Ces outils sont considérés comme peu adaptés car ils ne permettent pas d'épandre la dose adéquate de produit désinfectant sur toutes les surfaces du bâtiment. Les résultats de l'enquête indiquent que parmi les éleveurs CecoRisk+, 10/26 utilisent du matériel peu adapté à la désinfection ($p < 0,1$ – test de Wilcoxon).

Une désinfection a été réalisée après paillage du bâtiment par 28/50 éleveurs (Désinfection 2). Parmi les 8 éleveurs qui utilisent le système de brumisation du bâtiment pour réaliser la désinfection 2, 7/8 sont de la catégorie CecoRisk+ (Tableau 2). Le système de brumisation est utilisé pour lutter contre les coups de chaleur dans les bâtiments d'élevage, alors qu'y mettre un désinfectant peut au contraire détériorer ce matériel en obstruant les buses de pulvérisation notamment.

Avant la mise en place des poussins, les éleveurs disposent du matériel de démarrage, tels des

mangeoires supplémentaires (type becquées), des alvéoles ou des plateaux, et déroulent du papier de démarrage pour y mettre de l'aliment dessus. Le but est que les animaux soient au contact de l'aliment dès leur arrivée dans le bâtiment. Les résultats de l'enquête ne mettent pas en évidence un effet du pourcentage de couverture du bâtiment par du papier de démarrage sur le risque *cecorum* ($p=0,88$ – test de Fisher). Toutefois, parmi les éleveurs qui installent des mangeoires et/ou des alvéoles supplémentaires à la mise en place ($n=20/50$, Tableau 2), 14 appartiennent à la catégorie CecoRisk+, alors que parmi les 30/50 éleveurs qui n'en n'installent pas, 18 sont de la catégorie CecoRisk- ($p < 0,1$ – test du χ^2). Bien que très fortement conseillé aux éleveurs pour optimiser l'apport d'aliment au démarrage, l'ajout de matériel d'alimentation avant la mise en place peut représenter un risque de contamination s'il n'est pas bien décontaminé ou s'il n'est pas stocké dans de bonnes conditions de propreté.

2.2. Pratiques zootechniques au démarrage

La V2 de l'enquête avait lieu après la mise en place du lot, à J1. Le taux de CO_2 de l'air était l'une des mesures d'ambiance réalisées au cours de cette visite, en quatre zones du bâtiment. Chez les éleveurs CecoRisk+, la valeur moyenne de CO_2 mesurée était significativement supérieure à celle mesurée chez les éleveurs CecoRisk- (3585ppm vs 2730ppm ; $p < 0,05$ – test de Wilcoxon). Ainsi, pour 19/26 éleveurs CecoRisk+, le taux de CO_2 mesuré dépassait les 3000ppm, alors que pour 17/24 éleveurs CecoRisk- ce taux mesuré était inférieur à 3000ppm (Tableau 2). L'évacuation de l'air vicié et la réduction du taux de CO_2 dans le bâtiment se fait par la ventilation. Dans les bâtiments de type dynamique, des consignes de besoin d'air sont réglées par l'éleveur pour gérer le renouvellement de l'air. Les résultats de l'enquête montrent que les éleveurs CecoRisk+ règlent des consignes de besoin d'air à J7 moins élevées que les éleveurs CecoRisk- (1,08 vs 1,32 ; $p < 0,1$ – test de Wilcoxon). Ainsi, 16/26 éleveurs CecoRisk+ appliquent des consignes de besoin d'air inférieures à 1,1 $\text{m}^3/\text{h}/\text{kg}$ d'animaux, alors que 16/24 éleveurs CecoRisk- appliquent des consignes supérieures à cette valeur ($p < 0,01$ – Test du χ^2). Avoir des consignes de besoin d'air élevées au démarrage caractérise un renouvellement d'air plus important.

Le taux de CO_2 mesuré est aussi le reflet de la qualité d'air dans le bâtiment et de sa composition en monoxyde de carbone ou en particules fines. La réglementation européenne impose ainsi une concentration en CO_2 dans l'air inférieure ou égale à 3000ppm en mesure instantanée en élevage. L'exposition des poulets de chair à de fortes concentrations en CO_2 provoque chez eux une réduction de l'activité et donc de la consommation d'eau et d'aliment, ce qui les rend plus vulnérables aux infections bactériennes. (Gerritzen *et al.*, 2007).

Les résultats de l'enquête mettent aussi en évidence l'importance de la gestion du programme lumineux pendant la phase de démarrage. Ainsi, à J10, parmi les 15/50 éleveurs qui n'atteignaient pas 6h de nuit quotidienne, 11/15 sont de la catégorie CecoRisk+. De plus, les 7/50 éleveurs de l'enquête qui n'atteignaient jamais 6h d'obscurité quotidiennement au cours du lot appartiennent tous à la catégorie à risque. Le raccourcissement de la photopériode quotidienne serait en effet associé à une amélioration du développement précoce liée au rôle de la mélatonine (Olanrewaju *et al.*, 2006, Özkan *et al.*, 2012). En effet, la mélatonine, hormone du sommeil synthétisée durant les heures de nuit, est impliquée dans plusieurs fonctions métaboliques dont la prise alimentaire et la consommation d'eau, la digestion et le système immunitaire. Ainsi, les oiseaux élevés avec des périodes de nuit (inférieures à 8h par jour) présentent moins de problèmes de santé, une meilleure viabilité, et moins de problèmes de locomotion par rapport aux animaux élevés sous lumière continue (Olanrewaju *et al.*, 2006). Durant la période de démarrage, les éleveurs peuvent réaliser des vidanges des lignes d'eau pour faire une purge du circuit d'eau d'abreuvement. Dans le cadre de l'enquête, les éleveurs faisant au moins une vidange quotidienne des lignes d'eau pendant la phase de démarrage (jusque J10) ont été considérés comme faisant des purges régulières, alors que les autres (moins d'une vidange quotidienne), sont considérés comme faisant des purges irrégulières. Les résultats de l'enquête en lien avec cette pratique montrent que parmi les 19/50 éleveurs qui ne réalisent pas de purges régulières au démarrage, 13/19 sont des éleveurs CecoRisk+, alors que 18/24 éleveurs CecoRisk-, font des purges régulières au démarrage (n=35). La vidange du circuit d'eau peut avoir deux bénéfices : elle permet un rinçage des canalisations et donc une évacuation de l'eau qui a tendance à stagner, et aussi d'apporter de l'eau fraîche donc appétente aux oiseaux.

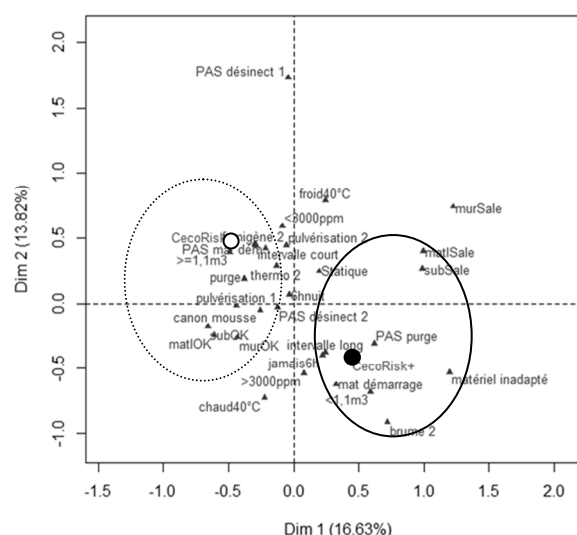
2.3. Typologie des pratiques à risque

La Figure 1 représente les résultats de l'ACM réalisée sur les variables de l'enquête. Cette cartographie de modalités permet de mettre en évidence une typologie des principales pratiques à risque envers les infections par *Enterococcus cecorum* des élevages de poulets de chair (cercle continu noir). D'une part, un soubassement sale (« subSale »), du matériel d'abreuvement et d'alimentation sale (« matlSale »), du matériel inadapté à la désinfection (« matériel inadapté »), l'utilisation de la brume pour la désinfection 2 (« brume 2 »), l'absence de purges régulières (« PAS purge »), une période de nuit quotidienne inférieure à 6h durant tout le lot (« jamais6h »), ou des consignes de besoin d'air inférieures à 1,1 m³ /h/kg (« <1,1m3 ») sont les modalités associées aux éleveurs CecoRisk+ (Point noir) et citées précédemment. Les résultats de cette

ACM montrent aussi que les éleveurs CecoRisk+ ont tendance à avoir une longue durée d'intervalle entre le lot suivi et le lot précédent (« intervalle long »), c'est-à-dire supérieure à 14 jours, en comparaison des éleveurs CecoRisk- qui ont tendance à avoir une durée d'intervalle plus courte (« intervalle court »). On peut ainsi imaginer des vides sanitaires courts sont plutôt attribués par les OPA à des éleveurs rigoureux dans leur décontamination.

D'autre part, un bâtiment propre (« matlOK », « subOK », « murOK »), du matériel de désinfection adapté (pulvérisateur avec lance « pulvérisation 1 », canon à mousse « canon mousse », fumigène « fumigène 2 », thermo-nébulisation « thermo 2 »), la réalisation de purges au démarrage (« purge ») ou un renouvellement d'air plus élevé (« >=1,1m3 ») sont des pratiques (cercle pointillé) associées aux éleveurs CecoRisk- (point noir et blanc) mais aussi des leviers d'action pour réduire le risque d'infection par *E. cecorum*.

Figure 1. Résultat de l'Analyse des Composantes Multiples (ACM) des variables de l'enquête



CONCLUSION

Enterococcus cecorum est une bactérie opportuniste qui se développe et provoque des infections du système locomoteur chez les volailles plus vulnérables. L'étude a permis d'identifier des facteurs de risque qui peuvent être à l'origine de l'affaiblissement de l'état de santé général des volailles, prédisposant ainsi les animaux à contracter cette affection « opportuniste » (Kense & Landman, 2011). Cette étude démontre que la qualité d'environnement de vie des animaux est un des éléments majeurs dans la gestion d'*Enterococcus cecorum* et ces résultats viennent confirmer l'importance du rôle de l'éleveur et de ses pratiques d'élevage pour fournir aux oiseaux un environnement favorable à leur croissance et à leur bien-être (qualité d'ambiance, propreté du bâtiment et des équipements).

d'alimentation et d'abreuvement, rythme nycthéméral). Certains font un lien entre les infections par *E. cecorum* et la vitesse de croissance (poids moyens et Gains Moyens Quotidien) (Stalker *et al.*, 2010). L'enquête n'a pas permis de mettre en évidence de lien entre le risque *cecorum* et les performances

zootechniques des lots suivis, les poids moyens ou les GMQ n'étant pas forcément révélateurs des pratiques d'élevage. Pour poursuivre ces travaux, une étude pourrait donc être menée sur les performances de lots affectés, par la collecte de données du suivi des poids et notamment des GMQ.

Tableau 1. Notes de propreté des boîtes contact flore totale selon les 2 classes d'éleveurs.

Variables	CecoRisk+	CecoRisk-	p-value	Test
Note moyenne (10 boîtes)	2,6	2,0	0,08	Wilcoxon
Note mur (4 boîtes)	2,3	1,8	0,17	Wilcoxon
Note soubassement (4 boîtes)	2,8	2,2	0,06	Wilcoxon
Note matériel (2 boîtes)	2,7	1,9	0,04	Wilcoxon

Tableau 2. Variables associées aux pratiques des éleveurs CecoRisk+.

Variables	Modalités	% de CecoRisk+	p-value	Test
Désinfection 1	Canon à mousse (n=13)	38% (5/13)	0,06	Fisher
	Pulvérisateur avec lance (n=14)	50% (7/14)		
	Atomiseur (n=8)	50% (4/8)		
	Matériel non adapté (n=11)	91% (10/11)		
Désinfection 2	Pulvérisation (n=8)	25% (2/8)	0,08	Fisher
	Fumigène (n=6)	33% (2/6)		
	Thermonébulisation (n=6)	50% (3/6)		
	Brume (n=8)	88% (7/8)		
Matériel au démarrage	Pas de mangeoire supplémentaire (n=30)	40% (12/30)	0,04	Chi²
	Ajout de becquées et alvéoles (n=20)	70% (14/20)		
Taux de CO2 mesuré en V2	< 3000 ppm (n=24)	29% (7/24)	0,01	Fisher
	Entre 3000 et 3600 ppm (n=9)	78% (7/9)		
	> 3600 ppm (n=17)	71% (12/17)		
Consigne de besoin d'air à J7	< 1,1 m3 /h /kg (n=24)	67% (16/24)	0,05	Chi²
	≥ 1,1 m3 /h /kg (n=26)	38% (10/26)		
Durée de la période de nuit à J10	Min 6h /j (n=35)	43% (15/35)	0,07	Fisher
	Moins de 6h /j (n=15)	73% (11/15)		
Purges des lignes d'eau au démarrage	Quotidiennes (min 1 /j) (n=31)	42% (13/31)	0,07	Chi²
	Irrégulières (< 1 /j) (n=19)	68% (13/19)		

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Balloy, D., 2015. Streptocoques & entérocoques. In Brugere-Picoux, J., Vaillancourt, J.-P., Bouzouaia, M., Shuvaprasad, H. L., Venne, D., (eds). *Manuel de pathologie aviaire*. pp 369-373.
- Borst, L. B., Suyemoto, M. M., Sarsour, A. H., Harris, M. C., Martin, M. P., Strickland, J. D., Oviedo, E. O., Barnes, H. J., 2017. *Vet. Pathol.* 54(1), pp 61-73.
- Devriese, L. A., Hommez, J., Wijfels, R., Haesebrouck, F., 1991. *J. Appl. Bacteriol.* 71(1), pp 46-50.
- Gerritzen, M., Lambooi, B., Reimert, H., Stegeman, A., & Spruijt, B., 2007. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 108(1-2), pp 179-185.
- Guérin, J.-L., Balloy, D., Villate, D., 2011. *Maladies des volailles*. Paris : Editions France Agricole. pp 362-364.
- Jung, A., Chen, L. R., Suyemoto, M. M., Barnes, H. J., & Borst, L. B., 2018. *Avian Dis.* 62(3), pp 261-271.
- Kense, M. J., & Landman, W. J., 2011. *Avian Pathol.* 40(6), pp 603-612.
- Olanrewaju, H. A., Thaxton, J. P., Dozier, W. A., Purswell, J., Roush, W. B., & Branton, S. L., 2006. *J. Poult. Sci.* 5(4), pp 301-308.
- Özkan, S., Yalçın, S., Babacanoğlu, E., Kozanoğlu, H., Karadaş, F., & Uysal, S., 2012. *Poult. Sci.* 91(11), pp 2912-2921.
- Stalker, M. J., Brash, M. L., Weisz, A., Ouckama, R. M., & Slavic, D., 2010. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 22(4), pp 643-645.

**AUTOVACCINS *ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE* :
RETOUR D'EXPERIENCE A L'ECHELLE D'UNE ORGANISATION DE
PRODUCTION DE DINDES SUR LA PERIODE 2009-2018 ET INTERET DANS LA
REDUCTION DE L'EXPOSITION AUX ANTIBIOTIQUES**

Papin Elodie¹, Bertin Joël¹, Cotten Anne-Sophie², Aignel Anne-Françoise²

¹*SELAS Vétérinaire du Gouessant - 3 rue de la Jeannaie – BP40513 - 22405 LAMBALLE,*

²*Coopérative Le Gouessant - BP40228 – 22402 LAMBALLE Cedex*

elodie.papin@selasdugouessant.fr

RÉSUMÉ

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) est une bactérie responsable chez la dinde d'infections respiratoires et de ténosynovites. L'impact économique des infections par ORT est important pour les maillons élevage et abattage. Plus globalement, ces infections ont des conséquences sur le bien-être animal et l'exposition aux antibiotiques des lots. Un plan d'action a donc été mis en place dans une organisation coopérative de production de dindes, s'appuyant en partie sur l'usage d'autovaccins. Une étude sur les lots de dindes abattus entre 2011 et 2018 permet de montrer le rôle de l'autovaccin ORT dans la réduction du taux de retrait à l'abattoir et l'amélioration des performances technico-économiques des lots de dinde (viabilité, indice de performance, marges dindonneau-aliment). L'ajout d'une valence *E. coli* dans l'autovaccin permet d'améliorer encore la marge dindonneau-aliment/kg. L'analyse économique montre que le coût de la vaccination avec l'autovaccin ORT n'est pas un obstacle, au vu du gain technico-économique attendu. Le rôle significatif de l'autovaccin ORT dans la réduction de l'exposition aux antibiotiques a par ailleurs été observé. L'usage des autovaccins a donc bien participé à la réalisation des objectifs du plan d'action de l'organisation de production vis-à-vis d'ORT, en cohérence avec les attentes de ses éleveurs adhérents et avec les attentes sociétales.

ABSTRACT

***Ornithobacterium rhinotracheale* autogenous vaccines: feedback from a company producing turkeys**

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) is a bacteria responsible for respiratory infections and tenosynovitis in turkeys. The economic impact of ORT infections is high on farm and slaughter stages. In addition, these infections have consequences on animal welfare and antibiotic exposure of the flocks. An action plan was implemented in a cooperative company producing turkeys, including the use of autogenous vaccines. A study on flocks slaughtered from 2011 to 2018 shows the role of ORT autogenous vaccine in the reduction of condemnation rate in slaughterhouse and in the improvement of technical and economical performances of turkeys flocks (viability, performance index, profit margins). Adding an *E. coli* strain into the vaccine leads to an increase of the farmer's profit margin per kilogram of meat. An economic analysis shows that the vaccination cost with ORT autogenous vaccine is not an obstacle, considering the expected technical and economic gains. Also, the use of ORT autogenous vaccine produced significant results on the reduction of antibiotic use. The use of autogenous vaccines contributed to the achievement of the action plan objectives for the company, consistent with farmers' and consumers' expectations.

INTRODUCTION

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) est une bactérie responsable chez la dinde d'infections respiratoires et de ténosynovites. L'impact économique des infections par ORT est important pour les maillons élevage et abattage. Plus globalement, ces infections ont des conséquences sur le bien-être animal et l'exposition aux antibiotiques des lots. La prévention des syndromes à ORT constitue donc un enjeu important pour une organisation coopérative de production de dindes.

1. PLAN D'ACTION POUR LA LUTTE CONTRE *ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE* A L'ECHELLE DE L'ORGANISATION DE PRODUCTION

1.1. Premiers essais de vaccination avec l'autovaccin *Ornithobacterium rhinotracheale*

Après les premiers cas de ténosynovite associés à ORT observés en 2000 sur les dindes de chair, la prévalence n'a cessé d'augmenter pour atteindre selon une enquête menée en 2005, 10 % des élevages de dindes (Bazin, 2005, Souillard, 2002). Le coût et les résultats partiels de l'antibiothérapie ont conduit à mener les premiers essais de vaccination en 2009 avec des autovaccins, en l'absence d'un vaccin commercial ORT disposant d'une autorisation de mise sur le marché pour la dinde en France. Ceux-ci ont permis de valider la faisabilité en élevage et l'innocuité des autovaccins. L'efficacité sur la réduction de l'impact des ténosynovites a pu être confortée au fur et à mesure des mises en place.

En 2012, avec l'arrivée du plan Ecoantibio et les attentes croissantes sur la santé et le bien-être animal, un plan d'action spécifique a été mis en place, pouvant intégrer selon les cas, l'usage d'un autovaccin. Sont impliqués dans ce plan d'action, l'organisation de production (OP) représentée par ses techniciens et propriétaire des animaux, les éleveurs adhérents à l'OP et les vétérinaires prescripteurs en charge du suivi sanitaire de chaque élevage.

1.2. Objectifs de la mise en place de l'autovaccin à l'échelle des élevages de l'organisation de production

Les objectifs sont :

- La diminution du taux de retrait pour motif ténosynovite à l'abattoir, et plus généralement l'amélioration des performances technico-économiques, ce qui permet d'augmenter la rémunération éleveur et de préserver le coût de revient de la tonne de vif pour l'OP
- La réduction de l'exposition aux antibiotiques, une demande des clients aval de l'OP, pouvant

être associée à une diminution des frais vétérinaires pour les éleveurs

Il n'a jamais été question de réaliser l'autovaccin sur l'ensemble des élevages de l'OP, mais plutôt de cibler les élevages avec un historique de ténosynovites à ORT.

1.3. De l'isolement de la souche bactérienne au chantier d'injection

Les souches d'ORT et d'*E. coli* sont isolées au laboratoire d'analyses sur des prélèvements réalisés en élevage, puis transférées pour mise en souchothèque dans les laboratoires certifiés pour la fabrication des autovaccins.

La décision de mettre en place l'autovaccin ORT est prise après discussion entre l'éleveur, le vétérinaire prescripteur et l'OP. Le taux de retrait pouvant être imputé au motif « ténosynovite » sur le lot précédent est déterminant dans cette décision. Dans la plupart des cas, seule la vaccination des mâles est recommandée, les ténosynovites impactant généralement plus fortement les mâles.

La vaccination est assortie d'un renforcement des mesures de biosécurité portant sur le nettoyage et la désinfection du circuit d'air, et le respect des barrières sanitaires.

Les lots sont vaccinés avec une injection entre le 24^e et le 35^e jour d'âge. Une bonne organisation du chantier est indispensable pour une vaccination de bonne qualité. Un des points essentiels est la réalisation des parcs à l'aide de petites barrières. Cette organisation des parcs doit être adaptée à chaque bâtiment et à chaque équipe, ce qui explique que le premier chantier sur un bâtiment soit généralement plus long que les suivants. Pour un chantier rôdé, la durée moyenne est d'environ 1 h 30 pour la vaccination des mâles sur 1000 m².

1.4. Suivi de l'efficacité de la vaccination

Des visites sont réalisées sur les lots vaccinés dans le cadre du suivi habituel des lots par l'OP et les vétérinaires. En cas d'apparition de ténosynovites sur un lot vacciné, des prélèvements sont effectués pour bactériologie dans l'objectif de réaliser le diagnostic différentiel avec les autres causes de ténosynovites (infections par staphylocoques, réovirus...) et d'isoler une éventuelle souche différente d'ORT. L'antibiogramme est utilisé pour différencier les souches d'ORT, en l'absence de méthodes de typage facilement accessibles et discriminantes. Dans certains élevages, des autovaccins bivalents avec 2 souches d'ORT articulaires ont été nécessaires pour assurer une bonne prévention des ténosynovites.

Un travail a par ailleurs été mené avec les abattoirs. Les premiers résultats de la vaccination ORT, en particulier sur la réduction des taux de retrait, ont été

présentés en 2015 et 2016 à trois abattoirs recevant les lots de dindes en provenance des élevages de l'OP. Les objectifs de ces réunions étaient d'une part de montrer le travail réalisé pour la diminution des taux de retrait (entraînant pour les abattoirs des frais de main d'œuvre et de traitement des sous-produits), et d'autre part de les sensibiliser sur leur rôle clé dans la biosécurité et la prévention des syndromes respiratoires et ténosynovites à ORT en élevage (notamment dans le nettoyage et la désinfection des containers qui sont introduits dans les bâtiments et peuvent présenter un risque de contamination important lors des enlèvements intermédiaires).

Des points réguliers sont également faits au sein de l'OP sur les effets de la vaccination avec les autovaccins ORT et/ou *E. coli* sur les performances technico-économiques et l'exposition aux antibiotiques, ce qui fait l'objet du point suivant.

2. ETUDE 2011-2018 SUR LES PERFORMANCES TECHNIQUE-ÉCONOMIQUES ET L'EXPOSITION AUX ANTIBIOTIQUES

2.1. Matériel et méthodes

Une analyse statistique a été réalisée avec le logiciel R, à partir des données technico-économiques des lots de l'OP, abattus entre janvier 2011 et juillet 2018. L'unité statistique est le lot, identifié par le numéro de lot interne à l'OP, un lot pouvant être élevé dans plusieurs bâtiments différents si le démarrage a eu lieu en double-densité. Le premier lot de l'étude vacciné avec un autovaccin ORT a été abattu en janvier 2012.

2.2. Résultats et discussion

2.2.1. Etude descriptive

L'étude porte sur 2169 lots de dindes abattus entre janvier 2011 et juillet 2018, élevés dans 165 sites d'élevage. 52 lots ont été exclus en raison d'un taux de mortalité totale supérieur à 20 %, mortalité expliquée par un accident (incendie, panne de ventilation...) ou un événement pathologique exceptionnel (histomonose par exemple). L'analyse statistique porte donc sur 2117 lots représentant près de 22 millions de dindes mâles et femelles.

Parmi ces 2117 lots, 272, soit 13%, ont été vaccinés avec un autovaccin contenant une souche (216 lots) ou 2 souches d'ORT (56 lots), dans 33 sites d'élevage. Pour la très grande majorité des 272 lots autovaccinés, seuls les mâles étaient vaccinés. Sur ces 272 lots, 108 étaient vaccinés avec un autovaccin contenant une souche (93 lots) ou deux souches d'*E. coli* (15 lots), soit 40% des lots autovaccinés.

Sur les 33 sites d'élevage comptant au moins 1 lot vacciné, nous dénombrons 164 lots vaccinés avec une ou plusieurs souches d'ORT (sans *E. coli*), et 108 lots

pour lesquels au moins une souche d'*E. coli* a été incluse dans l'autovaccin. Nous dénombrons 438 lots non vaccinés, pour la plupart antérieurs aux lots vaccinés. 1407 lots dits « contemporains » ont été élevés dans les 131 sites d'élevage où aucun lot n'a été vacciné.

2.2.2. Autovaccins et performances technico-économiques

Le taux de retrait est significativement inférieur sur les lots vaccinés avec un autovaccin mono ou bivalent ORT par rapport aux lots non vaccinés des mêmes sites d'élevage. Les lots vaccinés avec un autovaccin bivalent ORT et *E. coli* ont des taux de retrait significativement inférieurs par rapport aux lots non vaccinés et aux lots contemporains selon le test de Kruskal-Wallis au seuil de 5% (cf. Tableau 1).

On observe également un effet favorable significatif de l'autovaccin ORT sur le taux de mortalité après J10 et l'indice de performance (cet effet est observé sur les lots vaccinés avec un autovaccin mono ou bivalent ORT par rapport aux lots non vaccinés des mêmes sites d'élevage et aux lots contemporains). Par ailleurs, la mortalité après J10 et l'indice de performance tendent à être encore améliorés par l'ajout d'au moins une valence *E. coli* dans l'autovaccin, selon le test de Kruskal-Wallis au seuil de 5% (cf. Tableau 1).

En ce qui concerne les performances économiques des lots, on observe une augmentation significative de la marge dindonneau-aliment (DA)/kg et la marge DA/m² des lots vaccinés avec un vaccin monovalent ou bivalent ORT par rapport aux lots non vaccinés des mêmes sites d'élevage et aux lots contemporains. On observe un effet favorable significatif de l'ajout d'une valence *E. coli* dans l'autovaccin sur la marge DA/kg, selon le test de Kruskal-Wallis au seuil de 5% (cf. Tableau 2).

2.2.3. Analyse économique

L'écart de marge DA observé entre les lots vaccinés avec un autovaccin mono ou bivalent ORT et les lots témoins des mêmes élevages est de 0,015 €/kg, soit 15 €/tonne de poids vif.

L'écart de marge DA entre les lots vaccinés et les lots témoins des mêmes élevages est de 1,87 €/m², soit 1870 € pour 1000 m².

Estimation du coût de la vaccination des mâles, pour 1000 m² :

- Coût de l'autovaccin monovalent ORT : environ 90 €/1000 doses, soit 342 € pour 3800 mâles/1000 m²
- Coût du chantier : pour une équipe de 9 personnes pendant 1h30, à 30 €/heure, soit 405 € pour le chantier d'injection + environ 120 € de trajet

En pratique, le coût du chantier est très souvent inférieur, car les éleveurs font appel, au moins en partie, à une main d'œuvre familiale ou d'entraide, bénévole.

Soit environ 870 €/1000 m² pour un autovaccin sur les mâles, ce coût étant donc largement inférieur au gain moyen de marge DA évalué à 1870 €/1000 m².

Le gain moyen de marge DA ne prend par ailleurs pas en compte la diminution des frais de traitement antibiotique sur les lots vaccinés, ainsi que le gain en temps de travail par la diminution du tri des sujets boiteux en fin de lot.

2.2.4. Autovaccin *Ornithobacterium rhinotracheale* et exposition aux antibiotiques

L'étude a été réduite à un échantillon de 16 sites d'élevage, comptant 31 bâtiments, pour lesquels les données complètes d'exposition aux antibiotiques étaient disponibles. Nous avons étudié l'exposition aux antibiotiques des deux lots précédant la mise en place de l'autovaccin et des deux lots suivants, dans chaque bâtiment, ce qui représente 54 lots non vaccinés et 56 lots vaccinés avec un autovaccin mono ou bivalent ORT. L'indicateur d'exposition aux antibiotiques choisi était l'Animal Level of Exposure to Antibiotics (ALEA), qui représente le rapport entre la masse ayant reçu un traitement AMM sur la masse potentielle calculée sur la base du poids moyen Anses 2010 à 10 kg.

On observe une baisse de 32% du niveau moyen et une diminution de 92% du niveau médian d'exposition aux antibiotiques à cible respiratoire (tétracyclines, macrolides et pleuromutilines) des lots vaccinés ORT par rapport aux lots non vaccinés, baisse significative au seuil de 5% selon le test de Kruskal-Wallis (cf. Tableau 3).

DISCUSSION

Nous avons évoqué les mesures de biosécurité renforcée associées à la mise en place de l'autovaccin dans un élevage. Ces mesures interviennent au vide, avec en particulier le lavage et la désinfection du circuit d'air, et aux enlèvements intermédiaires. Nous avons constaté que ces mesures de biosécurité ne permettent pas à elles seules d'éviter des épisodes parfois sévères de ténosynovites. En complément, la mise en place des autovaccins ORT a permis d'assurer des résultats plus réguliers dans la prévention des ténosynovites, validés par les chiffres présentés ici. Les éleveurs y retrouvent également une plus grande sérénité face aux syndromes respiratoires et à leurs complications.

Par ailleurs, cette étude ne prend pas en compte les programmes vaccinaux viraux, or les infections par ORT peuvent être favorisées par l'infection par des virus comme le pneumovirus aviaire. En pratique, l'autovaccin ORT a le plus souvent été proposé en

première intention aux éleveurs impactés par les ténosynovites. Le travail sur les programmes vaccinaux viraux est intervenu dans un deuxième temps, en cas de persistance de syndromes respiratoires sur certains élevages.

CONCLUSION

L'étude 2011-2018 montre le rôle de l'autovaccin mono ou bivalent ORT dans la réduction du taux de retrait à l'abattoir, et l'amélioration des performances technico-économiques des lots de dinde : indice de performance, viabilité. Ceci entraîne l'augmentation des marges DA, qui permet d'intégrer le coût de la vaccination. Le premier objectif de la mise en place de l'autovaccin ORT, à l'échelle de l'OP, est donc atteint.

L'ajout d'une valence *E. coli* dans l'autovaccin permet d'améliorer encore la marge DA/kg. Des tendances à l'amélioration de la viabilité et de l'indice de performance ont été observées.

Des résultats significatifs de l'autovaccin ORT dans la réduction de l'exposition aux antibiotiques à cible respiratoire ont par ailleurs été observés. Il s'agissait du second objectif de la mise en place de l'autovaccin à l'échelle de l'OP.

L'usage des autovaccins a donc bien participé à la réalisation des objectifs du plan d'action de l'OP vis-à-vis d'ORT, en cohérence avec les attentes sociétales les attentes de ses éleveurs adhérents. Si les éleveurs ayant réalisé l'autovaccin sur un premier lot l'ont, pour la plupart, ensuite intégré durablement dans leur programme vaccinal, c'est également parce qu'ils y retrouvent une plus grande sérénité.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bazin T. *et al.*, 2005. In : 6èmes Journées de la Recherche Avicole, Saint-Malo, France
 Souillard R., 2002. In : Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse, France

Tableau 1. Autovaccins et performances techniques
 Test de Kruskal-Wallis au seuil de 5%

	Taux de retrait (%)		Taux de mortalité après J10 (%)		IP	
	Moyenne	Médiane	Moyenne	Médiane	Moyenne	Médiane
Lots vaccinés ORT (sans <i>E. coli</i>)	1,55	1,41 ^{ac}	4,89	4,30 ^m	393,76	393 ^x
Lots vaccinés ORT + <i>E. coli</i>	1,46	1,45 ^a	4,49	4,22 ^m	400,74	406 ^x
Lots non vaccinés des sites vaccinés	1,79	1,62 ^b	5,32	5,02 ⁿ	380,21	382 ^y
Lots contemporains	1,71	1,49 ^c	5,55	5,03 ⁿ	381,40	382 ^y
<i>p-value</i>		0,00266		0,00029		1,75.10 ⁻⁹

Tableau 2. Autovaccins et performances économiques
 Test de Kruskal-Wallis au seuil de 5%

	Marge DA/m ²		Marge DA/kg	
	Gain moyen	Gain médian	Gain moyen	Gain médian
Lots vaccinés ORT (sans <i>E. coli</i>)	1,87	2,01 ^a	0,015	0,020 ^x
Lots vaccinés ORT + <i>E. coli</i>	2,61	3,23 ^a	0,025	0,026 ^y
Lots non vaccinés des sites vaccinés	Base	Base ^b	Base	Base ^z
<i>p-value</i>		1,12.10 ⁻¹⁴		1,15.10 ⁻¹⁴

Tableau 3. Autovaccin *Ornithobacterium rhinotracheale* et exposition aux antibiotiques
 Test de Kruskal-Wallis au seuil de 5%

	ALEA antibiotiques à cible respiratoire	
	ALEA moyen	ALEA médian
Lots vaccinés ORT (sans <i>E. coli</i>)	0,58	0,03 ^a
Lots non vaccinés des sites vaccinés	0,85	0,36 ^b
<i>p-value</i>		0,03238

PRESCRIPTION RAISONNEE DE COMPLEMENTES MINERAUX EN ELEVAGES AVIAIRES ATTEINTS DE TROUBLES LOCOMOTEURS A L'AIDE D'ANALYSES BIOCHIMIQUES

Sauvaget Samuel¹
Belaud Franck¹

¹*LABOVET Conseil - 22 rue Olivier de Serres - 85 LES HERBIERS,*
s.sauvaget@reseaucristal.fr

RÉSUMÉ

Afin d'illustrer l'intérêt de la biochimie sanguine en élevage aviaire, cette série de 22 cas de troubles locomoteurs d'origines diverses présente les recommandations de prescription en compléments minéraux proposées suite au dosage sanguin de calcium et de phosphore. Le sang est prélevé sur tube hépariné en élevage ou avant autopsie puis est analysé par un automate de chimie liquide. Les paramètres calcium, phosphore et protéines totales sont analysés. Le sang de sujets sains servant de témoins est également analysé afin de donner une base de comparaison. Les données collectées sont le type de production, l'âge, les signes cliniques, les lésions observées, les éventuels diagnostics étiologiques et le caractère infectieux ou non de l'affection. Cette série de cas montre que la diversité des lésions et la concomitance de différentes causes de boiteries au sein d'un même élevage justifie le recours à la biochimie pour choisir le complément adapté à chaque situation : 55% des cas débouchent sur une prescription en phosphore, 27% des cas en calcium, 14% concluent à une absence de complémentation et 4% à une complémentation mixte. Cette étude n'a pas vocation à décrire la prescription minérale adéquate en fonction de telle ou telle maladie. Certains cas ont également pu être suivis dans le temps, permettant une évaluation de la réponse au traitement.

ABSTRACT

Rational prescription of mineral supplements in bird farms suffering from locomotor disorders using biochemical analysis

To illustrate the interest of blood biochemistry in poultry farming, this series of 22 cases of locomotor disorders of various origins presents the recommendations for prescription in mineral supplements proposed following the calcium and phosphorus blood test. The blood is collected on heparinized tube in breeding or before autopsy then is analyzed by an automaton of liquid chemistry. Calcium, phosphorus and total protein parameters are analyzed. The blood of healthy subjects serving as controls is also analyzed to provide a basis for comparison. The collected data are the type of production, the age, the clinical signs, the observed lesions, the possible etiological diagnoses and the infectious or non infectious nature of the affection. This series of cases shows that the diversity of lesions and the concomitance of different causes of lameness within the same farm justify the use of biochemistry to choose the appropriate supplement for each situation: 55% of cases lead to a phosphorus prescription 27% of cases with calcium, 14% conclude with no complementation and 4% with mixed supplementation. This study is not intended to describe the appropriate mineral prescription according to this or that disease. Some cases could also be tracked over time, allowing an assessment of the response to treatment.

INTRODUCTION

Les troubles locomoteurs observés en élevage aviaire sont fréquents et responsables de nombreuses pertes économiques. La tendance à un alourdissement des productions est un facteur aggravant supplémentaire. La recherche systématique d'agents infectieux est évidemment indispensable à la démarche diagnostique mais n'est pas toujours suffisante dans la prise en charge thérapeutique. En effet, d'une part un certain nombre d'étiologies relève de troubles exclusivement métaboliques non détectables par une analyse bactériologique ou de biologie moléculaire classique. D'autre part, les conséquences des différentes maladies, infectieuses ou non, peuvent se manifester par des modifications de l'équilibre phosphocalcique. Cet équilibre est primordial car il régit notamment la qualité de l'ossification et donc de la croissance de l'animal, mais également la ponte pour les reproducteurs. Toute altération de cet équilibre peut se révéler néfaste pour les performances et le bien-être de la production touchée. La prescription ciblée de compléments minéraux adaptés au désordre minéral constaté est un élément thérapeutique pertinent permettant, si ce n'est une guérison, tout du moins une limitation des conséquences pathologiques et économiques du trouble locomoteur en cause. La biochimie sanguine consiste à doser différentes molécules présentes dans le sang et résultant du métabolisme d'un organisme. Elle permet ainsi de révéler le fonctionnement et les dysfonctionnements internes. Pour chaque espèce et stade physiologique, il existe des normes correspondant à un fonctionnement optimal de l'organisme. Dans le cadre des diagnostics de boiterie en élevage aviaire, le recours à la biochimie pour évaluer le métabolisme phosphocalcique est justifié par l'intérêt d'une prescription minérale adaptée à la maladie exprimée par l'animal. L'étude présente une série de cas de troubles locomoteurs en élevage aviaire de productions variées et ayant été suivis par analyses biochimiques. Ces analyses ont abouti à des recommandations de prescription en complément minéral orientée soit vers le calcium soit vers le phosphore, soit vers les deux, soit ni l'un ni l'autre. Cette série de cas n'a pas vocation à décrire le profil biochimique associé à une maladie mais principalement à mettre en évidence les modifications du rapport phosphocalcique dans différents contextes de boiteries.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Inclusion des élevages

Le premier critère d'inclusion dans cette série de cas est le constat de troubles locomoteurs dans l'élevage.

Plusieurs espèces et productions (chair et repro) sont représentées : poulets, dinde, canard de Barbarie, canard mulard, canard Pekin, pintade. Tous ces élevages ont eu une analyse biochimique motivée par la présence de ces troubles locomoteurs. Un diagnostic étiologique est parfois obtenu mais n'est pas systématique.

Systématiquement, une comparaison avec un lot d'animaux témoins ne présentant pas de symptômes est effectuée. Ces témoins peuvent être présents dans le même bâtiment ou être issus d'un autre bâtiment d'âge et de conditions d'élevage identiques. Cette pratique permet de s'affranchir du problème fréquent de l'absence de valeurs de référence correspondant à l'âge de la production examinée.

1.2. Prélèvements et analyses biochimiques réalisées

Le sang est prélevé soit en élevage, soit au laboratoire préalablement à l'autopsie. Il est recueilli sur tube héparine de lithium et rapidement centrifugé. Le plasma est ensuite recueilli et reversé dans un tube adapté à l'automate d'analyses biochimiques. Le matériel utilisé est un automate Provet de la société Kitvia fonctionnant en chimie liquide.

Les paramètres mesurés sont le calcium total, le phosphore et les protéines totales. Il est indispensable de mesurer le taux de protéines totales car il peut impacter la calcémie (à noter que le pH sanguin peut aussi avoir une influence mais n'a pas été pris en compte dans cette étude). En effet 50% du calcium sanguin est transporté par des protéines (notamment les beta-globulines). Une élévation anormale du taux de protéines (phénomène inflammatoire, déshydratation) peut entraîner une augmentation significative du taux de calcium. Une correction peut donc être appliquée afin d'obtenir une valeur cohérente. Il existe des formules de correction adaptées aux mammifères mais ne correspondant pas aux différentes espèces d'oiseaux. Arbitrairement, une correction de plus ou moins 10% est appliquée au taux de calcium en fonction de la valeur en protéines, si celle-ci est trop éloignée de la valeur moyenne des témoins.

1.3. Données collectées pour chaque cas de l'étude

Les éléments répertoriés pour chaque cas sont le type de production, l'âge, les signes cliniques et les lésions, le diagnostic étiologique s'il est établi, le caractère infectieux ou non et la recommandation proposée suite à l'examen biochimique. Ils sont regroupés dans le tableau 1.

2. RESULTATS ET INTERPRETATIONS

2.1. Répartition des cas pour les différentes espèces

Parmi les 22 cas de troubles locomoteurs en volailles inclus dans l'étude, les différentes espèces représentées sont : poulet (10 cas), dinde (7 cas), canard (3 cas) et pintade (2 cas).

2.2 Répartition globale des cas en fonction des recommandations issues des analyses biochimiques

La figure 1 présente la répartition globale des cas indépendamment de l'espèce ou du caractère infectieux. On observe que 55% des cas débouchent sur une prescription en phosphore, 27% des cas en calcium, 14% concluent à une absence de complémentation et 4% à une complémentation mixte.

2.3 Répartition des cas en fonction du caractère infectieux

Le caractère infectieux est justifié par une analyse bactériologique ou de biologie moléculaire cohérente avec les lésions observées. Les figures 2 et 3 présentent la répartition des résultats en fonction de ce critère. En cas de causes infectieuses, 2/3 des cas relèvent d'une supplémentation en phosphore. Lorsque la cause est non infectieuse, la répartition est plus équilibrée entre le calcium (39%) et le phosphore (46%).

2.4 Répartition des cas en fonction des espèces

Les figures 4 et 5 présentent la répartition des recommandations dans l'espèce dinde et l'espèce poulet. Chez la dinde, la majorité des situations a abouti à une recommandation en phosphore, tandis que la situation est beaucoup plus partagée chez le poulet (50% pour le calcium, 40% pour le phosphore).

2.5 Interprétation d'un cas justifiant une complémentation minérale

La figure 6 présente le cas d'un lot de poulets de 3 semaines présentant des os mous. Les animaux malades sont comparés avec des animaux sains du même bâtiment. On observe des valeurs globalement plus basses en phosphore, cohérentes avec les constats cliniques. Un test statistique (Wilcoxon bivarié) permet de constater une différence significative (p -value < 0,05) entre les deux lots et de justifier la prescription en phosphore.

2.6 Interprétation de cas ne justifiant pas de complémentation

Le premier cas ne justifiant pas de complémentation est un lot de pintades pour lesquelles des glissements de tendons ont été observés. Sur demande de l'éleveur, une analyse biochimique du calcium et du phosphore a été effectuée, pensant qu'une carence d'apports était à l'origine du phénomène. L'analyse

n'a pas révélé d'anomalies du métabolisme phospho-calcique et a donc pu écarter l'insuffisance d'apports en minéraux dans l'alimentation.

Les deux autres cas sont associés à une hypervitaminose D. L'analyse biochimique a révélé une augmentation conjointe du calcium et du phosphore et a permis de suspecter une complémentation vitaminique excessive sur ces lots (cas repris ci-dessous dans le paragraphe concernant le suivi biochimique).

2.7 Interprétation d'un suivi biochimique

Le suivi biochimique des différents cas n'a pas systématiquement été possible sur cette série pour des raisons pratiques, financières ou de durée d'élevage.

Pour exemple, voici deux cas illustratifs ayant fait l'objet d'un suivi biochimique après la mise en place des recommandations issues de la biochimie.

Le premier concerne un lot de dindes de 8 semaines ayant eu une complémentation excessive en vitamine D et présentant des boiteries. Les figures 7 et 8 présentent l'évolution des paramètres calcium et phosphore. Les sujets malades avaient des valeurs en phosphore et en calcium significativement supérieures (test de Wilcoxon bivarié, p -value < 0,05) à celles des sujets sains. On observe un retour à la normale quelques semaines après, les sujets dits « malades » n'ayant finalement quasiment plus de symptômes et retrouvant un profil biochimique comparable à des sujets sains.

Le deuxième cas concerne un lot de canes reproductrices sujettes à des carences en calcium. Le suivi (figures 9 et 10) a permis de constater une évolution positive des concentrations en calcium et un retour à la normale du rapport phospho-calcique, cohérent avec l'activité de ponte à ce stade physiologique.

3. DISCUSSION

Les causes de carences en minéraux sont multiples (Silliart *et al*, 2007). Elles relèvent dans un grand nombre de cas de carences d'absorption liées à des dysfonctionnements digestifs ne permettant pas l'assimilation correcte et le passage de la barrière intestinale des minéraux (Chorfy *et al*, 2015a). Des maladies telles que la réovirose, mais aussi des problèmes de qualité d'eau (charge bactérienne néfaste, pH trop basique...) sont ainsi responsables de ces défauts d'absorption.

Dans cette série de cas, les arthrites d'origine infectieuse sont souvent accompagnées de lésions non infectieuses et il est difficile de mesurer l'implication de ces infections ostéo-articulaires dans les modifications de l'équilibre phospho-calcique. De façon pragmatique à nouveau, le constat de l'anomalie métabolique est traité en prenant en compte le déséquilibre constaté.

L'homéostasie phospho-calcique est un mécanisme complexe relevant de contrôles hormonaux et influencée également par la digestibilité des apports en calcium et en phosphore (Proszkowiec-Weglarz *et al*, 2013) (Li *et al*, 2017). La littérature recense peu de valeurs de références chez les volailles (Chorfi *et al*, 2015b), imposant une comparaison avec un lot témoin sain.

La tentation d'un classement des lésions et des signes cliniques en fonction du besoin en calcium ou en phosphore est forte mais n'est pas envisageable sur cette série de cas en raison de l'échantillonnage faible et du manque de données pour un certain nombre de cas. La description du comportement biochimique associé à telle ou telle maladie ou lésion relève surtout d'une étude encadrée et pas d'un simple recueil d'informations terrain. Certains cas ont des origines multifactorielles et un diagnostic étiologique unique n'est parfois pas la seule cause du problème. Néanmoins, un des intérêts de cette série de cas est l'illustration des désordres phospho-calciques associés à des troubles locomoteurs d'étiologies et de symptomatologie variées, justifiant ainsi son recours dans la compréhension et la prise en charge individualisée d'un cas (Kendal, 2005) (Pinson, 2014).

Les observations faites sur le caractère infectieux ou sur l'espèce dinde, montrant une majorité de cas en faveur d'une complémentation en phosphore ne doivent pas être prises pour vérité générale. On peut néanmoins envisager des tendances qui méritent de toute façon d'être vérifiées systématiquement.

CONCLUSION

Cette étude permet de mettre en lumière les désordres du métabolisme phospho-calcique contemporains de très nombreuses causes de boiteries en élevage aviaire. Le recours à la biochimie sanguine permet de justifier la prescription ou non d'une complémentation minérale et le cas échéant de l'orienter judicieusement. Le suivi dans le temps permet de valider la pertinence du choix thérapeutique et de s'assurer du retour à la normale. Cette série de cas ne permet pas de décrire avec précision le comportement du métabolisme phospho-calcique en fonction d'une maladie ou d'un diagnostic lésionnel mais peut suggérer des tendances dans certaines situations. Ces éléments sont à préciser au travers d'études spécifiquement dédiées au profil biochimique par maladie et par espèce. Enfin, il convient d'être prudent sur les interprétations : une carence observée à l'échelle sanguine peut être le reflet de carences d'apport, mais aussi et dans la majorité des cas de carences d'absorption aux causes multiples (maladies digestives, qualité d'eau, conditions d'élevage...). En l'absence de troubles systématiques dans les élevages, le constat d'anomalies biochimiques doit également être le point de départ d'une réflexion sur les conditions d'élevage et les courbes de croissance des animaux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chorfy D., Brugère-Picoux J., Venne D., 2015a. Maladies nutritionnelles. In Manuel de pathologie aviaire (AFAS), Brugère-Picoux J. et col, Paris, pp701
- Chorfy D., Venne D., 2015b. Biochimie sanguine chez les oiseaux. In Manuel de pathologie aviaire (AFAS), Brugère-Picoux J. et col, Paris, pp701
- Kendal E.H., 2005. Diagnostic value of biochemistry. In Clinical avian medicine (Spix Publishing), Harisson G.J., Lightfoot T.L., Palm Beach, pp1008
- Li X., Zhang X., Bryden W.L., 2017. Calcium and phosphorus metabolism and nutrition of poultry : are current diets formulated in excess ? *Animal Production Science*, 57(11)
- Pinson M., 2014. Troubles locomoteurs non infectieux chez la dinde : étiologie, évolution, prises en charge technique et thérapeutique. Thèse médecine vétérinaire, Nantes, pp120
- Proszkowiec-Weglarz M., Angel R., 2013. Calcium and phosphorus metabolism in broilers : effects of homeostatic mechanism on calcium and phosphorus digestibility. *The Journal of Applied Poultry Research* 22,(3),609-627
- Silliart B., Nguyen F., 2007. Le mémento biologique du vétérinaire (Les Editions du Point Vétérinaire), Rueil-Malmaison, pp318

Tableau 1 : Présentation des différents cas de troubles locomoteurs inclus dans l'étude

espèce	âge	signes cliniques et lésions	diagnostic étiologique	infectieux	complémentation
canard	54 jours	entérite, faiblesse musculaire	Derzsy	oui	P
canard	49 jours	nécrose de tête, entérite	Derzsy, circovirus,	oui	Ca et P
dinde	28 jours	dyschondroplasie, luxation tendon gastrocnémien		non	P
dinde	49 jours	dyschondroplasie, arthrite, nécrose de tête fémorale	ORT	oui	P
dinde	101 jours	arthrite	ORT	oui	P
dinde	70 jours	faiblesse musculaire déformation osseuse,		non	P
pintade	21 jours	glissement de tendon		non	absence
pintade	32 jours	faiblesse musculaire, déformation osseuse		non	P
poulet	13 jours	arthrite, os mous, nécrose de tête	E cecorum, E coli	oui	P
poulet	24 jours	Dyschondroplasie, os mou, nécrose de tête fémorale, maldigestion	réovirose	oui	Ca
poulet	13 jours	arthrite, nécrose de tête fémorale, os mou	réovirose	oui	P
poulet	21 jours	arthrite	E coli, suspicion surdosage Vit D	oui	absence
poulet	35 jours	retard de croissance		non	Ca
poulet certifié	49 jours	déformations osseuses	rachitisme	non	Ca
poulet certifié	42 jours	arthrite	S aureus	oui	P
poulet certifié	16 jours	faiblesse musculaire		non	Ca
dinde	16 semaines	déformation osseuse		non	P
poulet	28 jours	dyschondroplasie		non	Ca
dinde	8 semaines	boiterie	hypervitaminose D	non	absence
poulet	3 semaines	os mous		non	P
dinde	32 jours	dyschondroplasie		non	P
canard	40 semaines	fractures		non	Ca

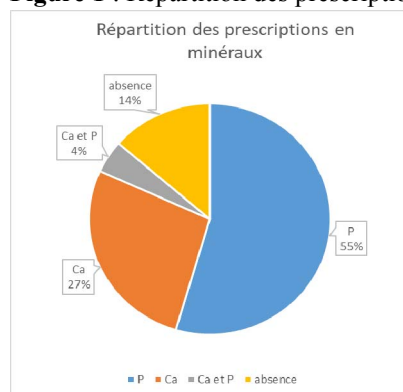
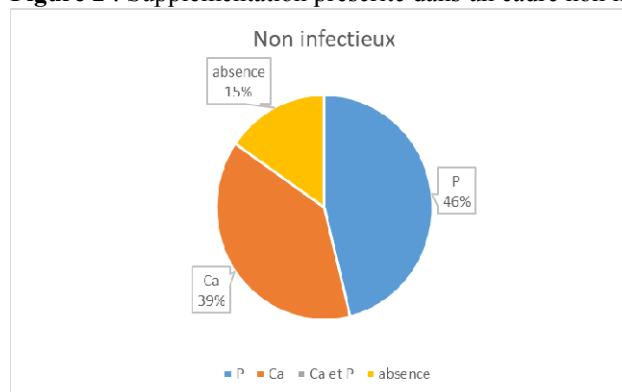
Figure 1 : Répartition des prescriptions**Figure 2** : Supplémentation prescrite dans un cadre non infectieux

Figure 3 : Supplémentation prescrite dans un cadre infectieux

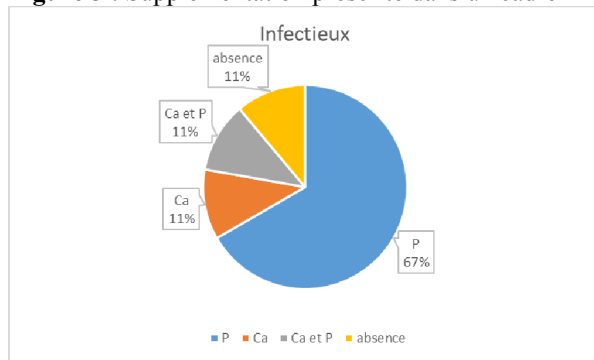


Figure 4 : Supplémentation chez la dinde

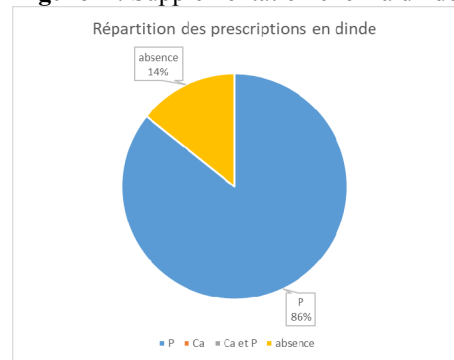


Figure 5 : Supplémentation chez le poulet

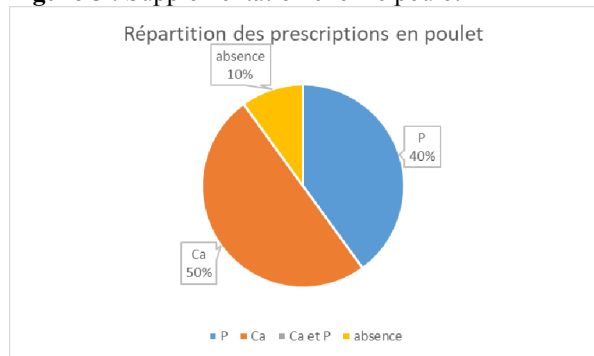
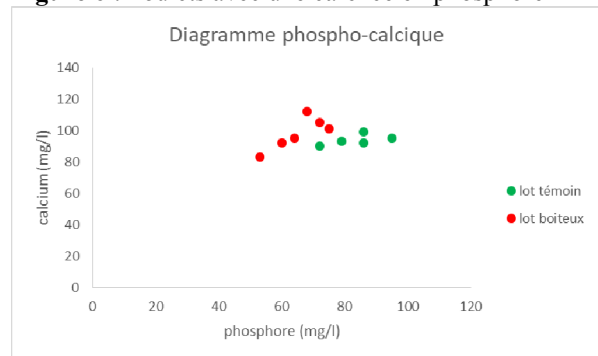
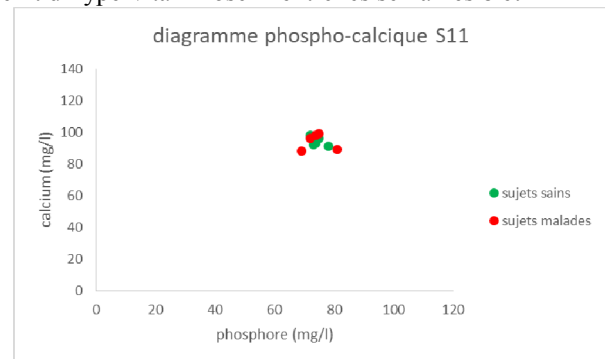
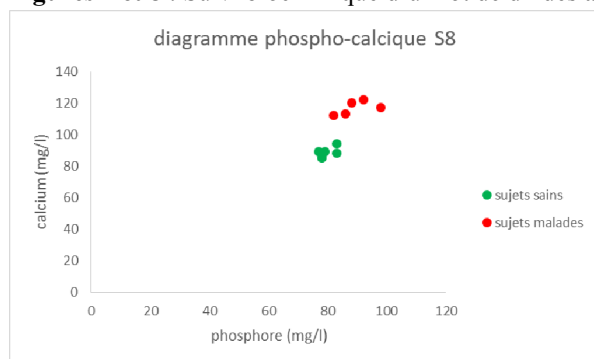


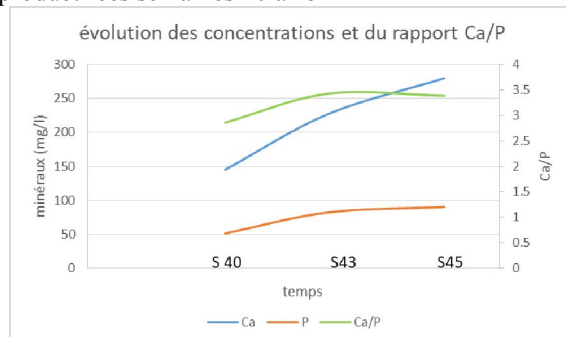
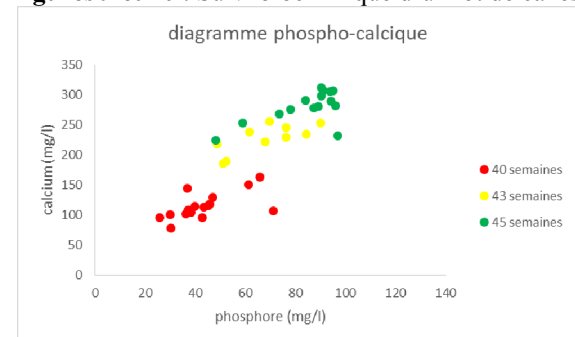
Figure 6 : Poulets avec une carence en phosphore



Figures 7 et 8 : Suivi biochimique d'un lot de dindes atteint d'hypervitaminose D entre les semaines 8 et 11



Figures 9 et 10 : Suivi biochimique d'un lot de canes reproductrices semaines 40 à 45



SESSION
PATHOLOGIE - PREVENTION

Synthèse

VIROSES RESPIRATOIRES DES VOLAILLES : APPORT DES NOUVEAUX OUTILS DIAGNOSTIQUES POUR CARACTERISER LES VIRUS ET LES COÏNFECTIONS

Jean-Luc GUERIN¹, Jocelyn MARGUERIE²

¹ENVT, INRA, UMR IHAP, Chaire de biosécurité aviaire, 23 chemin des Capelles, 31076 TOULOUSE

²Fili@Vet, Réseau Cristal, 7 Rue des Artisans, 79300 BRESSUIRE
jl.guerin@envt.fr & j.marguerie@reseaucristal.fr

RÉSUMÉ

Les syndromes respiratoires sont parmi les plus fréquemment rencontrés en élevage de volailles de chair. Ils n'impactent pas seulement la croissance et la viabilité des animaux, mais mènent également à des arthrites bactériennes secondaires et des retraits à l'abattoir. Les principaux virus aviaires à tropisme respiratoires sont les paramyxovirus aviaires de type 1 (PMV-1), les virus influenza A (VIA), le coronavirus de la bronchite infectieuse (VBI), le métapneumovirus (aMPV), et le virus de la laryngotrachéite infectieuse (LTI). Les lésions primaires dues à un ou plusieurs virus sont le plus souvent aggravées par la surinfection par une ou plusieurs bactéries. Le laboratoire d'analyses vétérinaires sera très utile pour déterminer le ou les agents primaires et les agents de surinfection.

L'usage des outils de biologie moléculaire et en particulier des tests PCR s'est démocratisé et a largement contribué à une meilleure connaissance des infections respiratoires. Les perspectives d'apport des outils de la génomique concernent essentiellement une meilleure connaissance des coïnfections au niveau de l'appareil respiratoire. Les perspectives sont extrêmement prometteuses et permettront dans quelques années aux vétérinaires et aux organisations de production de disposer de données toujours plus précises et rapides pour éclairer la décision dans la prise en charge d'un lot de volailles ou la définition d'un plan de prophylaxie.

ABSTRACT

Viral respiratory diseases of poultry: the benefit of new diagnostic tools to characterize viruses and coinfections

Respiratory syndromes are among the most frequently diagnosed in broiler poultry production. They not only impact the growth and viability of birds, but also lead to secondary bacterial arthritis and withdrawals at slaughterhouse. The main avian respiratory viruses are avian paramyxovirus type 1 (PMV-1), influenza A virus (VIA), infectious bronchitis coronavirus (IBV), metapneumovirus (aMPV), and laryngotracheitis virus infectious disease (LTI). Primary lesions due to one or more viruses are most often aggravated by superinfection by one or more bacteria. The veterinary diagnostic laboratory will be very useful in determining the primary and superinfection agents.

The use of molecular biology tools and in particular PCR tests has become more widespread and has contributed to a better knowledge of respiratory infections. The prospects of bringing genomics tools essentially concern a better knowledge of coïnfections in the respiratory system. The prospects are extremely promising and will enable veterinarians and production organizations to obtain ever more accurate and rapid data in a few years to inform the decision on the management of a batch of poultry or the definition of a prophylaxis plan.

INTRODUCTION

Les syndromes respiratoires sont parmi les plus fréquemment rencontrés en élevage de volailles de chair. Ils sont notamment critiques en milieu et fin de croissance chez le poulet et la dinde de chair. Ils sont aussi associés à des syndromes de type « chute de pontes » chez les volailles pondeuses et reproductrices, avec des pertes en production d'œufs et de poussins d'un jour.

Chez les volailles de chair, les syndromes respiratoires n'impactent pas seulement la croissance et la viabilité des animaux, mais mènent également à des arthrites bactériennes secondaires et des retraits à l'abattoir. Ils sont enfin une indication importante de prescription d'antibiotiques.

1. Les virus et leur contribution à la pathologie respiratoire

Les principaux virus aviaires à tropisme respiratoires sont les paramyxovirus aviaires de type 1 (PMV-1), les virus influenza A (VIA), le coronavirus de la bronchite infectieuse (VBI), le métapneumovirus (aMPV), et le virus de la laryngotrachéite infectieuse (LTI). Les lésions primaires dues à un ou plusieurs virus sont le plus souvent aggravées par la surinfection par une ou plusieurs bactéries, *Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Riemerella anatipestifer*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma gallisepticum* ou *synoviae*, staphylocoques et entérocoques, *Avibacterium* (ex-*Haemophilus*) *paragallinarum*, *Bordetella avium*, etc...

Le rôle de ces coïnfections est de plus en plus documenté en pathologie respiratoire aviaire, que ce soit en modèle « virus+ virus » ou « virus+ bactérie » (Umar et al, 2017).

2. La démarche diagnostique en pathologie virale respiratoire

La première étape diagnostique, lors de la visite d'élevage, consiste à bien cerner les manifestations cliniques, les lésions et les facteurs de risques zootechniques : l'enjeu est

d'évaluer l'impact respectif des facteurs de risque techniques et des agents infectieux.

Le laboratoire d'analyses vétérinaires sera très utile pour déterminer le ou les agents primaires et les agents de surinfection : cette notion d'agent primaire et secondaire est d'ailleurs de plus en plus discutée, compte tenu de la synergie réciproque qui peut s'opérer. Rappelons que la plupart du temps, plusieurs agents infectieux (virus, bactéries, champignon) peuvent être isolés simultanément. En fonction de l'espèce concernée, on ciblera les agents les plus classiques de coïnfection respiratoire : *E. coli* et mycoplasmes chez le poulet, la poule et la dinde, auquel s'ajoutent *Ornithobacterium rhinotracheale* chez la dinde ou *Riemerella anatipestifer* chez le canard.

La détermination de profils sérologiques est une méthode d'évaluation indirecte d'une infection virale. Si les tests ELISA permettent d'obtenir une réponse strictement quantitative et peu discriminante, le recours à des tests plus spécifiques comme l'inhibition de l'hémagglutination (IHA), permet un typage plus fin, comme dans le cas de la discrimination entre génotypes de VBI. Pour autant ces outils ne permettent pas toujours une discrimination robuste entre souches sauvages et vaccinales au sein d'un même groupe génétique.

L'usage des outils de biologie moléculaire et en particulier des tests PCR s'est démocratisé et a largement contribué à une meilleure connaissance des infections respiratoires, notamment pour les virus VBI, PMV-1, LTI et VIA. Au-delà de la détection et de l'évaluation de la charge virale dans la prise d'essai, le typage du virus peut être particulièrement précieux pour déterminer des liens épidémiologiques éventuels ou la pertinence d'un protocole vaccinal. La manipulation de ces données est néanmoins souvent délicate pour le vétérinaire praticien : là encore, la discrimination entre souches sauvages et vaccinales demande une analyse très fine des séquences et n'est pas toujours univoque.

3. Perspectives : quels outils au service du clinicien dans le futur ?

Les perspectives d'apport des outils de la génomique concernent essentiellement une meilleure connaissance des coïnfections, c'est-à-dire du « pathobiome » respiratoire, qui représente l'écosystème microbien, dans son

ensemble, au niveau de l'appareil respiratoire (Vayssier-Taussat et al, 2014). L'enjeu est de mieux comprendre les coïnfections (i.e. apprécier la contribution pathologique de chaque virus) et tracer les virus (suivre leur évolution et les voies de transmission intra- et inter- élevages).

La détection simultanée de plusieurs agents infectieux dans un même échantillon est un enjeu diagnostique majeur en virologie respiratoire. Ce changement de paradigme s'est opéré en virologie respiratoire humaine il y a plus de 10 ans avec la mise à disposition de tests multiplex commerciaux permettant de détecter simultanément et rapidement plus de 10 agents infectieux. Le recours à ces tests a ainsi permis de mettre en évidence la prévalence réelle de certains agents, mais pour autant, a-t-elle amélioré la prise en charge des patients ? Ce point est très discuté dans la communauté médicale (Iroh Tam et al, 2017).

En pathologie aviaire, le recours à ces outils, qu'il s'agisse de tests multiplex « vrais » ou de tests PCR à haut débit est encore du domaine de la recherche clinique. Ces outils peuvent apporter une amélioration de la connaissance épidémiologique et des informations extrêmement précieuses pour l'industrie du vaccin et du diagnostic vétérinaire (Croville et al, 2018a ; Laamiri et al, 2016).

Les outils de nouvelle génération de séquençage (NGS) apportent une perspective encore plus intéressante, mais là aussi, sont encore dans le champ de la recherche clinique. Ce séquençage massif, ciblé ou sans *a priori*, permet de générer de très grandes quantités de

données génétiques à partir d'un échantillon biologique. Les outils bio-informatiques permettent ensuite de « trier » ces données et d'identifier les séquences potentiellement virales, de les aligner et les interpréter. Les délais d'obtention des résultats (plusieurs semaines ou mois) rendent difficile l'application au diagnostic. Des premiers travaux sont pour autant prometteurs (Qiu et al, 2019).

Des outils de NGS de « 3^{ème} génération », de format bien plus petit, permettent de réaliser des tests dans des délais de quelques heures à jours, sous réserve de la disponibilité d'outils d'analyse bio-informatique adaptés... pour le moment (en 2019) ce scénario de séquençage « en temps réel » est purement théorique, car le pipe-line depuis la prise en charge de l'échantillon jusqu'à l'analyse bio-informatique reste du domaine de laboratoires très bien équipés et n'est pas encore applicable en routine. Des résultats prometteurs ont par exemple été obtenus par NGS sur des formes cutanées ou respiratoires de variole aviaire (Croville et al, 2018b).

CONCLUSION

Au final, les perspectives sont extrêmement prometteuses et permettront dans quelques années aux vétérinaires et aux organisations de production de disposer de données toujours plus précises et rapides pour éclairer la décision dans la prise en charge d'un lot de volailles ou la définition d'un plan de prophylaxie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Croville G., Foret C., Heuillard P., Senet A., Delpont M., Mouahid M., Ducatez MF., Kichou F., Guerin JL., 2018a. Avian Pathol, Feb 27:1-8.
- Croville G., Le Loc'h G., Zanchetta C., Manno M., Camus-Bouclainville C., Klopp C., Delverdier M., Lucas MN., Donnadiou C., Delpont M., Guerin JL., 2018b. J Virol Methods, nov;261:34-39.
- Iroh Tam PY., Zhang L., Cohen Z., 2017. Children (Basel). 2017 Jan 7;4(1). pii: E3.
- Laamiri N., Fällgren P., Zohari S., Ben Ali J., Ghram A., Leijon M., Hmila I., 2016. J Clin Microbiol. Nov;54(11):2716-2725.
- Qiu Y., Wang S., Huang B., Zhong H., Pan Z., Zhuang Q, 2019. PLoS ONE 14(2): e0211553.
- Umar S., Guerin JL., Ducatez MF., 2017. Avian Dis. Mar;61(1):3-15.
- Vayssier-Taussat M., Albina E., Citti C., Cosson JF., Jacques MA., Lebrun MH., Le Loir Y., Ogliastro M., Petit MA., Roumagnac P., Candresse T., 2014. Front Cell Infect Microbiol. Mar 5;4:29.

SESSION

PATHOLOGIE - PREVENTION

Communications orales

LE MICROBIOTE REGULE LA REPLICATION VIRALE ET LA REPONSE IMMUNITAIRE INNEE CHEZ DES CANARDS INFECTES PAR UN VIRUS INFLUENZA AVIAIRE HAUTEMENT PATHOGENE H5N9

Bessière Pierre¹, Figueroa Thomas¹, Coggon Amelia¹, Souvestre Marie¹, Robertet Luc¹, Delverdier Maxence¹ et Romain Volmer¹

(1) INRA-ENVT, UMR IHAP, 31076 Toulouse, France

p.bessiere@envt.fr

RÉSUMÉ

Alors que les poulets sont des hôtes réputés très sensibles pour les virus influenza aviaires, les canards développent rarement des signes cliniques suite à l'infection, même s'il s'agit d'un virus Influenza aviaire hautement pathogène. Le but de notre étude a été d'évaluer le rôle du microbiote intestinal (l'ensemble des micro-organismes présents dans l'intestin) dans le contrôle de la réplication des virus Influenza aviaires et de la réponse immunitaire innée chez le canard.

Nous avons analysé la réplication virale et la réponse immunitaire suite à une infection par un virus Influenza aviaire hautement pathogène H5N9 en comparant deux groupes de canards : un dont le microbiote intestinal a été significativement déplété par un traitement antibiotique à large spectre et un qui n'a pas reçu de traitement.

Des cultures bactériennes de fientes et une PCR quantitative ciblant le gène bactérien de l'ARN 16S ont montré une sévère déplétion du microbiote intestinal suite au traitement antibiotique. L'analyse de la réplication virale a montré que les animaux traités aux antibiotiques avaient une excrétion virale cloacale significativement plus élevée à 3 et 5 jours post-infection. A l'inverse, aucune différence n'a été décelée pour l'excrétion trachéale.

Les animaux infectés présentaient, par rapport aux animaux non infectés, une réponse interféron de type 1 dans le poumon. Cette réponse, modérée, était significativement plus élevée chez les animaux traités aux antibiotiques. Dans l'intestin, les animaux traités aux antibiotiques présentaient une diminution significative de l'expression des gènes stimulés par les interférons, possiblement à l'origine d'une augmentation de la réplication virale au niveau intestinal chez ces animaux.

Nos résultats montrent que le microbiote intestinal peut moduler la réponse antivirale innée chez le canard et la réplication virale. Des analyses en cours cherchent à déterminer si la déplétion du microbiote intestinal pourrait rendre les canards plus sensibles à l'infection par d'autres virus influenza aviaires hautement pathogènes.

ABSTRACT

While chickens are highly sensitive to the infection with avian Influenza A viruses, ducks seldom show clinical signs, even when infected with a highly pathogenic avian Influenza virus (HPAIV). The aim of this study was to determine if the gut microbiota (the community of microorganisms that live in the intestine) could contribute to the control of highly pathogenic avian Influenza virus replication and to the innate immune response in ducks.

Viral replication and innate immune response following infection with an H5N9 HPAIV were analysed in two groups of ducks: one with a depleted gut microbiota due to an antibiotic treatment, and a control group. Stool cultures and real-time PCR from stool targeting the 16s ribosomal RNA gene showed a significant reduction of the bacteria populations in the antibiotics-treated animals. In antibiotics-treated animals, cloacal virus shedding was higher at days 3 and 5 post infection, but there was no difference in the tracheal shedding.

Regarding the innate immune response, the infection led to a type I interferon response in the lung, which was higher in antibiotics-treated animals. The gut immune response was lower in the antibiotics-treated animals, which could explain the higher virus shedding.

Our results show that the gut microbiota can regulate virus replication and the innate immune response in ducks. Ongoing analyses will determine if the depletion of the microbiota could render ducks more sensitive to other HPAIV infection.

INTRODUCTION

La France a été frappée pendant deux années successives par des épizooties à virus influenza aviaire hautement pathogène (VIAHP), entraînant des pertes économiques majeures dans la filière avicole et causant un risque potentiel pour la santé humaine (Briand et al., 2017). Les oiseaux aquatiques sont considérés comme étant le réservoir des virus influenza aviaires faiblement pathogènes (VIAFP), à partir desquels les VIAHP peuvent émerger. Les canards portent, de manière généralement asymptomatique, les VIAFP dans leur tube digestif, l'infection n'entraînant qu'une faible réponse immunitaire, voire pas de réponse du tout. En revanche, les poulets sont extrêmement sensibles à la maladie : l'infection par un VIAFP entraîne une réponse immunitaire tardive et intense, et une mortalité pouvant être importante (Alexander et al., 1986; Burggraaf et al., 2014).

Plusieurs études ont démontré l'implication du microbiote dans le fonctionnement du système immunitaire et la régulation des infections virales, notamment pour les virus influenza. Le microbiote aurait un rôle protecteur reposant sur plusieurs aspects : par exemple, un effet de barrière physique (Yang et al., 2014), ou encore, un rôle de stimulateur à bas bruit du système immunitaire, permettant à ce dernier de réagir de manière précoce en cas d'infection (Abt et al., 2012; Iwasaki and Pillai, 2014).

Nous avons donc investigué le rôle potentiel du microbiote intestinal dans la régulation d'une infection par un virus influenza aviaire hautement pathogène chez le canard.

MATERIEL ET METHODES

Elevage des animaux et déplétion du microbiote

Des canards Pékin ont été élevés jusqu'à l'âge de deux semaines en animalerie confinée de niveau 2, puis placés en isolateur dans une animalerie confinée de niveau 3. Ils ont été répartis en quatre groupes : non infectés et non traités aux antibiotiques (NI/NT, 6 animaux) ; non infectés et traités aux antibiotiques (NI/ABX, 6 animaux) ; infectés et non traités aux antibiotiques (I/NT, 12 animaux) ; infectés et traités aux antibiotiques (I/ABX, 12 animaux).

Le traitement antibiotique et antifongique suivant a alors été entrepris pendant deux semaines, puis poursuivi pendant la période d'infection, via l'eau de boisson : vancomycine (225 mg/L), néomycine (860 mg/L), métronidazole (560 mg/L), amphotéricine-B (6 mg/L), ampicilline (10 g/L) et colistine (2 g/L).

Infection des animaux et prélèvements

Après vérification du statut sérologique négatif des animaux vis-à-vis des virus influenza, grâce à un test ELISA, les canards des groupes I/NT et I/ABX ont été infectés par voies oculaire et naso-trachéale avec $3,6 \cdot 10^6$ EID₅₀ de virus hautement pathogène A/Guinea Fowl/France/129/2015(H5N9), un VIAHP de lignée européenne.

Des écouvillons cloacaux et trachéaux ont été réalisés aux jours 1, 3, 5 et 7 post infection. Des autopsies ont également été réalisées aux jours 3 et 7 pour les animaux infectés, et jour 4 pour les animaux non infectés, avec prélèvement d'intestin (intestin grêle caecum et côlon), de poumon, de trachée, de rate et de cerveau, dans du formol 10% ou dans du TRIzol reagent (Invitrogen). Des fientes ont été prélevées avant d'entreprendre le traitement antibiotique et la veille de l'infection.

Cultures de fientes en milieu liquide

Pour chaque animal, 0,5 g de fientes ont été prélevées, diluées dans 100 µL de PBS stérile, puis centrifugées 5 min à 500 g. Les surnageants ont ensuite été dilués en série au 1/10^{ème} dans du milieu de culture riche (bouillon cœur-cerveille) etensemencés en plaque 96 puits. La dilution la plus forte ayant permis une pousse bactérienne était notée au bout de 24h d'incubation à 37 °C et le nombre de bactéries aérobies cultivables par gramme était alors estimé (Simon et al., 2016).

Extractions d'ARN, d'ADN et PCR quantitative en temps réel

L'extraction d'ADN à partir des fientes a été réalisée avec le kit PureLink Microbiome DNA purification (ThermoFischer) en suivant les indications du fabricant. L'extraction de l'ARN viral à partir des écouvillons cloacaux et trachéaux a été réalisée avec le kit QIAamp Viral RNA (Qiagen) selon le protocole du fabricant. L'extraction d'ARN à partir des échantillons d'organes dans du TRIzol reagent (Invitrogen) a été réalisée avec le kit NuclioSpin RNA (Macherey-Nagel) selon le protocole du fabricant.

La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) à partir des ARN extraits des organes a été réalisée par rétrotranscription de 500 ng d'ARN en utilisant un mélange d'oligo(dT)18 et de d'hexamères aléatoires, en suivant le protocole du fabricant (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Invitrogen).

Les PCR quantitatives (qPCR) à partir des ADNc issus des tissus ont été réalisées avec le kit QuantiFast SYBR Green PCR (Qiagen) dans un volume final de 5 µL, en suivant les instructions du fabricant. Les PCR quantitatives avec rétrotranscription (RT-qPCR) à partir des ARN issus des écouvillons trachéaux et cloacaux ont été réalisées avec le kit QuantiNova SYBR Green OneStep (Qiagen) dans un volume final

de 10 µL en suivant les instructions du fabricant. Enfin, les qPCR à partir des ADN bactériens issus des fientes ont été réalisées à l'aide du kit QuantiFast SYBR Green (Qiagen), dans un volume final de 20 µL, en suivant les instructions du fabricant. Les résultats de ces dernières ont été normalisés par rapport à quatre gènes de ménage (RPL4, SDHA, RPL30 et RPS13).

Histopathologie, immuno-histochimie et fluorescence *in-situ*

Un examen post-mortem a été réalisé sur tous les animaux. Les prélèvements de trachée, poumons, iléon, caecum, côlon et cerveau, conservés dans du formol 10%, ont été inclus en paraffine, sectionnés avec une épaisseur de coupe de 4 µm, puis colorés avec de l'hémalum-éosine.

Un immuno-marquage a été réalisé sur les échantillons de poumon avec un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la nucléoprotéine des virus influenza A (Argene).

De la fluorescence *in situ* a été réalisée sur les échantillons d'iléon avec une sonde ciblant l'ARN ribosomique bactérien 16S, comme décrit par Elderman et al., 2017.

Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism v5.01, en utilisant le test Mann Withney (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001). Les barres d'erreur représentent l'erreur type.

RESULTATS

Suivi clinique des animaux

Les animaux n'ont pas présenté de symptôme tout au long de la période d'infection. Le traitement aux antibiotiques n'a pas eu de répercussion sur l'état général des animaux : notamment, aucun trouble digestif n'a été observé.

Déplétion du microbiote par les antibiotiques

L'efficacité du traitement antibiotique sur la déplétion du microbiote intestinal a été vérifiée la veille de l'infection, après 15 jours de traitement. Tous les animaux traités aux antibiotiques ont montré une très forte diminution de la charge bactérienne, cette dernière ayant été déterminée par une qPCR ciblant le gène bactérien de l'ARN ribosomique 16S (figure 1A) et par dilutions successives de fientes en milieu liquide (figure 1B).

Une vérification supplémentaire a été réalisée *a posteriori* en réalisant de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur des coupes d'iléon en utilisant une sonde dirigée contre le gène bactérien de l'ARN ribosomique 16S et couplée à un fluorochrome.

Aucune bactérie n'a été visualisée sur les coupes d'intestin correspondant aux animaux traités aux antibiotiques, tandis qu'une fluorescence spécifique était visible chez les animaux non traités (figure 2).

Excrétion virale

L'excrétion virale a été déterminée par RT-qPCR sur les ARN obtenus à partir des écouvillons trachéaux et cloacaux (figure 3). Une plus forte excrétion cloacale aux jours 3 et 5 post-infection (jpi) a été mise en évidence chez les animaux traités aux antibiotiques, particulièrement à 3jpi avec un facteur 100 entre les deux groupes. L'excrétion trachéale des animaux traités n'était pas significativement différente de celle des animaux non traités.

Des qPCR ont également été réalisées sur les ADNc obtenus à partir des prélèvements de rate et de cerveau. La présence de virus a été mise en évidence dans ces organes, comme attendu pour un VIAHP (données non présentées).

Réponse immunitaire innée anti-virale

Dans le poumon, l'infection par le virus H5N9 hautement pathogène a donné lieu à une augmentation de l'expression des interférons de type 1 et des gènes stimulés par les interférons (GSI), comme IFIT-5. L'expression de ces derniers était significativement augmentée à 7jpi chez les animaux traités aux antibiotiques (figures 4A et 4B).

En revanche, dans l'intestin, l'infection n'a pas donné lieu à une augmentation de la production d'interféron de type 1, dans un groupe comme dans l'autre. Cependant, l'expression des GSI était significativement diminuée chez les animaux traités aux antibiotiques à 3jpi (figures 4C et 4D).

Histopathologie, immuno-histo-chimie

Les lésions histopathologiques ont été observées dans la trachée et les bronches, avec des lésions subaiguës de trachéite et de bronchite diffuses à multifocales. Les lésions de trachéite étaient caractérisées par exemple par une perte de la ciliature, de la nécrose focale avec exfoliation de l'épithélium superficiel, ou encore, la présence de cellules inflammatoires. Celles de bronchite étaient caractérisées par une hyperplasie épithéliale régénérative et également par une infiltration par des cellules inflammatoires. Aucune différence dans la nature et l'intensité des lésions n'a été notée entre les groupes I/NT et I/ABX (données non présentées).

Le marquage par immuno-histo-chimie a révélé une quantité plus importante de virus dans les intestins des animaux traités aux antibiotiques, comparée aux animaux non traités. Le marquage a également montré une grande quantité de virus dans les poumons et les

trachées des animaux, sans qu'il n'y ait de différence entre les groupes (données non présentées).

DISCUSSION

Nous avons montré que, chez les animaux infectés par le virus influenza aviaire H5N9 hautement pathogène et traités préalablement aux antibiotiques, la réponse immunitaire innée était modérément augmentée dans les poumons, tandis qu'elle était diminuée dans l'intestin, quand bien même la réplication virale y était plus importante.

Des études s'intéressant à la régulation de l'infection par un virus influenza A en l'absence ou en la présence d'un microbiote ont montré la présence d'une réponse immunitaire diminuée et d'une réplication virale augmentée dans les poumons chez la souris (Abt et al., 2012) et dans l'intestin et le poumon chez le poulet (Yitbarek et al., 2018). Nos résultats montrent pour la première fois l'existence chez le canard d'une réponse immunitaire innée sur-régulée dans l'appareil respiratoire sans différence sur la réplication virale, et une réponse diminuée malgré une réplication virale augmentée dans l'intestin, suite à la déplétion du microbiote intestinal.

Notre principale hypothèse est que la déplétion du microbiote intestinal se traduit par une diminution de la réponse immunitaire innée anti-virale et que la perte du contrôle de la réplication virale qui en résulte mène ainsi à une augmentation de l'excrétion virale. Le microbiote intestinal pourrait maintenir une activité à bas bruit du système immunitaire, permettant à ce dernier de réagir de façon efficace et précoce lors d'une infection (Abt et al., 2012). Une étude a également montré l'implication du microbiote intestinal dans la régulation de la production d'anticorps, celle-ci débutant dans les premiers stades de l'infection (Kim and Kim, 2017).

Nous sommes actuellement en train d'investiguer les raisons ayant entraîné l'augmentation de la réponse immunitaire dans les poumons

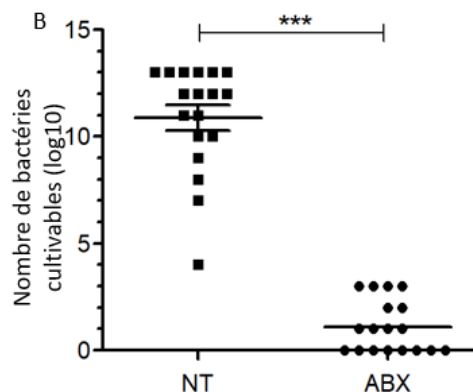
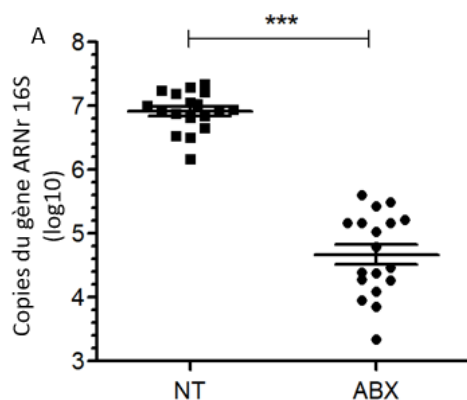


Figure 1 : Déplétion du microbiote intestinal par un traitement antibiotique à large spectre. NT : non traités. ABX : traités aux antibiotiques. A : qPCR ciblant la région V4-V5 de l'ARN ribosomique 16S bactérien. B : Nombre de bactéries aérobies cultivables par gramme de fiente.

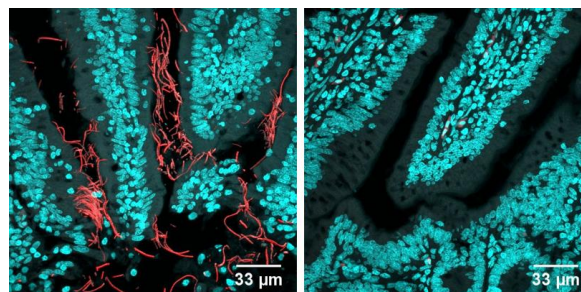


Figure 2 : Hybridation *in situ* en fluorescence ciblant le gène bactérien de l'ARN ribosomique 16S. Les bactéries apparaissent en rouge chez l'animal non traité aux antibiotiques (gauche) et ne sont pas visualisées chez l'animal traité aux antibiotiques (droite).

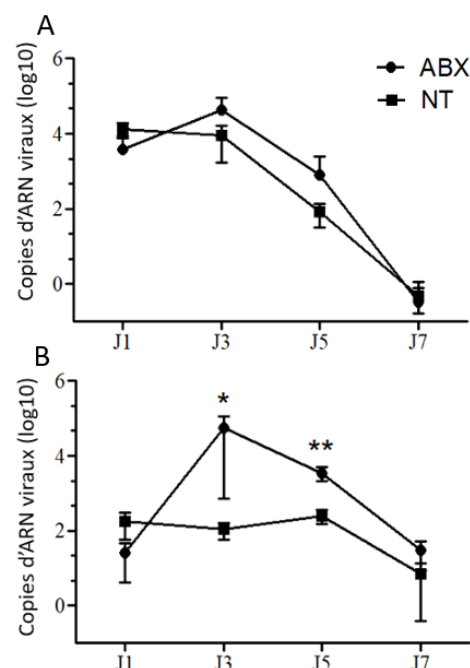


Figure 3 : Excrétion virale. A : Excrétion trachéale. B : Excrétion clocale.

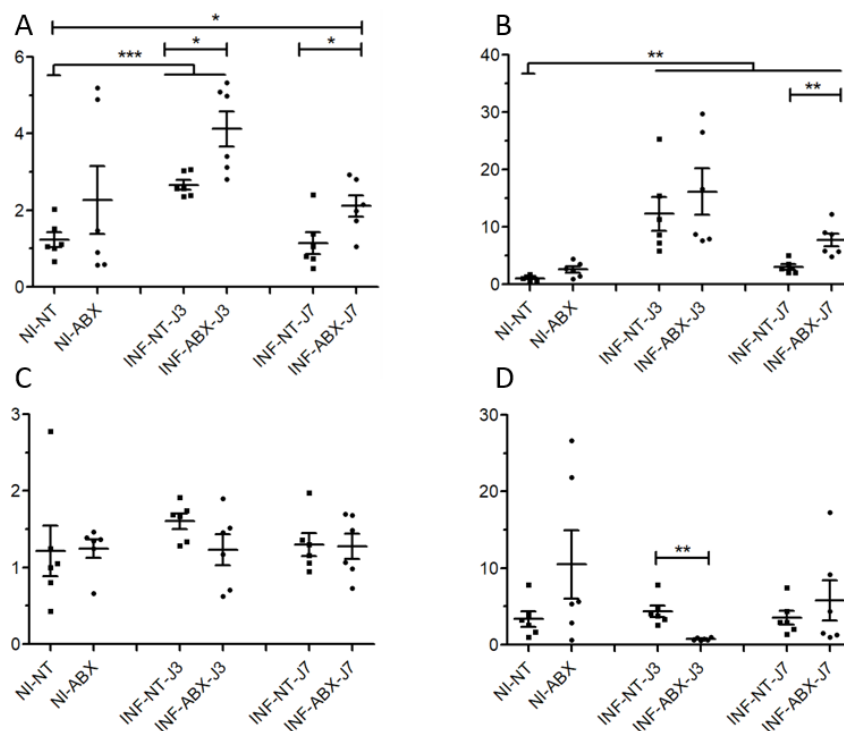


Figure 4 : Réponse immunitaire innée antivirale. A : interféron alpha dans le poumon. B : IFIT-5 dans le poumon. C : interféron alpha dans l'iléon. D : IFIT-5 dans l'iléon. Des résultats similaires ont été obtenus avec les GSI suivants : Mx1, ADAR1, OAS-L.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), la Chaire de biosécurité aviaire de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation et CIFO) et la région Occitanie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abt, M.C., Osborne, L.C., Monticelli, L.A., Doering, T.A., Alenghat, T., Sonnenberg, G.F., Paley, M.A., Antenus, M., Williams, K.L., Erikson, J., Wherry, E.J., Artis, D., 2012. *Immunity* 37, 158–170.
- Alexander, D.J., Parsons, G., Manvell, R.J., 1986. *Avian Pathology* 15, 647–662.
- Briand, F.-X., Schmitz, A., Ogor, K., Le Prioux, A., Guillou-Cloarec, C., Guillemoto, C., Allée, C., Le Bras, M.-O., Hirschaud, E., Quenault, H., Touzain, F., Cherbonnel-Pansart, M., Lemaitre, E., Courtillon, C., Gares, H., Daniel, P., Fediaevsky, A., Massin, P., Blanchard, Y., Eterradossi, N., van der Werf, S., Jestin, V., Niqueux, E., 2017. *Eurosurveillance* 22.
- Burggraaf, S., Karpala, A.J., Bingham, J., Lowther, S., Selleck, P., Kimpton, W., Bean, A.G.D., 2014. *Virus Research* 185, 23–31.
- Elderman, M., Sovran, B., Hugenholtz, F., Graversen, K., Huijskes, M., Houtsma, E., Belzer, C., Boekschoten, M., de Vos, P., Dekker, J., Wells, J., Faas, M., 2017. *PLOS ONE* 12, e0184274.
- Iwasaki, A., Pillai, P.S., 2014. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 315–328.
- Kim, M., Kim, C.H., 2017. *Gut Microbes* 8, 392–399.
- Simon, K., Verwoolde, M.B., Zhang, J., Smidt, H., de Vries Reilingh, G., Kemp, B., Lammers, A., 2016. *Poult Sci* 95, 1543–1554.
- Yang, X., Steukers, L., Forier, K., Xiong, R., Braeckmans, K., Reeth, K.V., Nauwynck, H., 2014. *PLOS ONE* 9, e110026.
- Yitbarek, A., Alkie, T., Taha-Abdelaziz, K., Astill, J., Rodriguez-Lecompte, J.C., Parkinson, J., Nagy, é., Sharif, S., 2018. *Beneficial Microbes* 1–12.

SESSION

PATHOLOGIE - PREVENTION

SESSION

PATHOLOGIE - PREVENTION

Communications orales

ANALYSE DU ROLE DES BASSES-COURS DANS LA DYNAMIQUE DE L'INFLUENZA AVIAIRE H5N8 EN FRANCE, 2016-2017

M. Souvestre¹, C. Guinat², E. Niqueux³, L. Robertet¹, G. Croville¹, M.C. Paul⁴, A. Schmitz³, A. Bronner⁵, N. Eterradossi³ et J.-L. Guérin⁴

¹ENVT, INRA, ENVT 23, chemin des Capelles, 31076 Toulouse, France

²Ecole Nationale Veterinaire de Toulouse, UMR ENVT-INRA 1225 IHAP, 23, 31076 Toulouse, France

³Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzanné - BP53, 22440 Ploufragan, France

⁴UMR ENVT-INRA 1225 IHAP, 23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse, France

⁵Direction Générale de l'Alimentation, 251 rue de Vaugirard, 75015 Paris, France

jl.guerin@envt.fr

RÉSUMÉ

De nombreux foyers d'influenza aviaire hautement pathogène (VIAHP) de sous-type H5N8 ont été décrits en Europe au cours de l'année 2016-2017. En France, 484 cas d'influenza H5N8 furent déclarés entre le 28 novembre 2016 et le 23 mars 2017, 20 d'entre eux concernant des élevages non-commerciaux. Afin d'évaluer le rôle des basses-cours dans la dynamique de transmission du virus, 70 d'entre-elles ont été enquêtées dans un rayon de 1 km autour des foyers H5N8. La biosécurité, le statut virologique et sérologique vis-à-vis de l'influenza A et du sous-type H5 ont été étudiés. La séroprévalence des basses-cours a été estimée à 25,7% pour l'influenza aviaire et 11,4% pour le sous-type H5. Des volailles séropositives vis-à-vis du virus H5N8 ont été détectées par la méthode IHA dans une seule basse-cour. Toutefois, les basses-cours possédant des palmipèdes ont été deux fois plus à risque vis-à-vis de l'influenza aviaire et 6 fois plus à risque vis-à-vis du sous-type H5. Aussi, il a été montré que les basses-cours ayant un lien avec les élevages commerciaux ont été plus à risque que celles n'ayant aucun lien épidémiologique avec ceux-ci. Ce risque a été évalué comme 6 fois plus élevé pour la séropositivité vis-à-vis de l'influenza aviaire et 20 fois plus élevé vis-à-vis du sous-type H5. Ces résultats indiquent que les basses-cours semblent avoir joué un rôle limité dans la dissémination du virus IAHP H5N8 entre les élevages commerciaux de volailles lors de l'épidémie 2016-2017. Toutefois ces deux facteurs semblent être des risques déterminants de contamination des basses-cours. Une évaluation fine des liens entre élevages commerciaux et non-commerciaux permettra d'émettre des recommandations pour contribuer à la biosécurité des filières avicoles.

ABSTRACT

Role of backyard flocks in the transmission dynamics of H5N8 Highly Pathogenic Avian Influenza, France, 2016-2017

In 2016-2017, major outbreaks of Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) occurred in Europe. From November 28, 2016 to March 23, 2017, 484 HPAI poultry outbreaks associated with the H5N8 virus were reported in France. While most outbreaks occurred in commercial flocks (n=464), 20 backyard flocks were also affected. In order to assess the role of backyard flocks in the transmission dynamics of the virus, 70 backyard flocks were investigated within a 1km radius from HPAI H5N8 commercial outbreaks. Biosecurity practices, virological and serological status were studied. The overall flock-level seroprevalence was estimated at 25.7% for avian influenza virus (AIV) and 11.4% for H5. Among H5-seropositive backyard flocks, only one showed HPAI-H5N8 antibodies. It has also been shown that backyard flocks including ducks were twice more likely to be AIV positive and six times more likely to be H5 positive than those having only chickens. Also, backyard flocks located on, or in close connection with, a commercial poultry farm were significantly six times more likely to be AIV positive and twenty times more likely to be H5 positive. High flock- and bird-level seroprevalences of AIV were evidenced in backyard flocks sampled after the 2016-2017 H5N8 epidemic. However, a very limited circulation of the H5N8 subtype was observed, highlighting the minor role of backyard flocks in the transmission dynamics of H5N8 in France. The two identified risk factors for infection in backyard flocks surrounding commercial farms affected by HPAI-H5N8 during the 2016-2017 epidemic seemed to be determinant in the dynamic of backyard flocks' infection and give the opportunity to issue practical recommendations to ensure biosecurity measures within the poultry industry.

INTRODUCTION

Au cours des deux dernières années, de nombreux foyers d'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) ont été déclarés en Europe et en France impactant sévèrement l'industrie avicole (Briand et al., 2017; Guinat et al., *in press.*). Du 28 novembre 2016 au 23 Mars 2017, le virus de clade 2.3.4.4 assimilé au virus H5N8 a été identifié dans 484 foyers dans le Sud-Ouest de la France (Guinat et al., *in press.*). Parmi les 484 foyers, une vingtaine d'entre eux ont été des élevages non commerciaux considérés comme étant des basses-cours. Peu de données ont été collectées concernant les basses-cours en contexte de crise mais celles-ci sont en général considérées comme à risque vis-à-vis de l'influenza aviaire de par leur contact étroit avec la faune sauvage ainsi que par leur possible proximité géographique à ces élevages foyers. L'objectif de notre étude a été de quantifier la séroprévalence des basses-cours présentes dans un rayon de 1km autour des élevages commerciaux positifs en IAHP H5N8 en 2016-2017 vis-à-vis des virus de l'influenza aviaire (VIA) et du sous-type H5 ainsi que de réaliser une étude des facteurs de risque.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1 Plan d'échantillonnage

Les enquêtes ont été effectuées dans 39 communes du Gers où il a été identifié 169 basses-cours dans un rayon de 1km autour des élevages commerciaux foyers. Etant donné le risque associé à la détention de palmipèdes en regard de la circulation du virus, il a été enquêté en priorité les basses-cours détenant plusieurs espèces (poules, poulets, canards et oies) indépendamment de l'effectif ainsi que les basses-cours détenant des galliformes ayant un effectif de plus de 10 sujets. Au total, 70 basses-cours ont été enquêtées et prélevées entre le 31 mars 2017 et le 10 mai 2017 (Figure 1). Ont été prélevé en priorité les palmipèdes et ce jusqu'à 10 individus par basse-cour. Des écouvillons trachéaux et cloacaux ont été réalisés ainsi que des prises de sang à la veine alaire. Les échantillons ont été transportés sous-couvert du froid au laboratoire de virologie de l'ENVT et conservés à -80°C pour les écouvillons et -20°C pour les sérums.

1.2 Enquête épidémiologique

Un questionnaire de 28 questions concernant les pratiques, les mouvements d'animaux et les liens éventuels avec les élevages avicoles a été réalisé dans chaque basse-cour. Des statistiques descriptives ont été effectuées afin d'estimer la séroprévalence des VIA, du sous-type H5 et des pratiques des propriétaires. Une analyse multivariée a permis d'investiguer les facteurs de risques associés à la séroprévalence (VIA et H5).

Les associations ont d'abord été testées deux à deux à l'aide d'un test du Chi-deux ou de Fisher (Tableau 1). Les variables explicatives ayant une p-valeur inférieure à 0.2 ont été intégrées dans le modèle multivarié. Les variables explicatives ont été considérées significatives si la valeur de $p < 0.05$. Toutes les analyses ont été faites sur le logiciel R (version 3.4.1).

1.3 Examens sérologiques

Tous les oiseaux ont été testés à l'aide de la méthode ELISA en utilisant des kits ELISA FLUACA – Influenza A (ID Screen® Influenza A Antibody Competition Multi-species, IdVet). Par la suite, pour tous les oiseaux positifs vis-à-vis de l'influenza A, il a été effectué des sérologies avec le kit H5 (ID Screen® Influenza H5 Antibody Competition, IdVet) pour recherche des anticorps spécifiques des virus H5.

Sous couvert de la DGAL, les sérums des volailles appartenant à une basse-cour détenant au moins un animal séropositif ou douteux en ELISA H5 ont été transmis au LNR pour des analyses sérologiques complémentaires IHA H5 selon la norme NF U47-036-2 et en utilisant différents couples d'antigènes spécifiques de virus H5 du clade 2.3.4.4 : H5N8 A/decoyduck/France/161105a/2016 et H5N5 A/muteswan/ Croatia/102/2016 pour le H5N8, et H5N3 A/muscovy duck/France/070090b/2007 et H5N2 A/chicken/France/03426a/2003 pour les autres lignées européennes (OIE,2015).

1.4 Examens virologiques

Les écouvillons trachéaux et cloacaux ont été placés dans des tubes Eppendorf remplis de 500µL de solution PBS. Ils ont été placés une nuit en chambre froide puis centrifugés avant extraction. L'extraction d'ARN à partir du liquide obtenu a été réalisée avec le kit NucleoSpin® RNA Virus (Macherey Nagel) en suivant les indications du fabricant. Les PCR quantitatives en temps réel (qRT-PCR) à partir des ARN issus des écouvillons ont été réalisées en duplicats dans des plaques 96 puits à l'aide du kit iTaq Universal SYBR® Green One Step kit (Bio-rad) dans un volume final de 10 µL en suivant les instructions du fabricant.

Dans un premier temps, la recherche des VIA a été réalisée sur toutes les basses-cours en mélange (pools de 5 animaux) par amplification du gène M (amorces M52C et M253R) (Fouchier et al., 2000)

Aussi, tous les animaux des basses-cours ayant eu au moins un animal séropositif vis-à-vis de l'IA H5 ont été testés individuellement en qRT-PCR pour le sous-type H5 à partir des écouvillons trachéaux et cloacaux. Les amorces H5_kha1 et H5_kha2 ont été utilisées (Pérez et al., 2012).

2. RESULTATS

2.1 Epidémiologie descriptive

Les basses-cours étudiées ont un effectif moyen de 17 animaux par basse-cour, en moyenne une basse-cour présente 14 galliformes, 2 canards et 1 oie. Les basses-cours présentes dans cette étude existent depuis longtemps (59% des basses-cours existent depuis plus de 30 ans). 17% des basses-cours ont un lien étroit avec la filière commerciale (éleveur sur site ou dans le foyer, personnel d'abattoir ou autre prestataire de la filière) et 7% des propriétaires pratiquent l'entraide au sein d'élevages avicoles commerciaux.

On observe que 97% des propriétaires n'ont pas de tenues spécifiques, 83% ne changent pas de chaussures, 33% ne se lavent pas les mains avant ou après la visite de la basse-cour. Il s'agit d'une population peut médicalisée (1 propriétaire a rencontré le vétérinaire de façon exceptionnelle) où peu de signes cliniques et de mortalité ont été décrits (Tableau 1).

2.2 Résultats de PCR quantitative temps réel

Toutes les basses-cours ont été négatives lors de la recherche des VIA par PCR. Tous les écouvillons trachéaux et cloacaux issus des basses-cours séropositives vis-à-vis du sous-type H5 ont été négatives vis-à-vis de l'influenza H5.

2.3 Résultats sérologiques ELISA et IHA

La séroprévalence à l'échelle des basses-cours a été estimée à 25,7% (95% IC : 16.9-37.0) vis-à-vis des VIA et 11,4% vis-à-vis du sous-type H5 (Tableau 2). La séroprévalence à l'échelle individuelle a été estimée à 5,9% (95% IC : 4.3-8.1) pour les VIA et 3,3% (95% IC : 2.1-5.0) pour le virus H5. On note une prévalence plus élevée chez les canards que chez les galliformes. Chez les canards la prévalence s'élève à 13,1% (95% IC : 8.24-20.24) pour les VIA et à 9,0% (95% IC : 5.11-15.43) pour le sous-type H5 alors qu'elle est chez les galliformes de 4,1% (95% IC : 2.68-6.27) pour les VIA et de 1,9% (95% IC : 0.98-3.48) pour le sous-type H5. Le test d'inhibition d'hémagglutination (IHA) nous montre que, parmi les 8 basses-cours séropositives vis-à-vis du sous-type H5, seulement une d'entre-elle possède des titres en anticorps élevé vis-à-vis d'un virus de la lignée de clade 2.3.4.4 pouvant s'apparenter au virus H5N8 circulant à cette période. La propriétaire travaillait dans une conserverie de volailles. Trois autres basses-cours possèdent des titres élevés évoquant la circulation de virus de lignées eurasiennes proches des souches H5N2, H5N3 ayant circulées en 2015 en France.

2.4 Facteurs de risques associés au statut sérologique

Il a été montré que les basses-cours détenant des palmipèdes étaient plus à risque d'être séropositives

vis-à-vis des VIA (OR = 2.3, 95% IC : 1.1-5.1) et du sous-type H5 (OR = 5.7, 95% IC : 1.6-30.6) que les basses-cours détenant seulement des galliformes (Tableau 3). Ces résultats renforcent plusieurs études soulignant le rôle des canards dans l'excrétion et la transmission du virus (Briand et al., 2017)

Le second facteur de risque associé à une augmentation de la séroprévalence des basses-cours est le « lien humain » que présentaient celles-ci avec les élevages commerciaux. En effet, le lien a été objectivé par la description de l'implication du propriétaire ou de l'un des membres du foyer dans la filière commerciale avicole (basses-cours d'éleveurs ou de parents d'éleveurs par exemple). Ainsi, les basses-cours localisées sur les sites de production et détenues par des éleveurs ou celles en connexion étroite à un élevage commercial ont montré un sur-risque significatif pour les VIA (OR = 6.0, 95% IC : 1.5-24.5) et pour le sous-type H5 (OR = 20.5, 95% IC : 3.2-215.8) (Tableau 3).

3. DISCUSSION

Dans le cadre de la circulation du virus H5N8 de l'année 2016-2017, il semblerait que les basses-cours n'aient joué qu'un rôle mineur dans la dynamique de dissémination du virus.

Dans notre étude, une attention particulière a été portée sur les basses-cours détenant des palmipèdes de par leur risque additionnel décrit dans la circulation des VIA (Briand et al., 2017). Ainsi, notre étude a surreprésenté les basses-cours de ce type, surestimant ainsi les séroprévalences décrites.

A ce jour, la proximité géographique des élevages commerciaux n'a pas été considérée comme un facteur de risque, malgré la transmission par voie aérosol (Power, C., 2005; Thomas et al., 2005). Les résultats (une seule unité séropositive pour les virus H5 de clade 2.3.4.4, dont le détenteur travaillait dans une conserverie de volailles sur un total de 70 prélevées, dans un contexte de très forte proximité avec des foyers IAHP H5N8 confirmés et récents) sont en défaveur d'une diffusion majeure du virus H5N8 par voie aérosol au-delà de quelques centaines de mètres de distance. En effet, le sur-risque concerne donc les basses-cours en lien avec la filière avicole commerciale et ce lien n'est pas toujours évident. Une étude souligne l'importance du lien humain dans la transmission d'agents pathogènes (Alexander, 2007) par contacts directs ou indirects, entre personnes ou par le partage d'équipement (CFIA Canada, 2005).

Toutefois, les basses-cours pourraient jouer aussi un rôle de « réservoir » vis-à-vis de certains agents pathogènes persistants (Pohjola et al., 2017). La suite de l'étude consiste à investiguer la présence d'autres agents pathogènes d'intérêt majeur pour la santé et l'économie des filières avicoles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- OIE World Organisation for Animal Health, 2015. In: Avian influenza (infection with avian influenza viruses): Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, OIE, Chapter 2.3.4.
- Alexander, D.J., 2007. Vaccine, (25), 5637–5644.
- Briand F-X, Schmitz A, 2017. Euro Surveill., (9), 22
- Guinat C, Nicolas G, *In press* 2018. Eurosurveillance.
- CFIA, 2005, Canada's Experiences with Avian Influenza (AI).
- Fouchier, R.A.M., Bestebroer, T.M., 2000. J Clin Microbiol (38), 4096–4101.
- Pérez, L.J., Díaz de Arce, H, 2012. Molecular and Cellular Probes (26), 137–145.
- Pohjola, L., Tammiranta, N, 2017. Avian Pathology (46), 166–172.
- Power, C., 2005. Animal Disease Surveillance Unit Canadian Food Inspection Agency.
- Thomas, M.E., Bouma, A., 2005. Preventive Veterinary Medicine (69), 1–11.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans le cadre de la Chaire de Biosécurité aviaire (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation – DGAL et CIFO). Nous remercions la DDPP32, les maires des communes du Gers, les éleveurs des foyers, les propriétaires des basses-cours, et les étudiants de l'ENVT pour leur collaboration et travail réalisé.

Figure 1 : Département du Gers et répartition géographique des foyers et des basses-cours investiguées

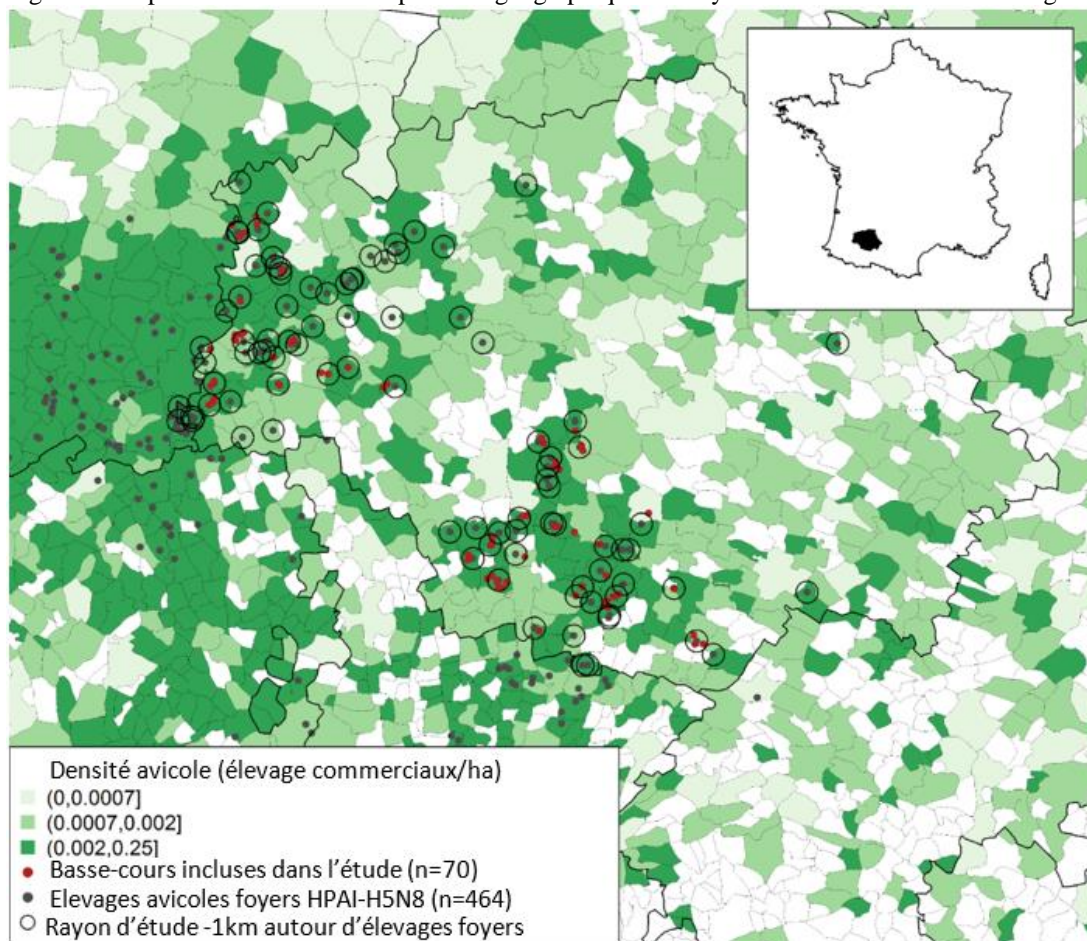


Tableau 1 : Variables descriptives étudiées dans le cadre de l'enquête des pratiques de biosécurité

Variable	Description	Basse-cour, % (proportion)	P-value chi-squared or Fischer test AIA	P-value chi- squared or Fischer test AIH5
Espèce	Basses-cours avec palmipèdes*	31 (22/70)	0.019*	0.025*
Parcours extérieur	Access à un parcours extérieur délimité	76 (53/70)	1.00	1.00
Basse-cour couverte	Couverture du poulailler et parcours	19 (13/70)	0.19	0.19
Protection de l'alimentation	Distribution eau/aliment dans un endroit couvert	57 (40/70)	0.28	0.46
Changement de conduite	Modification des pratiques de biosécurité suite aux premiers cas d'IA dans le Sud-Ouest	37 (26/70)	0.38	0.70
Tenue	Absence de tenue spécifique pour l'entretien de la basse-cour	97 (68/70)	1.00	1.00
Chaussures	Absence de chaussures spécifiques à l'entretien de la basse-cour	83 (58/70)	0.43	0.71
Lavage des mains	Absence de lavage des mains avant ou après la visite de la basse-cour	33 (23/70)	0.98	0.85
Introduction oiseau	Introduction d'un oiseau sur la dernière année	73 (51/70)	0.92	0.70
Vente/don	Vente ou don d'oeufs à famille ou voisin	74 (52/70)	0.51	0.51
Ancienneté basse-cour	Propriétaires de basse-cour depuis plus de 30 ans	59 (41/70)	0.15	0.33
Visite foire avicole	Visite d'une exposition/foire avicole sur les 3 derniers mois	4 (3/70)	1.00	0.31
Lien avec la filière avicole	Activité professionnelle du propriétaire ou d'un des membres du foyer en lien avec l'industrie aviaire **	17 (12/70)	0.013**	0.008**
Entraide	Entraide auprès d'un éleveur de volailles	7 (5/70)	1.00	1.00
Chasse	Propriétaire ou membre de la famille chassant	31 (22/70)	0.93	0.42
Proximité autre basse-cour	D'après le propriétaire, présence d'une basse-cour à proximité	74 (52/70)	1.00	1.00
Mortalité	Mortalité anormale au cours des 3 derniers mois	4 (3/70)	1.00	1.00
Signes cliniques palmipèdes	Signes cliniques sur les canards durant les 3 derniers mois	0 (0/70)	--	--
Signes cliniques gallus	Signes cliniques sur les poulets Durant les 3 derniers mois	6 (4/70)	1.00	1.00
Consultation vétérinaire	Visite vétérinaire au cours des 3 derniers mois	1 (1/70)	0.26	0.11

Tableau 2 : Séroprévalences de l'IA et du sous-type H5 à l'échelle des basses-cours et à l'échelle individuelle

	IA		H5	
	Proportion	Prevalence [95% IC]	Proportion	Prevalence [95% IC]
Basses-cours totales	18/70	25.7 [16.93-37.03]	8/70	11.4 [5.91-20.96]
Basses-cours gallus	9/48	18.8 [10.19-31.94]	2/48	4.2 [1.15-13.97]
Basses-cours avec palmipèdes	9/22	40.9 [23.26-61.26]	6/22	27.3 [13.15-48.15]
Tout oiseaux	36/608	5.9 [4.31-8.09]	20/608	3.3 [2.14-5.03]
Poules/poulets	20/486	4.1 [2.68-6.27]	9/486	1.9 [0.98-3.48]
Canards	16/122	13.1[8.24-20.24]	11/122	9.0 [5.11-15.43]

Tableau 3 : Variables explicatives significatives vis-à-vis du risque de séropositivité IA et H5

Variable	Variable explicative	Description	Odds Ratio	95% CI	P-value
AIA	Espèce	Basses-cours avec palmipèdes	2.3	1.1-5.1	0.036
	Lien avec industrie avicole	Activité professionnelle du propriétaire ou d'un des membres du foyer en lien avec l'industrie aviaire	5.8	1.5-24.5	0.011

ÉMERGENCE DE RÉOVIRUS AVIAIRES ASSOCIÉS AUX TÉNOSYNOVITES DANS LES FILIÈRES POULET LABEL EN FRANCE

**Guillaume Croville, Mattias Delpont, Jessica Genin, Luc Robertet, Maxence Delverdier,
Marie-Noëlle Lucas, Jean-Luc Guerin**

¹*Université de Toulouse, ENVT, INRA, UMR IHAP, 31076 Toulouse, France*
g.croville@envt.fr et jl.guerin@envt.fr

RÉSUMÉ

Les réovirus aviaires sont responsables de différentes maladies chez le poulet dont l'une des plus caractérisée est la ténosynovite virale. La ténosynovite virale est une entité émergente des poulets de chair, entraînant des pertes économiques considérables dans le monde entier. De nombreux variants, appelées génotypes, émergent et remettent en cause l'efficacité des vaccins commerciaux.

En 2016, une nouvelle émergence s'est produite chez les poulets de chair label dans le Sud-Ouest de la France et 34 cas ont été inclus dans une enquête de terrain.

Les 11 troupeaux atteints présentaient une incidence de boiteries modérée à très élevée, atteignant entre 50 et 100% des oiseaux et apparaissant dès l'âge de trois à quatre semaines. Les oiseaux affectés présentaient un gonflement mono- ou bilatéral du tendon gastrocnémien. Le tableau histopathologique a confirmé la suspicion pathologique de ténosynovite d'étiologie virale. Aucune autre lésion macroscopique n'a pu être observée sur les oiseaux affectés. Sur les 34 cas inclus dans l'enquête, 15 virus ont pu être isolés, dont huit avec un effet cytopathogène et leur gène *sigma C* a été séquencé. Trois isolats viraux appartiennent au génotype 1 et 12 au génotype 4. Les 12 virus de génotype 4 sont très proches génétiquement. L'analyse ciblée de la structure de six sites épitopiques de *sigma C* a confirmé une très forte divergence avec les souches vaccinales de génotype 1, ce qui confirme un défaut de protection croisée conférée par les vaccins commerciaux.

ABSTRACT

Avian reovirus outbreak associated with tenosynovitis in the French Label certified poultry production.

Avian reoviruses are responsible for various diseases in chicken, one of the most studied being viral tenosynovitis. Viral tenosynovitis is an emerging condition in broilers, causing significant economic losses worldwide. Many variants, referred to as genotypes, are emerging around the world and are challenging the effectiveness of commercial vaccines.

In 2016, a new emergence occurred in label broilers in south-west France and 34 cases were included in a field survey.

The 11 affected herds had a moderate to very high incidence of lameness, reaching nearly 50 to 100% of the birds and appearing as early as 3 to 4 weeks of age. Affected birds showed mono- or bilateral swelling of the gastrocnemius tendon. Histopathology confirmed the pathological suspicion of tenosynovitis of viral etiology. No other macroscopic lesions could be observed on the affected birds. Of the 34 cases included in the survey, 15 viruses were isolated, 8 with cytopathic effect and their *sigma C* gene were sequenced. Three viral isolates belong to genotype 1 and 12 to genotype 4. The 12 genotype 4 viruses are very closely related on the basis of their genetic sequences. Targeted analysis of the structure of 6 *sigma C* epitopic sites confirmed a very strong divergence with genotype 1 vaccine strains, confirming an expected lack of cross-protection conferred by commercial vaccines.

INTRODUCTION

Les virus impliqués dans la réovirose aviaire font partie de la famille des *Reoviridae* (appelés plus communément Réovirus), genre *Orthoreovirus* (1). Les réovirus sont des virus non-enveloppés à génome segmenté à ARN double-brin, possédant une capsid icosaédrique comportant deux ou trois couches protéiques. La traduction du génome des réovirus aviaires conduit à la formation de 12 produits :

- huit protéines de structure du virus : elles seront parties intégrantes de la descendance virale
- quatre autres protéines, dites non-structurales : elles sont retrouvées dans les cellules infectées mais pas dans les virions matures (2). Les protéines codées à partir des 10 fragments de génome L, M et S sont respectivement nommées λ , μ , σ . Une lettre est ensuite assignée à chaque protéine en fonction de sa capacité de migration sur gel d'électrophorèse, inversement à l'ordre alphabétique.

Cette étude s'est focalisée sur l'apparition de nouveaux réovirus de génotype 1 et 4 dans le Sud-Ouest de la France.

La population ciblée pour l'étude est la filière *Gallus* sous signe de qualité, qui correspond à des individus particulièrement à risque pour la réovirose, pour deux raisons :

- Les poulets Label Rouge sont élevés sur une période plus longue que des poulets standards (respectivement 81-84 jours contre 39-42 jours). Cet itinéraire technique favorise l'installation des lésions de ténosynovites, qui apparaissent au bout de quelques semaines d'évolution.

- Le poids constitue également un facteur de risque : les contraintes mécaniques exercées sur les tendons déjà fragilisés par l'inflammation peuvent aggraver les lésions et conduire à la rupture tendineuse.

Dans d'autres contextes, des poulets lourds, voire standards peuvent également être affectés.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Critères d'inclusion des élevages dans l'étude

Sur la période 2016-2018, 11 élevages du Sud-Ouest de la France (7 élevages en 2016 et 4 en 2018) ont fait l'objet d'un suivi par la clinique aviaire de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse dans le cadre de suspicions de réovirose.

La totalité était des élevages de poulets Label Rouge élevés en moyenne sur 84 jours.

Le jour de la visite, les animaux étudiés étaient âgés 35 à 78 jours, la moyenne se situant autour de 57 jours. La densité était de 11 animaux/m² sur l'ensemble des élevages.

Sur les 11 élevages, sept provenaient de poules reproductrices vaccinées avec un vaccin FILAVAC Réo K12523 variant 2011.

1.2. Analyse virologique

Ces analyses ont été réalisées d'une part sur les tendons prélevés après les visites d'élevages et d'autre part sur des prélèvements adressés par des vétérinaires avicoles du Sud-Ouest de la France.

Au final, 34 prélèvements de tendons ont été mis en culture et analysés en RT-PCR conventionnelle ciblant le segment sigma C des réovirus aviaire (3).

Les tendons ont été broyés au mortier et au sable de Fontainebleau avant d'être mis à incuber sur cellules LMH (cellules tumorales de foie de poulet).

Après cinq jours d'incubation ou lorsqu'un ECP était observé, les cellules et la totalité du surnageant de culture étaient récupérés et conservés à -80°C.

Pour réaliser les passages suivants, le protocole était répété à partir de l'ajout du broyat sur les cellules en faisant subir trois cycles de congélation/décongélation au surnageant récolté au passage précédent, avant l'infection des cellules LMH.

Jusqu'à quatre passages ont ainsi été réalisés, un effet cytopathogène étant d'ordinaire observé après trois passages.

Le suivi de l'infection était réalisé par PCR quantitative en temps réel à l'aide d'amorces ciblant le segment M3. L'analyse phylogénétique et la classification en génotypes (4) était réalisée après séquençage Sanger du segment *Sigma C*. Ce dernier était amplifié au préalable par PCR conventionnelle avec les amorces P1 et P4 (3), ce segment étant le plus variable chez les réovirus (5) son séquençage permet une distinction fine entre les différentes souches de réovirus.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Lors des 11 visites d'élevages, la totalité des lots atteints présentait des boiteries plus ou moins marquées avec un pourcentage du troupeau atteint allant de 10-15% à 100% (moyenne à 40%).

Après autopsies et examens histologiques, les lésions macroscopiques et microscopiques mettaient en évidence des ténosynovites chroniques, avec des tendons œdématisés ou indurés expliquant les boiteries et quelques lésions d'entérites.

Ce tableau clinique est typique d'un phénomène d'arthrite virale à réovirus et est similaire à d'autres foyers décrits auparavant (6,7).

Sur les 34 prélèvements testés en culture cellulaire, trois ont montré un effet cytopathogène (**Figure 1**) à partir du deuxième passage, huit à partir du troisième passage et cinq à partir du quatrième passage.

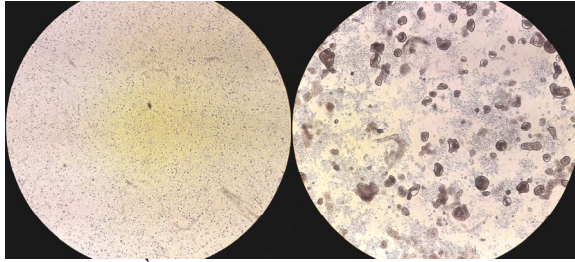


Figure 1 : À gauche : tapis cellulaire de LMH non infectés. À droite : effet cytopathogène typique des réovirus aviaires sur cellules LMH.

Après mise en culture, 18 échantillons se sont révélés positifs en RT-PCR. En raison de charges virales très faibles, six échantillons ne montraient pas d'ECP sur culture cellulaire mais ont tout de même été testés positifs en PCR quantitative en temps réel.

À noter que trois prélèvements ont été directement testés positifs en RT-PCR, sur les broyats de tendons sans passage par la culture cellulaire. L'ensemble des résultats est présenté dans le **tableau 1**.

Au final, 18 isolats viraux ont pu être séquencés et classés dans l'un des cinq génotypes décrits à ce jour. Ainsi, parmi les 18 échantillons séquencés, 15 ont été reliés au génotype 4 (12 prélèvements de 2016 et trois de 2017) et trois au génotype 1 (un échantillon en 2016 et deux en 2018) (**Figure 2**).

Les deux séquences d'acides aminés des échantillons L18-006 et L18-018 font partie du génotype 1 et sont proches de la souche 11-12523, souche avec laquelle les individus de ces troupeaux ont été vaccinés.

La comparaison des épitopes au niveau de la protéine *sigma C* de ces souches pourrait apporter un élément de réponse à l'apparition de signes cliniques malgré la vaccination avec une souche proche au plan phylogénétique.

En première intention, l'alignement des épitopes s'est fait avec les trois souches précédemment citées et une souche de chaque génotype (**Figure 3**).

Au final, les souches L18-006 et L18-018 présentent 99% d'identité entre elles. Elles possèdent également les mêmes substitutions d'acides aminés avec la souche 11-12523 à savoir :

- En position 176 : un acide aspartique (acide aminé chargé) chez la souche 11-12523, substituée par une arginine (non chargé) dans les souches L18-006 et L18-018.
- En position 236 : une sérine (acide aminé polaire), substituée par une glycine (non polaire).

- En position 292 : une sérine (polaire) est substituée par une valine (aliphatique et non polaire).

CONCLUSION

Des élevages de poulets Label Rouge du Sud-Ouest de la France atteints de réovirose ont été inclus dans une étude de recherche clinique. Ces cas cliniques, inclus sur la période 2016-2018, se caractérisaient principalement par des boiteries sévères (gonflement des tendons gastrocnémiens), touchant 35 à 40% du lot en moyenne, une hétérogénéité marquée et des retards de croissance.

L'isolement et l'analyse génétique du gène *sigma C* a montré que cette émergence est causée par des réovirus apparentés au génotype 4, selon la classification de Kant, 2003. Une analyse spécifique des sites épitopiques suggère que les virus isolés dans cette étude présentent des polymorphismes tels qu'une protection conférée par les souches vaccinales commerciales appartenant au génotype 1 est très improbable. Des essais de séroneutralisation permettraient de mieux évaluer les protections croisées. Le contrôle de la maladie par la vaccination est compromis par la variabilité génétique et l'échappement à la neutralisation (6,8,9). Une adaptation continue des souches incluses dans les formulations vaccinales est une option largement pratiquée dans d'autres pays.

Plus largement, l'émergence globale de ténosynovites à réovirus dans les grands bassins de production du poulet de chair dans le monde n'est pas expliquée. Cette émergence justifierait des travaux de fond pour mieux connaître la circulation réelle des réovirus, pathogènes ou non, et mieux caractériser les virus au plan génétique pour identifier les facteurs d'émergence et de pathogénicité.

Tableau 1 : Récapitulatif des résultats de mise en culture cellulaire, RT-PCR (3) et génotypage des 34 prélèvements analysés

Référence	RT-PCR sur broyat	P1 LMH	P2 LMH	P3 LMH	P4 LMH	RT-PCR après culture	Séquençage sigma C
16-089	POS	NEG	POS	POS	Non réalisé	POS	Cluster 4
16-090	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	Cluster 4
16-091	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	Cluster 4
16-092	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
16-093	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
16-105	NEG	NEG	NEG	POS	Non réalisé	POS	Cluster 4
16-111	NEG	NEG	NEG	POS	Non réalisé	POS	Cluster 4
16-084	POS	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Cluster 4
16-118	NEG	NEG	NEG	POS	Non réalisé	POS	Cluster 1
16-094	NEG	NEG	NEG	POS	Non réalisé	POS	Cluster 4
16-094	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
16-095	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
16-095	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
16-096	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
16-096	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
16-097	NEG	NEG	POS	POS	Non réalisé	POS	Cluster 4
16-097	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	POS	Cluster 4
16-097	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
16-097	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	POS	Cluster 4
16-097	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	POS	Cluster 4
16-098	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	POS	NEG
16-098	NEG	NEG	NEG	POS	Non réalisé	POS	Cluster 4
16-098	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	POS	NEG
16-099	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
16-099	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	POS	NEG
16-099	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
17-022	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	Cluster 4
17-022	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	Cluster 4
17-022	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	Cluster 4
18-001	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
18-002	POS	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Cluster 1
18-003	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
18-004	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
18-005	POS	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Cluster 1

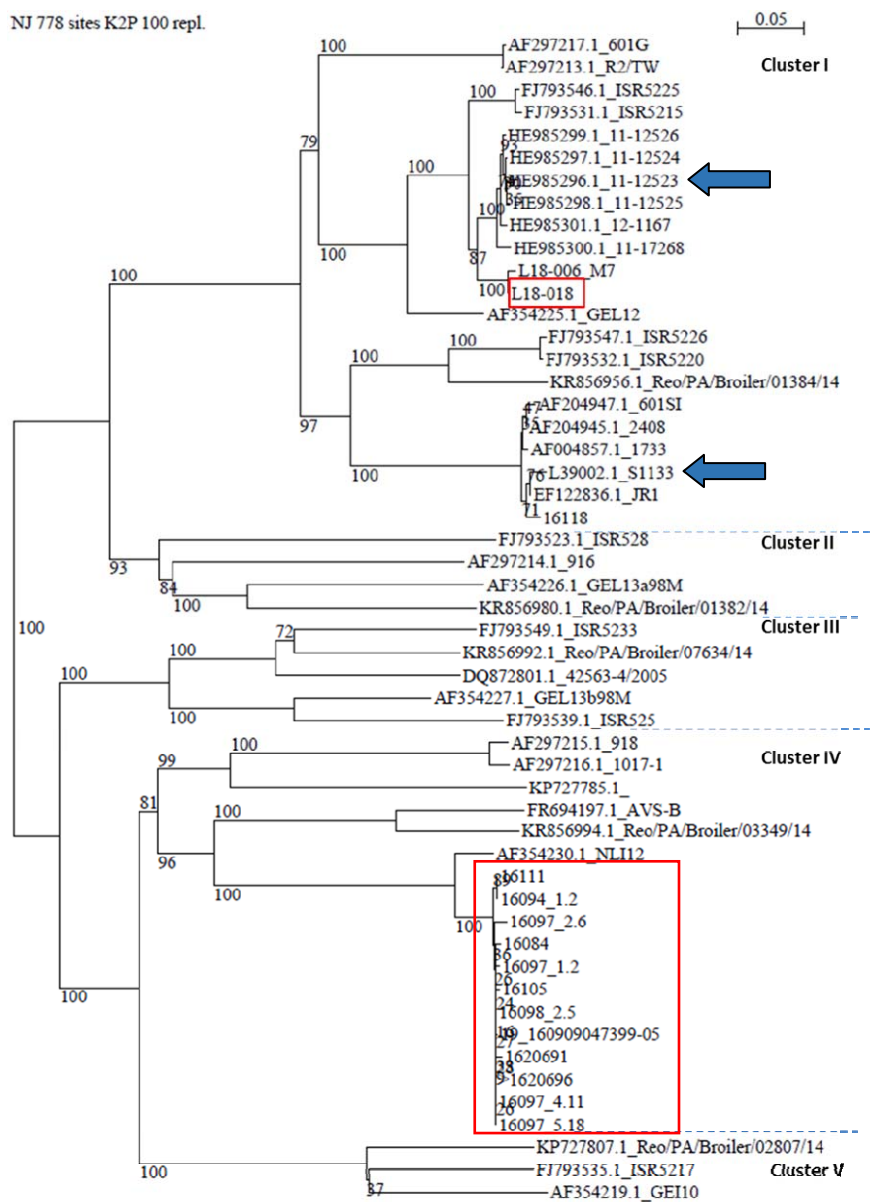


Figure 2 : Arbre phylogénétique regroupant les différents isolats de 2016 et 2018. Encadrés en rouge : isolats décrits dans ce travail. Flèches bleues : souches vaccinales.

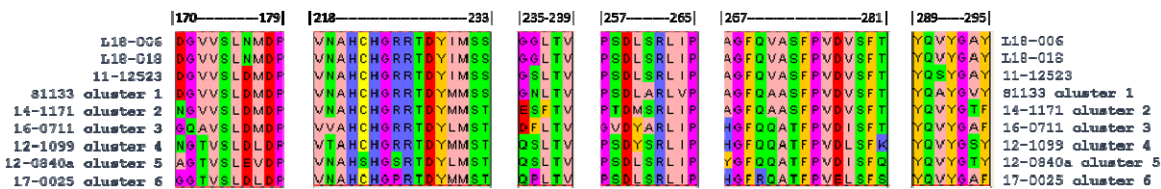


Figure 3 : Alignement des résidus d'acides aminés des régions antigéniques de la protéine sigma C.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Viruses IC on T of, King AM. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier; 2011. 1463 p.
2. Martínez-Costas J, Grande A, Varela R, García-Martínez C, Benavente J. Protein architecture of avian reovirus S1133 and identification of the cell attachment protein. J Virol. 1997 Jan;71(1):59–64.
3. Kant A, Balk F, Born L, van Roozelaar D, Heijmans J, Gielkens A, et al. Classification of Dutch and German avian reoviruses by sequencing the sigma C protein. Vet Res. 2003 Apr;34(2):203–12.
4. Goldenberg D, Pasmanik-Chor M, Pirak M, Kass N, Lublin A, Yeheskel A, et al. Genetic and antigenic characterization of sigma C protein from avian reovirus. Avian Pathol. 2010 Jun;39(3):189–99.
5. Guardado Calvo P, Fox GC, Hermo Parrado XL, Llamas-Saiz AL, Costas C, Martínez-Costas J, et al. Structure of the carboxy-terminal receptor-binding domain of avian reovirus fibre sigmaC. J Mol Biol. 2005 Nov 18;354(1):137–49.
6. Troxler S, Rigomier P, Bilic I, Liebhart D, Prokofieva I, Robineau B, et al. Identification of a new reovirus causing substantial losses in broiler production in France, despite routine vaccination of breeders. Vet Rec. 2013 May 25;172(21):556.
7. Ayalew LE, Gupta A, Fricke J, Ahmed KA, Popowich S, Lockerbie B, et al. Phenotypic, genotypic and antigenic characterization of emerging avian reoviruses isolated from clinical cases of arthritis in broilers in Saskatchewan, Canada. Scientific Reports. 2017 Jun 15;7(1):3565.
8. Lublin A, Goldenberg D, Rosenbluth E, Heller ED, Pitcovski J. Wide-range protection against avian reovirus conferred by vaccination with representatives of four defined genotypes. Vaccine. 2011 Nov 3;29(47):8683–8.
9. Sellers HS. Current limitations in control of viral arthritis and tenosynovitis caused by avian reoviruses in commercial poultry. Vet Microbiol. 2017 Jul;206:152–6.

SESSION
PATHOLOGIE - PREVENTION

Synthèse

LES COCCIDIOSES DU POULET, UN VIEUX PROBLEME TOUJOURS D'ACTUALITE – LE « TOUR-(S) » DES MOYENS DE LUTTE PRESENTS ET A VENIR

Silvestre Anne¹, Réperant Jean-Michel²

¹INRA - Infectiologie et Santé Publique, Université de Tours, UMR 1282 - 37380 NOUZILLY,

²ANSES - Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, U VIPAC – 22440 PLOUFRAGAN
Anne.Silvestre@inra.fr; Jean-Michel.Reperant@Anses.fr

RÉSUMÉ

Les coccidiooses, provoquées par le parasite *Eimeria*, présentent une distribution mondiale et constituent la principale parasitose en élevage aviaire. Cinq espèces majeures sont responsables de lourdes pertes économiques dans la filière avicole. La multiplication du parasite dans les cellules de l'épithélium digestif impacte la santé et les performances zootechniques. Les mesures de contrôle sont essentiellement préventives et reposent sur l'usage i) de désinfectants pour limiter la propagation des parasites dans l'environnement, ii) d'additifs coccidiostatiques dans l'alimentation des poulets pour ralentir le développement endogène du parasite et enfin iii) de vaccins anticoccidiens, qui vont stimuler une immunité protectrice très efficace. Cependant, ces différents moyens de contrôle rencontrent des limites : l'efficacité des coccidiostatiques est menacée par le développement de résistance et les vaccins coûteux ne sont pas adaptés à toute la filière. Face à la pression sociétale pour réduire les intrants en élevage, de nombreuses approches alternatives « plus naturelles » sont explorées : extraits végétaux, huiles essentielles, flores de barrière, homéopathie... L'efficacité de ces approches reste à démontrer de façon plus rigoureuse. Les perspectives les plus prometteuses sont sans doute à rechercher dans l'optimisation des vaccins et leur mode d'administration : développer des vaccins multivalents sous-unitaires ou encore des anticorps destinés à stimuler l'immunité des poulets.

ABSTRACT

Chicken coccidiosis, an old problem still relevant – Tour-(s) of present and future means of control

Coccidiosis, caused by the parasite *Eimeria*, has a worldwide distribution and is the main parasitic disease in poultry farming. Five major species are responsible for heavy economic losses in the poultry industry. The multiplication of the parasite in the cells of the digestive epithelium affects the health and zootechnical performance. Control measures are essentially preventive and are based on the use of (i) disinfectants to limit the spread of parasites in the environment, (ii) coccidiostatic additives in chicken feed to slow the endogenous development of the parasite and finally iii) of anticoccidial vaccines, which will stimulate a very effective protective immunity. However, these different means of control have limitations: the effectiveness of coccidiostats is threatened by the development of resistance and expensive vaccines are not suitable for the entire industry. In the face of societal pressure to reduce inputs, many alternative "more natural" approaches are being explored: plant extracts, essential oils, barrier flora, homeopathy... The effectiveness of these approaches remains to be demonstrated more accurately. The most promising prospects are undoubtedly to be found in the optimization of vaccines and their mode of administration: developing subunit multivalent vaccines or antibodies designed to stimulate the immunity of hens.

INTRODUCTION

Les coccidioses sont des maladies parasitaires, causées par des protozoaires Apicomplexes appartenant à la famille des coccidies. Dans cette famille, on trouve le toxoplasme (*Toxoplasma gondii*), les cryptosporidies (*Cryptosporidium* spp.) et chez les volailles, essentiellement le genre *Eimeria* avec sept espèces qui peuvent parasiter le poulet (Shirley, 1986). Les coccidioses ont un impact sanitaire élevé, causant des troubles digestifs, de la morbidité pouvant aller jusqu'à de la mortalité pour les espèces les plus virulentes. Le coût annuel mondial des coccidioses aviaires et des moyens de lutte contre ces affections était estimé à plus de 3 milliards de dollars en 2014 (Blake & Tomley, 2014).

1. LES COCCIDIOSES EN AVICULTURE

1.1. Agents étiologiques

Caractéristiques des différentes espèces de coccidies du poulet

Les *Eimeria* du poulet sont strictement spécifiques du poulet, elles n'ont pas d'hôte intermédiaire (cycle direct) et pas de réservoir sauvage connu. Elles ne peuvent se développer que chez le poulet.

La contamination se fait par voie orale, par l'ingestion d'oocystes (forme infectieuse résistante) présents dans l'environnement.

Chaque espèce a des caractéristiques propres, sa période prépatente, sa prolificité, sa localisation dans le tube digestif et au niveau de l'épithélium intestinal ou caecal, la morphologie et la taille de ses oocystes, la vitesse de sporulation.

Ainsi, *E. acervulina*, espèce la plus prolifique et à cycle court, qui se localise dans le duodénum et colonise également le jéjunum dans les fortes infections, est une espèce qui entraîne des destructions de cellules épithéliales au sommet des villosités intestinales mais pas d'hémorragies ni de mortalité.

E. tenella est la plus connue car la plus facile à détecter : elle se localise dans les caeca, en profondeur dans l'épithélium et peut engendrer hémorragies et mortalité.

E. maxima, la troisième espèce la plus fréquente, se développe dans l'intestin moyen, et les troubles qu'elle engendre sont dus à la gamogonie et la formation d'oocystes de grande taille dans les villosités intestinales.

E. brunetti, plus rare et moins prolifique, se développe dans la deuxième moitié de l'intestin grêle, la base des caeca et le colon, et dans les fortes infections, elle peut entraîner hémorragies ou bouchons caséux dans la jonction iléo-caecale.

E. necatrix a une localisation particulière : elle réalise sa schizogonie dans l'intestin moyen où elle peut entraîner des lésions importantes avec ballonnement

et hémorragies marquées, et la gamogonie se déroule dans les caeca sans causer de lésions.

Enfin, *E. praecox* et *E. mitis* sont les deux espèces les moins pathogènes, qui n'entraînent pas de lésions spécifiques, mais qui se localisent respectivement dans le duodénum et la deuxième moitié de l'intestin grêle.

Durée du cycle et de la période pathogène

Le cycle de développement est court et le développement endogène varie de quatre à sept jours selon les espèces. Il peut être divisé en trois étapes majeures : une première étape de multiplications successives après l'ingestion des oocystes, appelée schizogonie, puis une étape de reproduction sexuée, la gamogonie, qui aboutit à la formation de nouveaux oocystes, qui sont émis dans l'environnement avec les fientes. Ces oocystes sont immatures et non infectieux lorsqu'ils sont émis, et une évolution est nécessaire dans l'environnement : la sporogonie (ou sporulation) qui aboutit à la forme infectieuse très résistante.

La phase pathogène du cycle correspond à la plus grande quantité de parasites produits, à la fin de la schizogonie pour *Eimeria tenella* et *Eimeria necatrix*, et lors de la gamogonie pour *E. acervulina*, *E. maxima* et *E. brunetti*.

Réponse immunitaire

L'immunité protectrice contre les coccidies est une immunité acquise, c'est-à-dire qu'il faut un contact avec le parasite pour que les défenses efficaces se mettent en place. La réponse immunitaire est de deux types : humorale et cellulaire (Shivaramaiah et al., 2014; Yun et al., 2000), mais seule l'immunité à médiation cellulaire est efficace. Lors d'une primo-infection, le développement des parasites est trop rapide pour que la réponse immunitaire puisse jouer un rôle. Cependant, les cellules activées suite à ce premier contact lutteront efficacement lors d'une réinfection avec la même espèce. Mais cette protection est spécifique d'espèce : il n'y a pas de protection croisée, et pour qu'un oiseau soit protégé contre toutes les coccidies, il faut qu'il ait été en contact avec toutes les espèces parasites du poulet.

1.2. Différentes formes de développement

Les coccidies ne sont pas obligatoirement pathogènes. Elles peuvent se développer avec trois niveaux différents d'intensité : apathogène, subclinique et clinique. L'impact de l'infection dépendra de la quantité d'oocystes ingérés, de l'état général de l'oiseau lors de l'ingestion et les jours suivants et de l'immunité acquise ou non suite à un contact antérieur avec la même espèce de coccidie.

Une infection totalement non pathogène est possible avec toutes les espèces de coccidies à faible dose. La forme subclinique est la plus fréquente, mais elle est quasiment indétectable. Elle entraîne des lésions d'indice intermédiaire sans manifestation clinique. Aucun indicateur ne permet de la déceler lors de sa

survenue. Ainsi, les chances de mettre en évidence ces lésions sont-elles très faibles car l'épithélium intestinal se régénère rapidement et les lésions disparaissent au bout de quelques jours. La coccidiose subclinique pourra être suspectée en fin d'élevage avec des résultats économiques médiocres sans accident pathologique notable en cours de bande. La forme clinique est caractérisée par de la morbidité, des diarrhées et parfois de la mortalité, pour les espèces les plus virulentes. Cette forme peut être diagnostiquée en se fondant sur les indices lésionnels concomitants au niveau du tube digestif (Johnson & Reid, 1970).

1.3. Prévalence, incidence

Les coccidies sont très présentes dans les élevages, et la prévalence de certaines espèces avoisine les 100%. Cependant, la mise en évidence des parasites dans l'environnement, les fientes ou le tube digestif des oiseaux ne permet pas d'évaluer l'impact de ces parasites sur la santé et les performances des poulets. Seules les formes subcliniques et cliniques auront un impact sur la croissance et la santé, et pourront favoriser l'émergence d'autres agents pathogènes qui profiteront de l'affaiblissement relatif des oiseaux.

2. MOYENS DE CONTROLE ACTUELS

2.1. Mesures générales, conduite d'élevage

La lutte ciblée contre les coccidies est insuffisante si elle n'est pas accompagnée de mesures générales et de conduites d'élevage visant à maintenir le bien-être et la santé des oiseaux au maximum.

2.2. Additifs coccidiostatiques

Les additifs coccidiostatiques sont des produits actifs sur certains stades de développement endogène des parasites (Kant et al., 2013), qui sont distribués préventivement via l'alimentation. Ils sont incorporés à des concentrations définies pour chaque produit autorisé, selon les exigences définies dans les dossiers d'autorisation. Ils sont soumis à la réglementation européenne sur les additifs de l'alimentation animale (Règlement européen 1831/2003) et font partie de la catégorie des additifs coccidiostatiques et histomonostatiques. Les autorisations sont valables pour dix ans renouvelables après dépôt de dossiers de demande de renouvellement.

Leur principal inconvénient est qu'ils peuvent conduire à l'émergence de résistance chez les coccidies (Chapman, 1984), les rendant moins efficaces, sans qu'il soit possible facilement de mesurer l'intensité des résistances. Cela peut conduire à une recrudescence des cas cliniques de coccidiose, ou plus insidieusement à des baisses de rentabilité progressives souvent non détectées (avec les coccidioses subcliniques).

Des programmes de rotation de molécules ou d'utilisation de plusieurs actifs successivement sur une même bande de poulets permettent de ralentir ou d'atténuer ces résistances, mais le phénomène se développe quand-même. Il existe des résistances vis-à-vis de tous les additifs actuellement utilisés en aviculture.

Un autre problème est la pression sociétale pour la diminution voire le retrait des intrants médicamenteux dans les élevages. Les additifs coccidiostatiques ne sont pas des médicaments vétérinaires mais ils ont une action préventive sur des agents pathogènes potentiels : les coccidies. Bien que leur utilisation soit rigoureusement encadrée, des détracteurs tentent de manipuler l'opinion publique pour inciter le législateur à les interdire. Malheureusement, leur disparition aurait des conséquences désastreuses sur la santé et le bien-être des oiseaux, car à l'heure actuelle, aucune alternative n'est disponible en quantité suffisante ou à efficacité équivalente pour maîtriser le risque coccidien.

2.3. Vaccins anticoccidiens

Dans l'Union Européenne, seuls des vaccins atténués par rapport aux populations sauvages de coccidies qui circulent dans les élevages sont autorisés. Les vaccins actuellement commercialisés sont des vaccins vivants constitués de souches précoces de différentes espèces d'*Eimeria*. Ces souches précoces sont caractérisées par une période prépatente réduite, conséquence d'une réduction du nombre de schizogonies, qui conduit à une plus faible prolificité. Ainsi, à la même dose qu'un isolat sauvage, une souche précoce se développe plus rapidement, engendre moins de destructions cellulaires dans le tube digestif, et produit moins d'oocystes. Cependant, elle stimule la réponse immunitaire qui protège les oiseaux contre les populations sauvages de la même espèce.

La mise en place d'une réponse immunitaire protectrice efficace étant plus ou moins lente et dépendant des espèces de coccidies, il faut compter environ trois semaines pour que la protection soit totale. L'immunité étant spécifique d'espèce et les espèces de coccidies des vaccins étant différentes, la protection ne concernera que les espèces présentes dans le vaccin utilisé.

Les deux inconvénients principaux de ces vaccins sont leur coût (chaque espèce de coccidie est produite séparément sur oiseaux EOPS, et est peu prolifique du fait du caractère précoce spécifique des souches vaccinales en UE) et leur sensibilité aux produits actifs sur les coccidies (additifs coccidiostatiques, médicaments vétérinaires anticoccidiens, dont les sulfamides). Un autre défaut est le délai de mise en place de l'immunité protectrice, qui fait que les oiseaux ne sont pas couverts pendant les deux premières semaines de vie.

La sensibilité des souches vaccinales à tous les anticoccidiens actuels est utilisée comme argument pour l'utilisation des vaccins dans des rotations avec

des additifs coccidiostatiques. Ainsi, leur utilisation peut favoriser un réensemencement du milieu avec des populations sensibles pour restaurer l'efficacité des anticoccidiens (Chapman & Jeffers, 2014).

Une baisse de performances constatée sur le terrain dans le jeune âge est attribuée au vaccin, mais il faut savoir que ces vaccins n'agissent que sur les coccidies et que d'autres facteurs peuvent être la cause de ces performances dégradées transitoirement.

2.4. Désinfectants

Des produits désinfectants avec revendication sur les oocystes de coccidies sont disponibles sur le marché. Aucune ligne directrice sur l'évaluation de l'efficacité de ces produits n'ayant été définie en France, l'évaluation se fait selon les recommandations du DVG (Société Vétérinaire Allemande) qui a validé une méthode *in vitro* développée par l'Institut de Parasitologie de Leipzig (Dresely et al., 2015). Aucun de ces produits ne permet de détruire la totalité des oocystes, et les conditions de réalisation des tests d'efficacité peuvent laisser supposer que l'action sur le terrain est moindre (température inférieure, présence de matière organique ou d'autres éléments susceptibles de réduire l'effet des produits sur les oocystes). De plus, le niveau de contamination ambiante dans un bâtiment après le départ d'un lot de poulets peut varier considérablement, et la destruction de 99,9% de milliards d'oocystes en laisse encore quelques millions dans l'environnement. Néanmoins, les désinfectants peuvent diminuer la pression en début d'élevage, ce qui peut contribuer à un meilleur démarrage des poussins. Mais la prolificité des coccidies est telle qu'un nombre infime d'oocystes au départ permet de contaminer l'ensemble d'un bâtiment en quelques semaines (Velkers et al., 2012).

2.5. Approches alternatives (extraits végétaux, huiles essentielles, flores de barrière, homéopathie, acidifiants...)

Face à la menace de disparition des additifs coccidiostatiques, et à leur bannissement dans certaines productions (biologiques et certains labels), des approches alternatives se sont développées. Les acidifiants, avec le vinaigre au début, sont parfois utilisés, mais leur intérêt est contestable. En effet, les coccidies lors de leur passage dans le tube digestif, sont soumis à des variations de pH importantes, et les localisations diverses des différentes espèces dans le tube digestif suggèrent qu'elles sont peu sensibles à l'acidité. Des études avec le vinaigre à différentes concentrations menées dans nos installations n'ont pas permis d'observer d'amélioration chez des oiseaux infectés avec *E. acervulina* et *E. tenella* (résultats non publiés).

Les pré et probiotiques et les flores de barrière présentent peu d'intérêt au regard de travaux anciens (Lafont et al., 1975) qui indiquaient que la flore n'intervient pas dans les manifestations pathogènes des coccidies intestinales. Le seul effet observé à

l'époque concernait *E. tenella* qui semble avoir besoin d'une flore associée pour que des lésions et des signes cliniques apparaissent.

Cependant, les caeca étant en position terminale dans l'intestin, il est difficile d'orienter une flore défavorable à l'expression pathogène de cette coccidie. Toutefois, des produits enrobés à relargage différé peuvent être intéressants pour *E. tenella*, et des études avec des MOS (mannan-oligosaccharides) (Elmusharaf et al., 2006) ont permis de réduire l'infection par *E. tenella*.

Les extraits végétaux et les huiles essentielles sont très à la mode, surfant sur le côté naturel. Il faut toutefois garder à l'esprit que le naturel n'est pas synonyme de bénéfique : de nombreuses toxines d'origine végétale nous le rappellent.

Aujourd'hui, de nombreuses publications rapportent l'efficacité de certains composés, mais ces résultats sont rarement reproductibles, ne portent que sur certaines espèces de coccidies, ou les critères mis en avant ne sont pas pertinents (Peek & Landman, 2011). Ainsi, le curcuma (de *Curcuma longa*) semble efficace dans les infections à *E. maxima* en améliorant les performances et en réduisant les lésions, mais il n'a pas d'effet sur *E. tenella* (Allen et al., 1998). De même, l'artémisinine a permis d'obtenir des effets bénéfiques vis-à-vis d'*E. tenella*, moyens sur *E. acervulina* et nuls sur *E. maxima* (Allen, 1997).

Aucun produit à base de plantes n'a pour l'instant présenté d'effet suffisant ou reproductible contre les coccidies, et aucun à notre connaissance n'est utilisé à grande échelle en aviculture avec ce positionnement.

L'homéopathie (qui repose sur la théorie qu'une substance qui provoque un symptôme peut être utilisée pour traiter le même symptôme de la maladie) et l'isothérapie (qui consiste en l'élaboration par l'organisme sous l'influence d'une maladie de substances permettant de combattre cette même maladie) sont parfois mentionnées pour la lutte contre les coccidies, notamment en production biologique. Ces approches ne sont supportées par aucune démonstration scientifique d'efficacité, tant sur les coccidies que de manière générale. Cependant, l'effet placebo, qui est le seul effet envisageable, peut avoir un intérêt au niveau de l'éleveur qui se sent soutenu et aidé dans la gestion de son élevage, à condition qu'il adhère à la démarche...

2.6. Traitements curatifs

En cas de diagnostic de coccidiose, il est possible d'utiliser des produits de traitement anticoccidien. Ces produits sont enregistrés comme médicaments vétérinaires et sont peu nombreux. Ce sont des molécules chimiques qui peuvent sélectionner des résistances et ils ne devraient être utilisés qu'en cas de nécessité, après un diagnostic pertinent de coccidiose posé. Malheureusement, ce diagnostic s'appuie quelquefois uniquement sur la présence importante d'oocystes dans les fientes ou les litières, et des traitements sont mis en place inutilement. De plus,

l'efficacité d'un traitement est souvent difficile à appréhender, car l'efficacité ne se traduira pas par une guérison des sujets atteints (qui ont déjà des lésions et qui manifestent des signes cliniques en conséquence) mais par un arrêt de l'expansion de la maladie (pas plus de sujets touchés). Les sujets malades récupéreront progressivement à la fin du développement pathogène du parasite, ou les signes pourront perdurer si d'autres agents pathogènes profitent de l'affaiblissement des animaux. Ces traitements, administrés dans l'eau de boisson, doivent être mis en place le plus rapidement possible afin d'éviter aux oiseaux n'exprimant pas encore de signes cliniques de tomber malades en cas d'infection forte.

3. AVENIR DES SOLUTIONS ACTUELLES ET NOUVELLES APPROCHES

3.1. Nouvelles lignes directrices pour l'autorisation d'additifs coccidiostatiques

Les coccidiostatiques, considérés comme des additifs pour l'alimentation animale, sont autorisés dans l'Union Européenne conformément au règlement (CE) n° 429/2008 du Parlement européen. Les nouvelles recommandations ne rendent plus obligatoires les essais dits « de terrain ». En effet, les essais terrain ne comportent généralement pas de lot témoin négatif, et l'évaluation finale est parfois inadéquate. Pour ces raisons, ils sont considérés comme moins démonstratifs que des essais en parquet ou en cage, reposant sur une inoculation artificielle. Ils peuvent cependant être conduits pour renforcer le dossier. Le choix de l'inoculum est un critère déterminant qui doit remplir les conditions suivantes : i) être représentatif de souches européennes de terrain, isolées de poules/poulets recevant une supplémentation anticoccidienne mais non vaccinés ; ii) la composition spécifique de l'inoculum doit être représentative de la prévalence des espèces de coccidies aviaires : *E. brunetti*, *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. tenella* et *E. necatrix*, iii) enfin la virulence de l'inoculum doit réduire de 25% le gain de poids sur la durée de l'essai et les scores lésionnels doivent augmenter d'au moins 2 points sur l'échelle de Johnson & Reid (1970). Les quatorze additifs coccidiostatiques autorisés dans la filière volaille sont répertoriés dans le registre des additifs pour l'alimentation animale tenu par la Commission européenne. Les coccidiostatiques sont les seules substances anticoccidiennes encore autorisées en tant qu'additifs pour l'alimentation animale. Leur éventuelle suppression de la liste des additifs autorisés pour l'alimentation animale menace le maintien de l'état sanitaire des élevages avicoles.

3.2. Nouvelles molécules : cibles étudiées

Les nombreuses études de facteurs de virulence d'*Eimeria* ont permis d'identifier des cibles pour le

développement de nouveaux traitements. L'évaluation sans *a priori* de banques d'inhibiteurs et de nouveaux composés chimiques a permis de sélectionner des composés « chef de file » efficaces contre *Eimeria* (Silpa et al., 2016) et parfois l'identification de(s) cible(s) chez le parasite a pu être conduite (Schaeffer et al., 2012). L'utilisation commerciale de ces nouveaux composés se heurte à des développements nécessaires et à des attentes divergentes des consommateurs. Parmi les nouvelles cibles potentielles, l'étape de la gamogonie (phase de reproduction sexuée, comprenant la formation des microgamètes, des macrogamètes et la fécondation) au cours du cycle parasitaire a été très peu étudiée jusqu'à présent. Le laboratoire de l'Anses Ploufragan travaille sur la fécondation, dans le but de mieux en comprendre les mécanismes, et tenter de bloquer le microgamète, élément mâle fécondant, soit chimiquement soit immunologiquement. Récemment, Arendt et collaborateurs (Arendt et al., 2016) ont démontré que l'administration d'anticorps bloquants anti-IL10 - bien que sans effet sur le taux d'excrétion des oocystes d'*Eimeria* spp - s'accompagnait d'une réduction de la perte de poids chez les poulets traités (Sand et al., 2016).

3.3. Alternatives : évaluation rigoureuse

L'efficacité des produits alternatifs chez les poulets est souvent évaluée en utilisant des paramètres relatifs à la performance, tels que l'indice de consommation, le gain de poids, l'intégrité intestinale (mesure de la hauteur des villosités et taux de profondeur des cryptes), l'évaluation des scores lésionnels et de la charge parasitaire, l'évaluation de la réponse immunitaire innée (dénombrement des cellules de gobelet). Il pourrait être intéressant d'évaluer aussi les effets de ces traitements sur la composition du microbiote intestinal qui est de plus en plus reconnu comme un élément déterminant dans l'évolution de l'infection.

3.4. Approches vaccinales

L'identification des espèces présentes en élevage est essentielle à la conception et à la mise en œuvre de stratégies de contrôle efficaces. Le développement de divers outils moléculaires pour le diagnostic des *Eimeria* a mis en évidence trois variants génétiques (Cantacessi et al., 2008), dont la présence est restreinte à l'hémisphère sud (Clark et al., 2016). La proximité phylogénétique du troisième variant avec l'espèce hautement pathogène *E. necatrix* laisse supposer que sa présence dans un élevage peut impacter plus sévèrement la productivité (Fornace et al., 2013). Il est donc possible d'introduire ces variants dans les vaccins actuels pour vacciner plus efficacement les poulets produits dans les filières du sud.

Les vaccins vivants sont très efficaces pour contrôler la coccidiose aviaire, mais de nouvelles pistes sont envisagées pour réduire leurs coûts de production. Les

vaccins sous-unitaires sont composés d'un antigène purifié (natif ou recombinant) du parasite. Divers antigènes ont été évalués pour leur capacité à réduire les symptômes de la maladie et la charge parasitaire, augmenter le gain de poids ou améliorer l'indice de consommation : EtGAM56, GAPDH, AMA1, IMP (Blake et al., 2017). Pourtant, excepté CoxAbic (composé d'antigènes du stade gamétocyte d'*E. maxima* très conservés entre les espèces *E. maxima*, *E. tenella* et *E. acervulina*) non disponible en Europe, aucun vaccin sous-unitaire n'a atteint le développement commercial. La supplémentation alimentaire avec différents mélanges d'extraits végétaux peut optimiser les effets des vaccins sous-unitaires, en stimulant la production de cellules immunitaires chez le poulet vacciné (Lee et al., 2011). L'infection naturelle par *Eimeria* n'induit pas de protection croisée (Rose & Long, 1962). Aussi, la stratégie vaccinale doit-elle tenir compte de cette contrainte. Des antigènes immunodominants ont été identifiés chez les principales espèces (Liu et al., 2017) et leur combinaison pourrait permettre le développement de nouveaux vaccins multivalents (Song et al., 2015), en attendant l'identification des systèmes de distribution optimaux. Récemment, des essais d'immunisation avec des nanoparticules, permettant de délivrer les antigènes au site d'infection plus efficacement, ont permis de protéger des poulets d'une infection d'épreuve par *E. maxima* (Jenkins et al., 2018). Les vaccins recombinants présentent l'inconvénient de ne pas se multiplier dans l'hôte, aboutissant ainsi à une protection immunitaire partielle et de courte durée. Une alternative serait d'utiliser des souches de parasites transfectées, exprimant des antigènes protecteurs (Pastor-Fernandez et al., 2018; Tang et al., 2018a; Tang et al., 2018b), ou bien des cytokines permettant de stimuler et d'orienter la réponse immunitaire protectrice (Li et al., 2015). Cependant, cette solution se heurtera à l'acceptation du grand public de voir des poulets traités à l'aide d'organismes génétiquement modifiés (OGM) et plus difficile encore de consommer des poulets ainsi produits. Une alternative est d'administrer des anticorps destinés à stimuler l'immunité des poules, tout en favorisant la transmission des anticorps protecteurs aux descendants. Cette dernière alternative est en phase de maturation en vue d'une commercialisation.

CONCLUSION

Les coccidioses sont des affections majeures, mais les moyens de lutte existent. Les deux approches les plus efficaces aujourd'hui sont les additifs coccidiostatiques et les vaccins anticoccidiens, et en cas de coccidiose clinique, des médicaments vétérinaires spécifiques sont utilisables. Néanmoins, l'émergence possible de résistances aux molécules actuelles (additifs et médicaments vétérinaires), la pression sociétale potentielle vis-à-vis des additifs

coccidiostatiques et les inconvénients des vaccins (production, coût, délai de mise en place de protection, sensibilité aux molécules anticoccidiennes) obligent à réfléchir à de nouvelles approches de lutte pour enrichir ou remplacer tout ou partie de l'arsenal existant. A l'heure actuelle, les approches alternatives comme les produits à base de plantes, notamment les huiles essentielles, les pré et probiotiques et les acidifiants n'ont pas encore apporté de preuves tangibles reproductibles de leur intérêt pour contrôler les coccidioses. Une meilleure compréhension des mécanismes immunitaires protecteurs peut permettre de développer des vaccins sous-unitaires ou des approches immunomodulatrices mais avec des perspectives d'utilisation dans les élevages à moyen ou long terme. L'évaluation accrue de substances à base de plantes, si elle est rigoureuse et fondée sur les bons critères, peut permettre d'identifier des candidats potentiels intéressants qui pourraient alors être utilisés à une échéance plus brève. L'interdiction de certains moyens actuels efficaces sans avoir développé de solutions de remplacement aurait des conséquences dramatiques sur les productions avicoles, tant pour le bien-être et la santé des volailles que pour la rentabilité des élevages.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allen, P.C. (1997). Production of free radical species during *Eimeria maxima* infections in chickens. *Poultry Science*, 76, 814-821. 10.1093/ps/76.6.814
- Allen, P.C., Danforth, H.D., and Augustine, P.C. (1998). Dietary modulation of avian coccidiosis. *International Journal for Parasitology*, 28, 1131-1140. 10.1016/s0020-7519(98)00029-0
- Arendt, M.K., Sand, J.M., Marcone, T.M., and Cook, M.E. (2016). Interleukin-10 neutralizing antibody for detection of intestinal luminal levels and as a dietary additive in *Eimeria* challenged broiler chicks. *Poultry Science*, 95, 430-438. 10.3382/ps/pev365
- Blake, D.P., Pastor-Fernandez, I., Nolan, M.J., and Tomley, F.M. (2017). Recombinant anticoccidial vaccines - a cup half full? *Infection Genetics and Evolution*, 55, 358-365. 10.1016/j.meegid.2017.10.009
- Blake, D.P., and Tomley, F.M. (2014). Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. *Trends in Parasitology*, 30, 12-19. 10.1016/j.pt.2013.10.003
- Cantacessi, C., Riddell, S., Morris, G.M., Doran, T., Woods, W.G., Otranto, D., and Gasser, R.B. (2008). Genetic characterization of three unique operational taxonomic units of *Eimeria* from chickens in Australia based on nuclear spacer ribosomal DNA. *Veterinary Parasitology*, 152, 226-234. 10.1016/j.vetpar.2007.12.028
- Chapman, H.D. (1984). Drug-resistance in avian coccidia (a review). *Veterinary Parasitology*, 15, 11-27. 10.1016/0304-4017(84)90106-7
- Chapman, H.D., and Jeffers, T.K. (2014). Vaccination of chickens against coccidiosis ameliorates drug resistance in commercial poultry production. *International Journal for Parasitology-Drugs and Drug Resistance*, 4, 214-217. 10.1016/j.ijpddr.2014.10.002
- Clark, E.L., Macdonald, S.E., Thenmozhi, V., Kundu, K., Garg, R., Kumar, S., Ayoade, S., Fornace, K.M., Jatau, I.D., Moftah, A., Nolan, M.J., Sudhakar, N.R., Adebambo, A.O., Lawal, I.A., Alvarez Zapata, R., Awuni, J.A., Chapman, H.D., Karimuribo, E., Mugasa, C.M., Namangala, B., Rushton, J., Suo, X., Thangaraj, K., Rao, A.S.R.S., Tewari, A.K., Banerjee, P.S., Raj, G.D., Raman, M., Tomley, F.M., and Blake, D.P. (2016). Cryptic *Eimeria* genotypes are common across the southern but not northern hemisphere. *International Journal for Parasitology*, 46, 537-544. 10.1016/j.ijpara.2016.05.006
- Dresely, I., Dauschies, A., and Lendner, M. (2015). Establishment of a germ carrier assay to assess disinfectant efficacy against oocysts of coccidian parasites. *Parasitology Research*, 114, 273-281. 10.1007/s00436-014-4189-x
- Elmusharaf, M.A., Bautista, V., Nollet, L., and Beynen, A.C. (2006). Effect of a mannanoligosaccharide preparation on *Eimeria tenella* infection in broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*, 5, 583-588.
- Fornace, K.M., Clark, E.L., Macdonald, S.E., Namangala, B., Karimuribo, E., Awuni, J.A., Thieme, O., Blake, D.P., and Rushton, J. (2013). Occurrence of *Eimeria* Species Parasites on Small-Scale Commercial Chicken Farms in Africa and Indication of Economic Profitability. *Plos One*, 8. 10.1371/journal.pone.0084254
- Jenkins, M.C., Stevens, L., O'Brien, C., Parker, C., Miska, K., and Konjufca, V. (2018). Incorporation of a recombinant *Eimeria maxima* IMP1 antigen into nanoparticles confers protective immunity against *E. maxima* challenge infection. *Vaccine*, 36, 1126-1131. 10.1016/j.vaccine.2017.11.014
- Johnson, J., and Reid, W.M. (1970). Anticoccidial drugs - lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Experimental Parasitology*, 28, 30-36. 10.1016/0014-4894(70)90063-9
- Kant, V., Singh, P., Verma, P.K., Bais, I., Parmar, M.S., Gopal, A., and Gupta, V. (2013). Anticoccidial drugs used in the poultry: an overview. *Science International*, 1, 261-265.
- Lafont, J.-P., Yvoré, P., Bree, A., and Peloille, M. (1975). Pouvoir pathogène d'*Eimeria tenella* et d'*Eimeria acervulina* chez de poulets axéniques et monoxéniques. *Annales de recherches vétérinaires*, 6, 35-42.
- Lee, S.H., Lillehoj, H.S., Jang, S.I., Lee, K.W., Bravo, D., and Lillehoj, E.P. (2011). Effects of dietary supplementation with phytonutrients on vaccine-stimulated immunity against infection with *Eimeria tenella*. *Veterinary Parasitology*, 181, 97-105. 10.1016/j.vetpar.2011.05.003
- Li, Z., Tang, X., Suo, J., Qin, M., Yin, G., Liu, X., and Suo, X. (2015). Transgenic *Eimeria mitis* expressing chicken interleukin 2 stimulated higher cellular immune response in chickens compared with the wild-type parasites. *Frontiers in Microbiology*, 6, 533. 10.3389/fmicb.2015.00533
- Liu, L., Huang, X., Liu, J., Li, W., Ji, Y., Tian, D., Tian, L., Yang, X., Xu, L., Yan, R., Li, X., and Song, X. (2017). Identification of common immunodominant antigens of *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima* by immunoproteomic analysis. *Oncotarget*, 8, 34935-34945. 10.18632/oncotarget.16824
- Pastor-Fernandez, I., Kim, S., Billington, K., Bumstead, J., Marugan-Hernandez, V., Kuster, T., Ferguson, D.J.P., Vervelde, L., Blake, D.P., and Tomley, F.M. (2018). Development of cross-protective *Eimeria*-vectored vaccines based on apical membrane antigens. *International Journal for Parasitology*, 48, 505-518. 10.1016/j.ijpara.2018.01.003

- Peek, H.W., and Landman, W.J.M. (2011). Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Veterinary Quarterly*, 31, 143-161. 10.1080/01652176.2011.605247
- Règlement (CE) N° 1831/2003 du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2003 relatif aux additifs destinés à l'alimentation des animaux. Journal officiel de l'Union européenne, 18.10.2003, L268/29-43
- Rose, M.E., and Long, P.L. (1962). Immunity to four species of *Eimeria* in fowls. *Immunology*, 5, 79-92.
- Sand, J.M., Arendt, M.K., Repasy, A., Deniz, G., and Cook, M.E. (2016). Oral antibody to interleukin-10 reduces growth rate depression due to *Eimeria* spp. infection in broiler chickens. *Poultry Science*, 95, 439-446. 10.3382/ps/pev352
- Schaeffer, M., Schroeder, J., Heckerroth, A.R., Noack, S., Gassel, M., Mottram, J.C., Selzer, P.M., and Coombs, G.H. (2012). Identification of Lead Compounds Targeting the Cathepsin B-Like Enzyme of *Eimeria tenella*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56, 1190-1201. 10.1128/aac.05528-11
- Shirley, M.W. (1986). New methods for the identification of species and strains of *Eimeria*. In L R McDougald, L P Joyner and P L Longs (Eds), *Research in avian coccidiosis*, 13-35.
- Shivaramaiah, C., Barta, J., Hernandez-Velasco, X., Téllez, G., and Hargis, B. (2014). Coccidiosis: recent advancements in the immunobiology of *Eimeria* species, preventive measures, and the importance of vaccination as a control tool against these Apicomplexan parasites. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 5, 23-34.
- Silpa, L., Niepceon, A., Laurent, F., Brossier, F., Penichon, M., Enguehard-Gueiffier, C., Abarbri, M., Silvestre, A., and Petignat, J. (2016). Synthesis and evaluation of the anticoccidial activity of trifluoropyrido 1,2-a pyrimidin-2-one derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26, 114-120. 10.1016/j.bmcl.2015.11.018
- Song, X., Gao, Y., Xu, L., Yan, R., and Li, X. (2015). Partial protection against four species of chicken coccidia induced by multivalent subunit vaccine. *Veterinary Parasitology*, 212, 80-85. 10.1016/j.vetpar.2015.08.026
- Tang, X., Liu, X., Yin, G., Suo, J., Tao, G., Zhang, S., and Suo, X. (2018a). A Novel Vaccine Delivery Model of the Apicomplexan *Eimeria tenella* Expressing *Eimeria maxima* Antigen Protects Chickens against Infection of the Two Parasites. *Frontiers in Immunology*, 8. 10.3389/fimmu.2017.01982
- Tang, X., Suo, J., Li, C., Du, M., Wang, C., Hu, D., Duan, C., Lyu, Y., Liu, X., and Suo, X. (2018b). Transgenic *Eimeria tenella* Expressing Profilin of *Eimeria maxima* Elicits Enhanced Protective Immunity and Alters Gut Microbiome of Chickens. *Infection and Immunity*, 86. 10.1128/iai.00888-17
- Velkers, F.C., Bouma, A., Stegeman, J.A., and de Jong, M.C.M. (2012). Oocyst output and transmission rates during successive infections with *Eimeria acervulina* in experimental broiler flocks. *Veterinary Parasitology*, 187, 63-71. 10.1016/j.vetpar.2011.12.032
- Yun, C.H., Lillehoj, H.S., and Lillehoj, E.P. (2000). Intestinal immune responses to coccidiosis. *Developmental and Comparative Immunology*, 24, 303-324. 10.1016/s0145-305x(99)00080-4
- Scott M.L., 1997. *Poult.Sci.*, (58), 108-115
- Wuttke W., 1976. In *Poultry Nutrition* (fisher edit.) John Wiley and Sons, London, pp456.

SESSION

PATHOLOGIE - PREVENTION

Communications orales

IDENTIFICATION DES INTERACTIONS DE PREDATION ENTRE ARTHROPODES POUR LE DEVELOPPEMENT DE LA LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LE POU ROUGE

Chiron Geoffrey¹, Zriki Ghais², Taudière Adrien², Barnagaud Jean-Yves², Blatrix Rumsais², Roy Lise²

¹ITAVI - 23 rue Jean Baldassini - 69364 LYON CEDEX 07,

²UMR 5175 CEFÉ, CNRS – UM – UPVM3 – EPHE, MONTPELLIER CEDEX 05
chiron@itavi.asso.fr

RÉSUMÉ

CONTEXTE : *Dermanyssus gallinae*, est un acarien hématophage strict d'importance économique en élevage de poules. Il est une excellente cible pour la lutte biologique puisque ne vivant pas sur l'hôte, il se développe dans des interstices divers où il est susceptible de rencontrer des ennemis naturels qui sont principalement des arthropodes prédateurs. Afin de progresser dans le développement de la lutte biologique, en particulier par conservation (stimulation des populations locales), il est nécessaire de démêler les interactions de prédation qui ont lieu entre les arthropodes naturellement présents. Identifier les ennemis naturels directs du pou et les potentiels ennemis de ceux-ci permettra ensuite d'évaluer leur potentiel suppresseur respectif sur le pou, en association ou non avec d'autres organismes. OBJECTIFS: Afin d'identifier les interactions écologiques à favoriser, une reconstruction des réseaux trophiques et une évaluation des interactions entre populations des différentes espèces en conditions d'élevage ont été initiées. METHODE: Le potentiel de prédation et les préférences alimentaires de plusieurs espèces d'arthropodes ont été évalués par des essais comportementaux *in vitro* associés à des tests de χ^2 . Les corrélations entre abondance des populations d'acariens prédateurs et abondance de poux à partir de données issues de 20 bâtiments de poules alternatifs ont été mesurées grâce à un modèle bayésien hiérarchique sur données d'inventaires directs (acariens du fumier), complété par des tests de corrélation de Spearman appliqués à des données d'analyses d'ADN environnemental (arthropodes du bâtiment complet). RESULTATS: Cinq espèces d'acariens, ainsi qu'un pseudoscorpion et une punaise se sont avérés être capables de prédation répétée sur le pou rouge dans nos conditions de laboratoire. Les résultats expérimentaux sont cohérents avec les mesures de corrélation sur données de terrain. Des différences notoires apparaissent en termes de taux de prédation et de proies préférées selon les espèces de prédateurs. Il apparaît en outre que certaines se mangent entre elles. Les implications de ces différents éléments en matière de contrôle biologique sont discutées.

ABSTRACT

Identification of the predation interactions of arthropods for the biological control of the poultry red mite
CONTEXT: The poultry red mite (PRM), *Dermanyssus gallinae*, is a hematophagous mite of economic importance in the poultry industry. PRM is an excellent target for biological control because it lives off-host in habitats potentially shared by many micropredators (arthropods mainly) and these biocontrol agents have potential to regulate this pest in poultry buildings. In order to progress in conservation biological control, it is necessary to disentangle predatory interactions which occur between arthropods naturally present in hen houses. This will allow identifying direct natural enemies of PRM, their potential enemies and evaluating the respective suppressive potential on PRM associated or not with other organisms. OBJECTIVES: In order to identify the ecological interactions to favor, a reconstruction of trophic networks and an evaluation of interactions between the different species populations in farming conditions were initiated. METHOD: the predatory potential and food preference of several arthropod species were evaluated with behavioral trials *in vitro* associated with χ^2 tests. Using a Bayesian hierarchical model, correlations between putative predators' and PRM's abundance were measured with data collected on 20 hen houses (barn, free range or organic): direct inventory data (manure mites) and Spearman correlation applied to environmental DNA data (arthropod communities of the whole building). RESULTS: In lab conditions, five mite species, a pseudoscorpion and a bug were found to be capable of repeated predation on PRM. The experimental results are consistent with correlation measures on field data. Furthermore, it appears that some predatory species feed on each other. The implications of this information are discussed in relation to biological control.

INTRODUCTION

Le pou rouge *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778) est un acarien d'importance économique et sanitaire qui pose problème en élevage de poules partout dans le monde (Sparagano et al. 2014). Il s'agit d'un acarien hématophage strict, mais ses habitudes permettent de le classer parmi les micro-prédateurs *sensu* Lafferty et Kuris (2002). En effet, il ne recherche son hôte que pour de rapides repas, ponctuels, effectués sur différents hôtes et réalise toutes les étapes de son développement dans des micro-habitats disponibles dans le bâtiment. *D. gallinae* est ainsi confiné à l'intérieur des bâtiments d'élevage et est fortement soumis aux interactions avec les organismes qui peuplent les micro-habitats où ses populations se développent (nids, fientes sèches, litière, fumier ...).

L'importante disparité dans la dynamique temporelle des populations du microprédateur observée sur le terrain entre bâtiments similaires, parfois dans la même exploitation (L. Roy, observation personnelle), permet de soupçonner des interactions biotiques fortes. En effet, la dynamique des populations de *D. gallinae* intègre dans la plupart des bâtiments des événements récurrents de pullulation massive (engendrant des dégâts problématiques pour l'éleveur), alors que dans d'autres, elle se réduit à une présence maintenue à bas bruit (présence du microprédateur connue ou non de l'éleveur, absence de dégâts constatés). Si des interactions biotiques expliquent ces disparités, la lutte biologique, qui s'appuie sur l'adage « l'ennemi de mon ennemi est mon ami », pourrait être très prometteuse. En particulier, la Lutte Biologique par Conservation (LBC) consiste à intensifier *in situ* (dans le bâtiment d'élevage) l'activité des ennemis naturellement présents à travers des actions locales.

Pour ce faire, il est nécessaire de déterminer les processus écologiques qui favoriseront l'activité des ennemis du pou rouge. Cependant, si l'adage fondamental peut sembler simple lorsque l'on considère seulement notre « ennemi » (le pou rouge) et l'un de ses ennemis (ex. un prédateur), la situation est en réalité extrêmement complexe puisque de nombreuses espèces cohabitent. Ainsi, les interactions dans les écosystèmes des bâtiments d'élevages, comme dans tout écosystème, peuvent être représentées par une pelote de fils emmêlés. En effet, d'autres ennemis (différents prédateurs et parasites) ainsi que d'autres groupes fonctionnels (ex. détritivores), font partie du réseau d'interactions impliquant le bioagresseur. Les prédateurs sont rarement spécialistes, si bien que les prédateurs du pou rouge peuvent également se nourrir d'autres proies parfois très abondantes en élevage (ex. insectes et acariens détritivores). Cela peut avoir un effet bénéfique en permettant aux populations d'ennemis naturels de se maintenir lorsque la population de pou est très basse. Mais cela peut aussi détourner le prédateur de notre ennemi le pou rouge,

s'il préfère la proie alternative. De plus, il peut exister de la prédation entre prédateurs. Enfin, d'autres organismes peuvent agir en synergie, soit en facilitant l'action des ennemis soit en exerçant une action antagoniste sur le pou (champignons, protozoaires, nématodes, bactéries, ...). Ils peuvent être des parasites du pou rouge et/ou de ses prédateurs, ou encore représenter une nourriture alternative pour ceux-ci.

Le potentiel de LBC contre le pou rouge en élevage de poules a été évalué et validé sur la base d'inventaires d'arthropodes du fumier par El. Adouzi et al. (2017) en s'appuyant sur le cadre défini par Begg et al. (2017). Des arthropodes potentiellement prédateurs d'acariens (insectes, acariens et autres arachnides) ont été montrés susceptibles de percoler depuis les habitats extérieurs dans les bâtiments de poules au sol et de s'y établir. Les pratiques ou aménagements semblent susceptibles d'influencer la composition des communautés d'arthropodes. Afin de définir à terme des recommandations pertinentes pour maximiser l'action bénéfique des ennemis naturels du pou rouge, il nous faut déterminer comment les ennemis potentiels identifiés s'inscrivent dans les réseaux d'interaction en œuvre dans les bâtiments (prédation sur le pou rouge, sur autres invertébrés, entre prédateurs). Les habitudes et préférences alimentaires des espèces d'arthropodes recensées sont globalement mal connues et l'interférence directe ou indirecte d'autres organismes n'a pas été explorée.

Il est impossible d'observer sur le terrain les événements de prédation entre arthropodes et d'en estimer la fréquence et par conséquent l'effet sur les poux. Il est d'autant moins possible d'établir les activités antagonistes ou synergiques des autres petits organismes. De manière à lever ce verrou majeur de l'investigation du service écosystémique « contrôle biologique contre le pou rouge », nous avons développé une approche multi-technique afin de faire émerger des interactions au sein des communautés d'eucaryotes qui se développent en poules. Elle consiste à mettre en convergence des résultats issus d'approches corrélatives sur inventaires terrain et de tests *in vitro* pour reconstruire les réseaux d'interaction entre acariens impliquant le pou. Les premières visent à faire émerger des informations sur les interactions entre espèces sur le terrain à partir de relevés d'abondance. La confrontation de ces propriétés émergentes des communautés d'êtres vivants des bâtiments avec des données biologiques issues de tests de laboratoire permet d'affiner l'information et d'évaluer la robustesse des conclusions. Selon la fréquence des rencontres proie-prédateur et les préférences des prédateurs, l'abondance de ces derniers est susceptible d'être influencée par l'abondance des proies et vice-versa. Des caractéristiques diverses des micro-habitats, des proies et des prédateurs déterminent la fréquence effective des rencontres proie-prédateur (barrières physiques plus ou moins

importantes). Par conséquent, des corrélations sont attendues entre données de comptage de poux et données de comptage des prédateurs qui mangent effectivement le pou dans les bâtiments. Pour s'assurer que les corrélations résultent bien d'interactions de prédation, il est important de s'assurer de la capacité réelle des prédateurs potentiels à se nourrir du pou.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Plan d'échantillonnage et collecte de matériel biologique

Pour réaliser les inventaires, 20 bâtiments (16 exploitations) d'élevages alternatifs de poules pondeuses (code 0 biologique, 1 plein air ou 2 au sol) ont été sélectionnés pour cette étude. Ils sont répartis sur deux zones géographiques : 10 dans le secteur Nord de Lyon (Ain) et 10 dans le secteur Sud de Lyon (Drôme, Gard, Vaucluse). Quatre campagnes de prélèvements ont été organisées à intervalle de 3 mois. Durant le vide sanitaire, les prélèvements n'étaient pas réalisés. Au cours de chaque visite, 5 prélèvements standards de fumier étaient collectés par bâtiment en 5 points sélectionnés au hasard sous les caillebotis. Un volume fixe de fumier était prélevé grâce à des carottiers-mesures adaptés à des flacons de verre de 250 ml. L'intégrité des communautés prélevées était assurée par le blocage du développement des populations d'arthropodes au moment du prélèvement en produisant une vapeur saturante d'acétate d'éthyle dans le flacon. En outre, 2 prélèvements standards de particules en suspension dans l'air étaient collectés au niveau des caillebotis au cours de chaque visite grâce à un biocollecteur à technologie cyclonique (collecte et concentration des particules biologiques dans un liquide, à un haut débit d'air). Pour les tests *in vitro*, du fumier frais, contenant des arthropodes vivants, ainsi que des agrégats frais de pou rouge ont été prélevés dans un sous-échantillon des 20 bâtiments en fonction des données d'inventaire.

1.2 Inventaires terrains

Les arthropodes contenus dans les prélèvements de fumier étaient extraits et concentrés suivant la méthode décrite par Roy et al. (2017), puis identifiés au niveau de la morpho-espèce et comptés au moyen d'une loupe binoculaire. Un tableau des abondances de chaque morpho-espèce par prélèvement a ainsi été généré. Il représente les données d'inventaire d'arthropodes dans le compartiment fumier des bâtiments. Les séquences d'ADN d'eucaryotes contenues dans les particules en suspension dans l'air ont été analysées par métabarcoding. Une région de l'ADN codant l'ARNr 18S était amplifiée et le produit était séquencé suivant la méthode Illumina. L'ensemble des données obtenues a été analysé grâce à un pipeline bioinformatique spécialement développé pour cela. Un tableau des abondances de chaque OTU (unité taxinomiques

opérationnelles ; i.e. « espèces » moléculaires) dans chaque prélèvement a ainsi été obtenu. Il représente les données d'inventaire d'eucaryotes présents dans les bâtiments, tous compartiments confondus.

1.3. Tests de prédation *in vitro*

Afin de reconstruire le réseau des interactions possibles en l'absence de l'hétérogénéité du terrain (absence de barrière physique entre proies et prédateurs), des tests de prédation *in vitro* ont été réalisés sur les arthropodes les plus susceptibles d'être capables de prédation sur acariens (acariens autres que détritivores, araignées, pseudoscorpions, punaises). Les arthropodes, prélevés avec leur substrat sur le terrain, ont été extraits du fumier par tamisage à sec, puis individualisés dans des microplaques 96 puits en polystyrène transparent à fonds plats recouvertes de parafilm étiré. Ils ont été placés en contact avec 1 ou 2 types de proies (espèces ou stades différents). Les observations sont réalisées 24h après en différenciant les proies vivantes des mortes. Le test de prédation est répété sur plusieurs dizaines d'individus et dans au moins deux séries différentes. Enfin, les données ont été traitées avec le logiciel R au moyen de tests de chi-2 afin d'évaluer la significativité des différences de choix entre proies.

1.4. Approches corrélatives

Afin d'évaluer la force des interactions effectives sur le terrain, les analyses suivantes ont été réalisées au moyen du logiciel R. Les données d'inventaire à partir du fumier ont été analysées au moyen d'un modèle bayésien hiérarchique. Nous avons fait le choix d'analyser ici exclusivement les interactions entre acariens, groupe le plus susceptible de contenir une diversité de prédateurs d'acariens. Ce modèle permet d'évaluer les tailles d'effet entre abondances de proies (pou rouge seul) et de prédateurs potentiels (acariens appartenant à des familles de prédateurs ou d'omnivores d'après la littérature) en prenant en compte l'effet aléatoire ou non de différentes covariables (saison, région, âge de bande, type de conduite, bâtiments). Les morpho-espèces strictement détritivores ou rarement recensées (donc *a priori* peu adaptées aux conditions d'élevage) n'ont pas été intégrées au modèle.

Des tests de corrélation de Spearman (avec des corrections pour test multiple) ont été appliqués aux données de métabarcoding « air » entre abondance de l'OTU *D. gallinae* et abondance des OTUs correspondant à chacune des morpho-espèces d'acariens prédateurs potentiels. Pour ce faire, les OTUs ont été regroupées par entités correspondant à la délimitation taxinomique des morpho-espèces recensées. Des tests similaires ont été appliqués entre abondance de l'OTU *D. gallinae* et abondance des OTUs correspondant à des taxons d'eucaryotes non acariens à l'exception des plantes et des vertébrés (champignons, protozoaires, nématodes ...).

1.5 Estimation de la charge en poux rouges

Un point crucial était de s'assurer que l'infestation du bâtiment était bien représentée par les données d'inventaire. Les mesures réalisées à partir du fumier sont robustes (recensements directs), mais ne représentent qu'un compartiment du bâtiment (partie sous caillebotis). Les mesures réalisées à partir de l'ADN en suspension dans l'air représentent *a priori* la population de pou rouge de l'ensemble du bâtiment, mais sont susceptibles d'être fortement biaisées (non linéarité de la relation entre nombre de séquences d'ADN et nombre d'individus probable). Afin d'évaluer la représentativité de nos mesures, des méthodes empiriques de monitoring ont été mises en œuvre : les présences/absences de poux rouges ont été relevées sur 2 caillebotis, 2 nids et 2 perchoirs par bâtiment au cours de chaque visite (relevés visuels). De plus, un suivi mensuel était effectué à l'aide de 10 SPT (Simple Passive Trap, Chiron et al. 2014) par bâtiment. Les corrélations entre les données pou rouge « fumier » et « air » ont été mesurées, ainsi qu'entre les données « air » et des données de monitoring empirique (moyenne des relevés visuels (0 ou 1) par visite et pourcentage maximum par relevé pour les SPT).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les données d'inventaires des eucaryotes du bâtiment total (métabarcoding « air ») concordent avec les données d'inventaires « fumier » puisque les abondances de séquences d'OTUs sont dans la majeure partie des cas significativement corrélées positivement à l'abondance des individus comptés dans le fumier (non montré). En outre, des corrélations positives significatives ont été mesurées entre les valeurs associées au pou rouge dans les données quantitatives « fumier » et « air » ($p=0,57$; $p < 0,001$), ainsi qu'entre ces dernières et les données semi-quantitatives du monitoring empirique (max. SPT: $p=0,33$; $p=1,3.10^{-6}$, moyenne des relevés visuels : $p=0,41$; $p=9,7.10^{-10}$). Cela nous permet de considérer (1) que la méthode de métabarcoding « air » (ADN environnemental) permet une quantification satisfaisante de la charge en poux d'un bâtiment, (2) que les données d'inventaire «fumier» sont bien représentatives de la population de poux de l'ensemble du bâtiment.

Les résultats de l'ensemble des analyses sont pleinement concordants, ce qui suggère une certaine robustesse des résultats d'ensemble. Les tests de prédation *in vitro* mettent à jour une capacité de prédation marquée sur le pou rouge chez seulement trois genres d'acariens communs (au moins 5 espèces) en bâtiments d'élevage (*Androlaelaps*, *Macrocheles*, *Cheyletus*), plus une espèce très rarement recensée (*Parasitus fimetorum*). D'autres arthropodes ont été montrés friands de pou rouge *in vitro* : une araignée, un pseudoscorpion et une punaise. Si l'on considère l'ensemble des arthropodes, seuls les trois genres

d'acarien ci-dessus permettent de mesurer des corrélations marquées avec l'abondance du pou rouge, que ce soit dans le compartiment « fumier » (modèle bayésien ; focus sur les acariens, Tab. 1) ou dans le bâtiment total (test de Spearman ; *Androlaelaps casalis* : $p=0,39$; $p=0,0009$; *Macrocheles* spp: $p=0,27$; $p=0,025$ et *Cheyletus* spp $p=0,29$ et $p=0,016$; autres arthropodes: $p>0,05$).

Tableau 1. Ampleur de l'effet de l'abondance de 3 morphoespèces de prédateurs sur *D. gallinae* (modèle bayésien hiérarchique). Les valeurs indiquées représentent les médianes des densités de probabilité postérieure des coefficients de régression (en blanc effet positif, en noir effet négatif, en gris faible effet)

	Fumier		
	<i>Cheyletus</i> sp p	<i>Macrochele</i> s spp	<i>Androlaelap</i> s <i>casalis</i>
Sol	(0,0055)	+ (0.043)	+ (0.040)
Plein air	- (-0.075)	- (0.048)	+ (0.035)
AB	- (-0.025)	(0.0065)	+ (0.037)

Le sens des corrélations est dans l'ensemble essentiellement positif, contrairement à ce que l'on attendrait d'agents de contrôle biologique efficaces. Seuls *Macrocheles* spp et *Cheyletus* spp montrent des corrélations négatives, mais seulement dans certains modes de conduite et uniquement dans le compartiment «sous caillebotis» (Tab. 1). Afin d'interpréter ces résultats, il est important d'avoir à l'esprit que la relation proie-prédateur n'est pas symétrique : plus il y a de prédateurs, moins il y a de proies (du moins si le prédateur est « efficace »), mais aussi plus il y a de proies, plus il y a de prédateurs. Les corrélations négatives dans le compartiment fumier pour *Macrocheles* spp et *Cheyletus* spp permettent de supposer qu'il s'agit de prédateurs intéressants. Cependant, les corrélations positives sont encourageantes aussi, car elles suggèrent que la prédation a bien lieu de manière répétée, bien que de manière insuffisante pour réguler les populations du pou rouge dans les conditions actuelles. Cela suggère une activité de prédation réelle par *Macrocheles* spp, *Androlaelaps casalis* et *Cheyletus* spp sur le pou rouge dans l'ensemble des bâtiments de poudeuses actuels. Sachant que l'on observe des variations conséquentes selon le mode de conduite dans les données «fumier», il est possible que l'on puisse agir localement pour augmenter l'effet des prédateurs *in situ*. Par exemple, l'utilisation d'antiparasitaires digestifs est communément pratiquée pour les élevages plein air (biologique ou non) ce qui n'est pas le cas pour les élevages au sol étudiés. Des effets secondaires non remarqués, tels qu'une mortalité accrue des prédateurs du pou, pourraient éventuellement être levés par des ajustements dans les pratiques. En outre, une exploration plus poussée des exigences et habitudes

des prédateurs pourraient amener à des préconisations permettant d'augmenter la fréquence des rencontres entre pou et prédateur (modification des sites d'agrégation du pou par des modifications structurelles ou par l'usage d'attractants de synthèse).

De plus, les résultats montrent que les prédateurs intéressants identifiés sont également capables de prédation sur d'autres proies (astigmatés ou *Dendrolaelaps* spp), mais tendent à préférer le pou rouge en cas de choix possible entre deux espèces (tests de χ^2 significatif pour les trois genres candidats avec un seuil $\alpha = 5\%$). Cela suggère la présence de proies alternatives utiles, sans effet de détournement des ennemis. Le maintien voire le développement des populations d'ennemis naturels sur ces proies, durant les périodes où les populations de poux sont faibles, sont susceptibles de permettre d'éviter des pullulations de poux lors des périodes favorables. Enfin, de la prédation entre prédateurs a été relevée entre plusieurs espèces d'arthropodes. Par exemple, *Macrocheles penicilliger* et le pseudoscorpion sont capables de prédation sur *Androlaelaps casalis*. De plus, *Macrocheles penicilliger* et le pseudoscorpion sont capables de prédation l'un envers l'autre. Des effets antagonistes vis-à-vis du contrôle biologique pourraient être associés à la présence de ces espèces. Mais le contraire est aussi possible, puisque les études réalisées à ce jour en filières végétales montrent plus souvent des effets neutres ou positifs que négatifs de la prédation entre prédateur sur le contrôle biologique (Janssen et al. 2007).

Si l'on considère l'ensemble des eucaryotes, aucune corrélation significative n'a été mesurée avec des OTUs d'insectes ni d'arachnides non acariens. Cela suggère notamment que les trois autres espèces d'arthropodes montrées capables de prédation répétée sur le pou *in vitro* n'ont pas suffisamment l'occasion de l'y rencontrer. Des amendements sont peut-être à envisager pour favoriser leur rencontre. En outre, 92

OTUs de champignons et 5 OTUs de nématodes montrent des corrélations significatives positives avec le pou rouge. Enfin, 58 OTUs de champignons ont permis de mesurer des corrélations significatives négatives (groupes des *Pezizomycotina* et *Saccharomycotina* ; identification à affiner). Certains champignons pourraient donc constituer des agents biologiques intéressants, à favoriser de concert ou non avec les acariens candidats ci-dessus.

CONCLUSION

Les résultats ont permis de mettre en évidence la présence de 3 genres (au moins 5 espèces) d'acariens prédateurs potentiellement intéressants car capables de se nourrir préférentiellement sur le pou rouge. De manière intéressante, plusieurs espèces d'arthropodes autres qu'acariens ont montré *in vitro* une capacité de prédation marquée sur le pou (une punaise, un pseudoscorpion et une araignée), mais ne semblent pas le rencontrer assez souvent. Enfin, des champignons dont l'identité reste à préciser pourraient constituer des agents de choix pour le contrôle du pou. Tout cela ouvre le champ d'exploration des ennemis naturels à encourager. Les interactions sont cependant très nombreuses et les travaux nécessitent d'être poursuivis afin de déterminer les assemblages les plus prometteurs pour la lutte contre le pou rouge (impact de la présence de proies alternatives au pou rouge, impact de la prédation entre prédateurs, rôle d'autres organismes comme les nématodes ou les champignons dans les interactions).

REMERCIEMENTS

Nous remercions les nombreuses personnes qui ont contribué au projet par leur participation aux prélèvements sur le terrain et aux analyses au laboratoire. Cette étude a été financée par la région Auvergne-Rhône-Alpes via le PEP avicole, par l'Europe (FEADER) et par le CNPO.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Begg, G.S., Cook, S.M., Dye, R., Ferrante, M. *et al.*, 2017. Crop Prot. 97,145–158
 Chiron G., Varescon A., Lubac S., Bicout D.J., *et al.*, 2014. TeMA (32), pp 27-34
 El Adouzi M., Chiron G., Le Peutrec G., Gambin T., *et al.*, 2017. 12èmes JRA-JRPFG, pp 274 – 278
 Lafferty, K.D., Kuris, A.M., 2002. Ecol. Evol. 17, 507–513
 Lesna, I., Wolfs, P., Faraji, F., Roy, L., *et al.*, 2009. Exp. Appl. Acarol. 48, 63–80
 Janssen A., Sabelis M.W., Magalhães S., *et al.*, 2007. Ecology, Vol 88 Issue 11, pp 2713-2719
 Roy L., El Adouzi M., Moraza M.L., *et al.*, 2017. Biol. Control 114 (2017) pp176–194
 Sparagano, O.A.E., George, D.R., Harrington, D.W.J., *et al.*, 2014. Annu. Rev. Entomol. 59, 447–466

CARACTERISATION DES NIVEAUX D'INFESTATION DE PETITS TENEBRIONS DANS DES BATIMENTS DE VOLAILLES DE CHAIR : IMPACTS DES PRATIQUES D'ELEVAGE, DES PROTOCOLES DE LUTTE ET DE LA STRUCTURE DES BATIMENTS

**Rousset Nathalie¹, Chiron Geoffrey¹, Choisis Norma Patricia², Michel Charlotte³,
Deruwez Julie³, Pigache Elodie³, Benoît Sally¹, Galliot Pascal¹, Bonnefoy Martin¹, Dinh
Anthony¹, Dalleau Francis², Renault David⁴ et Colinet Hervé⁴**

¹ ITAVI, 7 rue du Faubourg Poissonnière, 75009 Paris, France

² GDS Réunion, 1 rue du Père Hauck, PK23, Bâtiment E/F/G, 97418 La Plaine Des Cafres,
France

³ Chambre Régionale d'Agriculture des Pays de la Loire, 9 rue André Brouard CS 70510,
49105 Angers Cedex 07,
France

⁴ Université de Rennes 1, UMR Ecobio CNRS 6553, 263 Avenue du Gal Leclerc, CS 74205,
35042 Rennes Cedex, France

rousset@itavi.asso.fr

RÉSUMÉ

Le petit ténébrion (ptT) est un insecte posant des problèmes écologiques, sanitaires et économiques en élevage de volailles. De régime alimentaire mycophage et carnivore, il recherche la chaleur et l'obscurité. Afin de caractériser les niveaux d'infestation, en relation avec les pratiques d'élevage, de lutte contre cet insecte et la structure des bâtiments, des piégeages ont été réalisés en début de lot, puis avant l'enlèvement des animaux (1 piège pour 100 m²), dans 47 bâtiments de poulets (Bretagne, Pays-de-la-Loire, Auvergne-Rhône Alpes et Ile de la Réunion), ainsi que dans 26 bâtiments de dindes (en métropole uniquement). Un questionnaire a permis de recueillir les informations sur les éléments structurels et organisationnels des élevages enquêtés, ainsi que les pratiques de désinsectisation. Les résultats indiquent que les infestations en fin de lot étaient moins élevées en poulets (55 ± 89 ptT/piège) qu'en dindes (165 ± 209 ptT/piège). Certaines caractéristiques structurelles (ex : 52 ± 78 ptT/piège sur sol bétonné vs 123 ± 172 ptT/piège sur sol en terre battue ; $p < 0,01$), et pratiques d'élevage (ex : 91 ± 180 ptT/piège avec une litière de copeaux ou cosses de sarrasin vs 108 ± 125 ptT/piège avec de la paille ; $p = 0,01$) étaient associées à des niveaux d'infestation plus faibles. Si l'utilisation d'insecticides apparaît comme un moyen de lutte nécessaire, il semble important de recommander aux éleveurs de réaliser un bilan de leurs pratiques. La limitation des sites de nymphose et de refuge hivernal, la réduction des sources de nourriture des ptT, l'évacuation des ptT présents dans la litière durant le vide sanitaire sont à intégrer dans les moyens de lutte.

ABSTRACT. Characterization of infestation level of lesser mealworms in poultry houses: impacts of farm management practices, control protocols, and structural factors of poultry houses

The lesser mealworm (lmw) is an insect, which raises ecological, health and economic issues. It is typically mycophagous and carnivorous, and looks for warmth and darkness. The aim of this study was to characterize the levels of infestation, in relation with the farm management practices, insecticide uses and structural characteristics of poultry houses. Trapping was carried out at the beginning of the flock and before birds removal (1 trap per 100 m²), in 47 broiler houses (in Brittany, Pays-de-la-Loire, Auvergne-Rhône-Alpes and Reunion Island), as well as in 26 turkey houses (in metropolitan France only). The structural and organizational characteristics of farms were surveyed as well as insecticide uses. The results indicate that infestations were lower in broiler houses (55 ± 89 lmw per trap) than in turkey houses (165 ± 209 lmw per trap). Some structural characteristics of poultry houses (eg, 52 ± 78 lmw per trap on concrete floor vs 123 ± 172 lmw per trap on clay soil, $p < 0.01$), and farm management practices (eg 91 ± 180 lmw per trap with wood chips litter or buckwheat hulls vs 108 ± 125 lmw per trap with straw litter, $p = 0.01$) were associated with lower levels of infestation. The use of insecticides appears necessary to control lesser mealworm. Nevertheless, it seems important to recommend that farmers check farm management practices. The reduction of pupation area and winter refuge sites, the reduction of feed sources, the evacuation of insects present in the litter between two poultry batches, are some possible means of control.

CONTEXTE ET INTRODUCTION

Le petit ténébrion (ptT), *Alphitobius diaperinus*, est un coléoptère d'origine tropicale, invasif et nuisible, que l'on retrouve maintenant dans la plupart des bâtiments d'élevages de volailles de chair en France et dans d'autres régions du monde. Il y retrouve des conditions propices à son développement (chaleur, obscurité, nourriture) (Salin, 1999). Les larves ont un régime mycophage et carnivore (aliments des volailles en décomposition, œufs et larves de mouches). Elles vivent dans la litière à l'abri de la lumière ainsi que dans le matériau d'isolation des bâtiments qui constitue un endroit idéal pour réaliser leur nymphose. L'adulte, essentiellement mycophage, migre dans la litière où il va trouver sa nourriture, et pondre les œufs (Anses, 2011).

La pulvérisation d'insecticides de synthèse représente le principal moyen de lutte utilisé par les éleveurs (Salin et al., 2003). Leur utilisation est cependant contraignante, leur application devant être réalisée en l'absence de volailles, et nécessite la mise en œuvre de précautions pour l'opérateur. Par ailleurs, ces insecticides s'avèrent partiellement efficaces. En effet, la litière est susceptible d'en absorber une partie, limitant ainsi l'exposition aigüe des ptT au traitement chimique (Despins et al. 1991). Cet insecte pourrait également se soustraire à l'exposition par évitement comportemental (Wohlgemuth, 1989). Enfin, l'apparition de phénomènes de résistance aux insecticides a pu être observée dans certaines exploitations (Lambkin et Rice, 2006 ; Mustac et al. 2013).

Le ptT s'est en partie adapté aux basses températures durant le vide sanitaire, ce qui favorise les infestation récurrente d'un lot de volailles à l'autre (Salin, 1999 ; Renault, 2002). Les niveaux d'infestation sont cependant très variables d'un bâtiment à l'autre (Safrit, 1983 ; Safrit et Axtell, 1984). Les conditions environnementales extérieures semblent jouer un rôle important (Salin, 1999), mais on peut supposer que la variabilité existante en termes de structuration et d'organisation des ateliers avicoles, influent de manière plus ou moins importante sur le maintien des populations dans certains bâtiments. Le travail présenté dans cet article a pour objectif de caractériser les niveaux d'infestation des bâtiments de volailles de chair en France, en relation avec les pratiques d'élevage, de stratégies de lutte mises en place contre cet insecte et de la structure des bâtiments.

1. METHODES

1.1 Dénombrement d'insectes par piégeage et description des bâtiments d'élevage suivis

Des dénombrements d'adultes de PtT ont été réalisés dans des bâtiments d'élevage de poulets de chair et de dindes de chair durant un lot de volailles pour chaque bâtiment. Pour ce faire, des pièges expérimentaux passifs « tube traps » servant de gîte pour le PtT (Arends, 1987, Strother & Steelman, 2001) ont été

utilisés. Ces pièges sont constitués d'un tube PVC de 23 cm de long et de 4 cm de diamètre, dans lequel une double feuille de papier essuie-tout, pliée en accordéon, est introduite afin de créer des cavités. Les extrémités des tubes ont été clôturées à l'aide d'un filet à oiseaux souple, maintenu par un collier plastique empêchant les poussins de s'y introduire. Les pièges sont installés pour une période de 7 jours, en les enfouissant dans la litière, au contact du sol, le long des soubassements du bâtiment. Le nombre total de pièges installés a été standardisé à 1 piège pour 100 m² ; les pièges ont été répartis de manière équitable de chaque côté du bâtiment, équidistant les uns des autres, en évitant les zones plus froides et/ou humides (> 1 m des portes latérales, des ventilateurs et > 4 m des pignons). Deux périodes de piégeage ont été conduites dans les bâtiments de poulets de chair, et trois périodes pour les bâtiments de dindes de chair. En début de lot (poulets et dindes), les pièges sont ouverts 24 à 48 h avant l'arrivée des poussins. Avant le départ des femelles (dindes), les pièges sont ouverts 8 à 10 jours avant le départ des femelles pour l'abattoir. En fin de lot (poulets et dindes), les pièges sont ouverts 8 à 10 jours avant le 1^{er} départ des poulets ou des dindons pour l'abattoir. En fin de période de piégeage, le contenu de chaque piège est relevé individuellement et le nombre d'individus adultes par piège a ensuite été déterminé par comptage. Un questionnaire a permis de recueillir les informations sur éléments structurels et organisationnels des élevages enquêtés, ainsi que les pratiques de désinsectisation.

1.2 Analyse des données

Une analyse descriptive de la distribution de l'ensemble des variables a été réalisée (logiciels Excel et R). La normalité du « Nombre moyen de ptT par piège en fin de lot » a été vérifiée (test de Shapiro-Wilk). Les variables potentiellement explicatives ont ensuite été transformées en variables qualitatives à 2 ou 3 modalités, avant de réaliser une analyse bivariée afin d'étudier les liens avec la variable à expliquer (non-normale) (test de Kruskal-Wallis, seuil p=0,10).

2. RESULTATS

2.1 Description des bâtiments

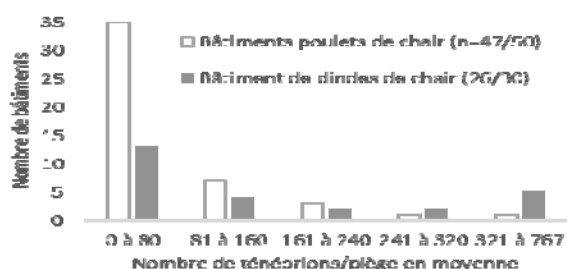
Soixante-treize bâtiments ont été enquêtés, (47 en poulets de chair, et 26 en dindes de chair). 79 % des bâtiments de poulets étaient localisés en métropole, dont 16 bâtiments en région Bretagne, 9 en région Pays-de-la-Loire et 12 en région Auvergne-Rhône-Alpes. Les 10 derniers étaient localisés sur l'île de la Réunion. L'ensemble des bâtiments de dindes était en revanche localisé en métropole (15 bâtiments en région Bretagne, 1 bâtiment en région Pays-de-la-Loire et 10 en région Auvergne-Rhône-Alpes). La moyenne d'âge des bâtiments de poulets était de 21 ans (1 à 48 ans), et de 26 ans (1 à 44 ans) pour les bâtiments de dindes. Pour les deux espèces de volaille, la surface moyenne des bâtiments était de

1 100 m² environ (de 200 à 1 600 m² en production de poulets, et de 400 à 1 900 m² en production de dindes). Vingt-huit bâtiments possédaient un sol bétonné, dont 24 en production de poulets. Les soubassements pouvaient être considérés comme lisses (sans aspérité, sans grosses fissures) pour 42 bâtiments, dont 24 en production de poulets (7 données manquantes), 18 en production de dindes. Des copeaux ou de la cosse de sarrasin ont été utilisés pour la litière des animaux (premier paillage) dans 27 bâtiments dont 14 en production de poulets, et 13 en production de dindes. 40 autres éleveurs ont utilisé de la paille broyée (6 données manquantes). Cinquante-sept éleveurs ont utilisé au moins un insecticide pour le lot suivi au cours de l'étude (40 en production de poulets et 17 en production de dindes). La famille des pyrèthrinoides a été utilisée soit seule, ou en association avec une autre famille de molécules par presque 2/3 des éleveurs ayant utilisé un insecticide (24 éleveurs de poulets et 10 éleveurs de dindes, 1 donnée manquante).

2.2 Des niveaux d'infestation en fin de lot très variables

Tous bâtiments confondus, le niveau d'infestation moyen en fin de lot a été de 94 ± 145 ptT/piège (n=73). On note une grande variabilité inter-bâtiment allant de 0 ptT/piège à un maximum de 767 ptT/piège. On peut également souligner que pour 50 % des bâtiments, il a été dénombré moins de 27 ptT/piège en moyenne. Les bâtiments de poulets de chair sont apparus moins infestés en moyenne, avec également une variabilité inter-bâtiment moins importante, (55 ± 85 ptT/piège, n=47), que les bâtiments d'élevage de dindes de chair (163 ± 198 ptT/piège, n=26) ($p = 0,02$) (figure 1).

Figure 1. Distribution de fréquence des niveaux d'infestation de ptT dénombrés en fin de lot en fonction de l'espèce de volaille élevée dans le bâtiment

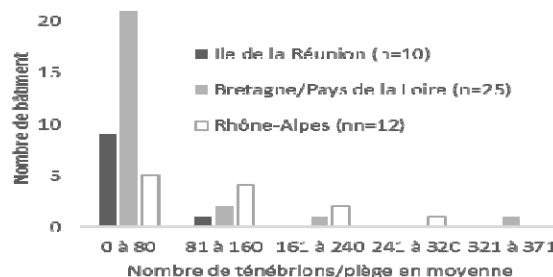


La variabilité intra-bâtiment semble faible avec 61 bâtiments (84 %) dont l'écart-type se situe entre 0 et 0,5 fois la moyenne, et 9 bâtiments (12 %) dont l'écart-type se situe entre 0,5 et 1 fois la moyenne. Trois bâtiments présentent une variabilité intra-bâtiment plus importante (écart-type entre 1 et 2,5 fois la moyenne).

2.3 Des niveaux d'infestation en fin de lot différents entre les régions

Un effet régional a été mis en évidence ($p < 0,01$) avec un niveau d'infestation plus faible en moyenne pour les bâtiments sur l'Ile de la Réunion (17 ± 45 ptT/piège, n=10), puis en Pays-de-la-Loire (27 ± 33 ptT/piège, n=10), et plus élevé en Bretagne (105 ± 181 ptT/piège, n=31), et en Rhône-Alpes (143 ± 126 ptT/piège, n=22). Pour le sous-échantillon des bâtiments de poulets de chair, l'effet régional a également été observé ($p < 0,01$), ce qui n'est pas le cas pour les bâtiments de dindes. Ainsi, un niveau d'infestation plus faible a été dénombré pour les bâtiments de l'Ile de la Réunion (17 ± 45 ptT/piège en moyenne, n=10), puis pour les bâtiments en Bretagne/Pays-de-la-Loire (44 ± 85 ptT/piège, n=25), et plus élevé en région Rhône-Alpes (111 ± 89 ptT/piège, n=12) (figure 2).

Figure 2. Distribution des niveaux d'infestation de ptT dénombrés en fin de lot de poulets de chair en fonction de la région



2.4 Les dénombrements en début et cours de lot, indicateurs des niveaux d'infestation finaux

Les bâtiments peu ou pas infestés en début de lot se sont révélés également moins infestés en moyenne en fin de lot (87 ± 152 ptT/piège pour les bâtiments ≤ 1 insecte/piège en début de lot, n=47 ; vs 105 ± 132 ptT/piège pour les autres, n=26) ($p < 0,10$). Cet effet est également ressorti pour le sous échantillon des bâtiments de poulets de chair localisés dans le Grand Ouest (Bretagne et Pays-de-la-Loire) (13 ± 24 ptT/piège pour les bâtiments ≤ 1 insecte/piège en début de lot, n=13 ; vs 78 ± 113 ptT/piège pour les autres, n=12) ($p < 0,05$). On peut souligner également que les bâtiments de dindes de chair peu ou pas infestés au départ des femelles pour l'abattoir (≤ 1 insecte/piège) sont apparus moins infestés en moyenne en fin de lot (45 ± 79 ptT/piège, n=11 ; vs 283 ± 228 ptT/piège pour les autres, n=11) ($p < 0,01$).

2.5 Un impact des facteurs structurels des ateliers et des bâtiments sur les infestations en fin de lot

Les bâtiments faisant partie d'ateliers avicoles multi-sites (≥ 2 sites) ont été moins infestés en fin de lot en moyenne (23 ± 54 ptT/piège pour les bâtiments faisant partie d'ateliers ≥ 2 sites, n=12 ; vs 106 ± 153 ptT/piège pour les autres, n=61) ($p=0,05$). En outre, les bâtiments d'une surface supérieure à 1 000 m² ont également été moins infestés en moyenne (93 ± 119

ptT/piège pour les bâtiments $> 1\,000\text{ m}^2$, $n=51$; vs 99 ± 199 ptT/piège pour les autres, $n=21$; 1 données manquante) ($p = 0,05$). On note que ces deux variables explicatives ne sont pas ressorties significativement associées au niveau d'infestation en fin de lot pour les sous échantillons de bâtiments tenant compte de l'espèce de volailles et de la région. Par ailleurs, les bâtiments équipés d'un sol bétonné ont présenté un niveau d'infestation plus faible en moyenne (43 ± 69 ptT/piège pour les bâtiments équipés d'un sol bétonné, $n=28$; vs 125 ± 169 ptT/piège pour les bâtiments équipés d'un sol en terre battue, $n=45$) ($p<0,01$). Un effet du type de sol a également pu être mis en évidence pour les bâtiments de poulets de chair du Grand Ouest (10 ± 20 ptT/piège pour les bâtiments équipés d'un sol bétonné, $n=7$; vs 57 ± 97 ptT/piège pour les bâtiments équipés d'un sol en terre battue, $n=18$) ($p = 0,02$).

Pour finir, deux facteurs structurels sont ressortis significativement liés au niveau d'infestation en fin de lot, mais uniquement sur des sous échantillons de bâtiments tenant compte de l'espèce de volailles et de la région. Ainsi, pour les bâtiments de poulets de chair situés en Rhône-Alpes, la présence de soubassements lisses (sans aspérités ou grosses fissures) a été associée à un niveau d'infestation plus faible en fin de lot en moyenne (72 ± 46 ptT/piège pour les bâtiments équipés de soubassement lisses, $n=7$; vs 148 ± 94 ptT/piège pour les autres, $n=4$, 1 donnée manquante) ($p = 0,10$). Enfin, les bâtiments de poulets de chair de l'Île de la Réunion et équipés de jonctions étanches entre deux panneaux latéraux des longs pans, sont apparus moins infestés en fin de lot en moyenne (1 ± 2 ptT/piège pour les bâtiments équipés de jonctions étanche entre deux panneaux latéraux, $n=3$; vs 32 ± 63 ptT/piège pour les autres, $n=5$, 2 données manquantes) ($p < 0,10$).

2.6 Un impact des pratiques d'élevage et des protocoles de luttés sur les infestations en fin de lot

L'absence de stockage de litière, ou un stockage éloigné du bâtiment suivi lors de l'étude a été associé à un niveau d'infestation en fin de lot plus faible en moyenne (66 ± 99 ptT/piège en cas d'absence de stockage de litière ou $> 50\text{ m}$ du bâtiment, $n=43$; vs 126 ± 153 ptT/piège dans le cas contraire, $n=25$, 5 données manquantes) ($p < 0,05$). Par ailleurs, la sortie du matériel intérieur (assiettes, trémies...) pour le nettoyage et la désinfection, a également été associée à un niveau d'infestation plus faible en moyenne en fin de lot (73 ± 155 ptT/piège en cas de sortie du matériel intérieur lors du nettoyage et désinfection, $n=27$; vs 118 ± 144 ptT/piège dans le cas contraire, $n=40$, 6 données manquantes) ($p = 0,05$). On note que ces deux variables explicatives ne sont pas significativement associées au niveau d'infestation en fin de lot pour les sous échantillons de bâtiments tenant compte de l'espèce de volailles et de la région. Par ailleurs, un niveau d'infestation plus faible a été observé en moyenne pour les bâtiments dans lesquels les éleveurs ont utilisé des copeaux ou des cosses de sarrasin lors du primo-paillage (91 ± 180 ptT/piège,

$n=27$), en comparaison à l'utilisation de la paille broyée (108 ± 125 ptT/piège, $n=40$) ($p = 0,01$). Cet effet est également ressorti significatif ($p < 0,10$) pour les bâtiments de poulets de chair du Grand Ouest (20 ± 38 ptT/piège pour l'utilisation de copeaux ou de cosses de sarrasin, $n=5$; vs 65 ± 104 ptT/piège pour l'utilisation de paille broyée, $n=16$), mais pas pour les autres sous échantillons. En outre, l'utilisation d'un insecticide d'une autre famille que les pyréthrinoides a également été associée à un niveau d'infestation plus faible en moyenne (35 ± 54 ptT/piège, $n=22$), en comparaison à l'utilisation d'insecticides de cette famille de molécules (utilisée seule ou en association avec d'autres familles) (106 ± 162 ptT/piège, $n=34$), ou même en l'absence d'utilisation d'insecticides (et sans autres moyens de lutte alternatifs) (148 ± 172 ptT/piège, $n=16$) ($p<0,10$). Ce protocole de désinsectisation est ressorti également significatif pour les bâtiments de poulets de chair en région Rhône-Alpes (62 ± 58 ptT/piège lors de l'utilisation d'insecticides d'une autre famille que les pyréthrinoides, $n=7$; vs 178 ± 82 ptT/piège en cas d'utilisation d'insecticides de cette famille, $n=5$) ($p<0,10$), mais aussi pour les bâtiments d'élevage de dindes de chair (44 ± 76 ptT/piège lors de l'utilisation d'insecticides d'une autre famille que les pyréthrinoides, $n=6$; vs 233 ± 239 ptT/piège en cas d'utilisation d'insecticides de cette famille, $n=10$, 1 donnée manquante) ($p = 0,10$).

Certaines pratiques d'élevage sont également liées au niveau d'infestation en fin de lot pour des sous échantillons de bâtiments. Ainsi, pour les bâtiments de poulets de chair du Grand Ouest, le rajout de litière propre en cours de lot est apparu comme une pratique favorisant un niveau d'infestation plus faible en moyenne (29 ± 60 ptT/piège dans le cas de rajout de litière, $n=15$; vs 74 ± 117 ptT/piège dans le cas contraire, $n=9$, 1 donnée manquante) ($p<0,10$). On observe également pour ces bâtiments qu'un curage précoce du fumier est associé à un niveau d'infestation plus faible en moyenne (45 ± 108 ptT/piège dans le cas d'un curage $\leq 24\text{ h}$ après l'enlèvement des volailles, $n=11$; vs 50 ± 67 ptT/piège dans le cas contraire, $n=12$, 1 donnée manquante) ($p=0,10$). Une distribution d'aliment de démarrage, la plus proche de la mise en place, réduit le niveau d'infestation de ptT (21 ± 29 ptT/piège dans le cas où l'aliment est distribué $\leq 24\text{ h}$ avant l'arrivée des volailles, $n=15$; vs 110 ± 140 ptT/piège dans le cas contraire, $n=7$, 3 données manquantes) ($p<0,05$). Pour les bâtiments de poulets de chair sur l'Île de la Réunion, la vidange des silos d'aliment pour volailles lors du vide sanitaire précédent le lot suivi lors de notre étude favorise un niveau d'infestation plus faible de ptT en fin de lot en moyenne (2 ± 3 ptT/piège dans le cas où les silos ont été vidangés, $n=6$; vs 40 ± 70 ptT/piège dans le cas contraire, $n=4$) ($p<0,10$). En fin, pour les bâtiments de poulets de chair en Rhône-Alpes, la proximité du lieu de stockage du congélateur pour les volailles mortes est également associée à un niveau d'infestation plus faible en fin de lot en moyenne (84 ± 66 ptT/piège

dans le cas où le congélateur > 50 m du bâtiment, $n=7$; vs 183 ± 88 ptT/piège dans le cas contraire, $n=4$, 1 donnée manquante) ($p=0,10$).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Cette étude a confirmé l'existence d'une forte variabilité des niveaux d'infestation des bâtiments de volailles par le petit ténébrion. La durée du lot, plus longue en production de dindes de chair (130 jours environ, Chambres d'agriculture du Grand-Ouest, 2017), permet sans doute à l'insecte de se développer plus facilement, ce qui pourrait expliquer le niveau d'infestation plus important qu'en production de poulets, mis en évidence dans cette étude. La fréquence des traitements insecticides, et celle des vides sanitaires permettant de refroidir le bâtiment, sont de fait plus faibles qu'en production de poulets. La gestion du vide sanitaire semble donc jouer un rôle primordial pour le contrôle des pullulations, comme le suggèrent les liens observés entre les faibles niveaux d'infestation en début et fin de lot de poulets, et en cours et fin de lot de dindes.

Les résultats obtenus ont également souligné l'importance de la structure des bâtiments. Selon Salin et al., (2000), les sols en terre battue peuvent constituer des sites de nymphose ou des refuges d'hivernage. Les ptT peuvent s'y enterrer, en particulier aux endroits peu compacts, peu denses et peu humides (sous les mangeoires par exemple). Le bétonnage du sol constituerait ainsi un levier de contrôle des pullulations de ptT, même s'il n'est pas suffisant pour éradiquer les infestations. La conception des murs et leur entretien y contribueraient également, en limitant les possibilités de migration des larves et des adultes vers les matériaux d'isolation (Anses, 2011). La conception (sol plutôt en terre battue) et le vieillissement des bâtiments de dindes inclus dans l'étude, plus âgés que les bâtiments de poulets, pourraient aussi expliquer en partie les niveaux d'infestation plus importants.

Certaines pratiques d'élevage sont à privilégier, car elles permettent de réduire la nourriture disponible pour l'insecte, en maîtrisant les fermentations des litières (choix du matériau : copeaux plus ligneux, ou cosses de sarrasins peu absorbants, type de sol, rajout de litière en cours de lot), ou en limitant la présence de résidus d'aliments fermentescibles (distribution de l'aliment de démarrage pour les volailles le plus proche de leur arrivée dans le bâtiment, nettoyage des silos de stockage). On peut émettre l'hypothèse que les pratiques comme un curage rapide du fumier, ou le nettoyage et la désinfection des mangeoires en dehors du bâtiment favoriseraient l'évacuation des adultes, larves, ou œufs, restés dans la litière entre deux lots de volailles, ce qui permettrait des niveaux d'infestation moindre des lots suivants. Le stockage des volailles mortes à proximité du bâtiment ou dans un congélateur non suffisamment étanche, pourrait constituer une réserve de nourriture qui favoriserait le maintien d'une population d'insecte d'un lot à l'autre. Par ailleurs, il est possible que le stock de litière neuve situé à proximité du bâtiment constitue un site refuge pour le ptT durant les vides sanitaires. L'utilisation d'insecticides semble tout de même un moyen de lutte nécessaire comme le montre le niveau d'infestation des bâtiments pour lesquels aucun insecticide n'a été utilisé. Néanmoins, comme l'explique Studebaker, 2014, l'utilisation répétée et systématique d'une même famille de molécules peut conduire à l'apparition et la sélection de résistance chez le ptT. C'est sans doute le cas pour la famille des pyrèthrinoides qui apparaît dans notre étude moins efficace. Il est donc important de conseiller aux éleveurs de privilégier la rotation des familles d'insecticides, afin de varier les modes d'action.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée dans le cadre de l'UMT SANIVOL, avec le soutien financier du CASDAR. Les auteurs remercient l'ensemble des éleveurs ayant participé à cette étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anses, 2011. In : Le ténébrion (Anses edit.), Bialec, Nancy, pp2
- Arends, J.J., 1987.. Poult. Dig. 28, 172-176.
- Chambres d'Agriculture du Grand Ouest, 2017. In: Résultats de l'enquête avicole – enquête réalisée auprès des aviculteurs du Grand Ouest (Chambre d'Agriculture de Bretagne edit), pp 47
- Despins, J.L., Turner Jr., E.C., Pfeiffer, D.G., 1991. J Agr. Entomol., 8: 209-217.
- Lambkin, T. A., and S. J. Rice. 2006. J. Econ. Entomol. 99: 908-913.
- Mustac S, Rozman V, Škvorc V., 2013. Veterinarski Arhiv;83:563–570
- Renault, D., 2002. In : Implantation en régions tempérées d'un insecte d'origine tropicale, *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera : Tenebrionidae) : aspects écophysiologiques et biochimiques (Université de Rennes 1 edit.), Thèse de Doctorat, Rennes.
- Safrit, R.D. 1983. In: Biology and sampling methods for the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus* in poultry houses. North Carolina State University, Raleigh, (PhD Dissertation) pp155.
- Safrit, R.D., Axtell, R.C., 1984. Poult. Sci. 63, 2368-2375.
- Salin, C., 1999. In : Contribution à l'écologie d'*Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera:Tenebrionidae), insectes associé aux élevages hors-sol en Bretagne (Université de Rennes 1 edit.), Thèse de Doctorat, Rennes.
- Salin, C., Delettre, Y.R., Cannavacciuolo, M., et Vernon, P., 2000. Eur J of Soil Bio36 (2): 107–115.
- Strother, K.O., Steelman, C.D., 2001. Environ. Entomol. 30, 556-561.
- Studebaker, G. 2014. In: Insecticide recommendations for Arkansas. In MP-144. (Arkansas Cooperative Extension edit) Service, Little Rock, AR: 50–54.
- Wohlgemuth, R., 1989. Xth Jubilee Inter. Symp. of the World Assoc. of Vet. Food Hyg., 18-20

SESSION

PATHOLOGIE - PREVENTION

SESSION
PATHOLOGIE - PREVENTION

Posters

LA COLIBACILLOSE DU POULET DE CHAIR : RESULTATS INTERMEDIAIRES D'UNE ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DANS 40 ELEVAGES

**Souillard Rozenn¹, Puterflam Julie², Balaine Loic¹, Galliot Pascal², Kempf Isabelle³,
Schouler Catherine⁴, Le Bouquin Sophie¹.**

¹ANSES, Unité Epidémiologie Santé et Bien Etre, 22440 Ploufragan

²ITAVI, 22440 Ploufragan

³ANSES, Unité Mycoplasmodologie Bactériologie et Antibiorésistance, 22440 Ploufragan

⁴ISP, INRA, Université de Tours, UMR 1282, 37380 Nouzilly

rozenn.souillard@anses.fr

RÉSUMÉ

La colibacillose, provoquée par certaines souches d'*Escherichia coli*, un hôte commun du tube digestif des volailles, est une maladie multifactorielle qui peut se déclencher principalement suite à des conditions d'élevage défavorables. Les objectifs de l'étude COLISEE visent à prévenir la maladie par l'identification des facteurs déclenchants en élevage et à développer des outils de caractérisation des souches d'*E. coli* virulentes. Pour cela, une étude est conduite par l'UMT Sanivol dans 80 élevages de poulets de chair. Ce travail présente les résultats intermédiaires des données collectées dans les 40 premiers élevages. Lors de la première visite, avant l'arrivée des poussins, des chiffonnets sont réalisés dans le bâtiment puis lors de leur mise en place, un chiffonnet de fonds de boîte et dix poussins sont prélevés. Ces prélèvements sont analysés en bactériologie pour recherche d'*E. coli*. Une notation de la qualité des poussins, de leur comportement et des mesures d'ambiance sont également réalisées. Lors de la seconde visite à trois semaines d'âge, des mesures d'ambiance et des indicateurs de bien-être sont relevés. En cas de suspicion d'une colibacillose par l'éleveur, des poulets sont examinés au laboratoire pour diagnostic bactériologique. Les résultats des 40 premiers lots montrent qu'*E. coli* a été identifié dans 20 bâtiments avant l'arrivée des poussins (chiffonnets de litière dans 11 bâtiments, de parois dans 9 bâtiments, de soubassements dans 5 bâtiments, des entrées d'air et du matériel dans 3 bâtiments). *E. coli* a également été identifié à partir des chiffonnets de fonds de boîtes dans 37 lots et des poussins dans 29 lots (sur vitellus et/ou foie). Des colibacilloses cliniques ont été signalées dans 15 élevages. Ces résultats intermédiaires montrent une détection d'*E. coli* dans la moitié des bâtiments avant l'arrivée des poussins et un portage d'*E. coli* par les poussins à leur arrivée pour la plupart des lots. L'étude des facteurs déclenchants en élevage et de la virulence des souches d'*E. coli* permettra de fournir des moyens d'action pour une meilleure maîtrise de la maladie.

ABSTRACT

Colibacillosis in broilers: Intermediate results of an epidemiological study in 40 farms.

Colibacillosis, caused by some strains of *Escherichia coli*, a common host of the intestinal tract of poultry, is a multifactorial disease often occurring under deficient rearing conditions. The objectives of the COLISEE study are to prevent the disease by identifying field conditions associated with colibacillosis and by developing tools to characterize *E. coli* virulent strains. The UMT Sanivol conducts a study in 80 broiler farms. This article presents the intermediate results of the data collected in the first 40 farms. During the first visit, before the arrival of the chicks, swabs were collected in the houses. At the chicks' arrival, a swab on delivery box and ten chicks were sampled. These samples were analyzed for *E. coli* isolation. A notation of chick quality and behavior, and of ambient parameters were also collected. During the second visit at three weeks of age, ambient parameters and welfare indicators were noted. In case of colibacillosis suspicion, chickens were examined in laboratory for bacteriological diagnosis. The results of the first 40 flocks showed that *E. coli* was identified in 20 houses prior to the chicks' arrival (swab on litter in 11 houses, on walls in 9 houses, on wall subbases in 5 houses, on air inlet and equipment in 3 houses). *E. coli* was also identified from swabbing delivery boxes in 37 flocks and from chicks in 29 flocks (yolk and/or liver). Clinical colibacillosis cases were reported in 15 farms. These first results showed a detection of *E. coli* in half of the houses prior to the arrival of the chicks and a carriage of *E. coli* by the chicks at arrival in most of the flocks. The study of the rearing conditions and of the virulence of the *E. coli* strains will provide means of action for a better control of the disease.

INTRODUCTION

La colibacillose aviaire est l'infection bactérienne la plus fréquente en production avicole, entraînant de la mortalité, l'utilisation d'antibiotiques et des pertes économiques importantes. La maladie est provoquée par la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) un hôte commun du tube digestif des volailles. La colibacillose est une maladie multifactorielle qui peut se déclencher suite à des facteurs d'élevage défavorables, un état d'immunodépression des volailles ou une virulence particulière des souches d'*E. coli* (Guabiraba et Schouler, 2015). En effet, la bactérie *E. coli* présente une grande diversité de souches, dont la plupart ne sont pas pathogènes. Cependant, des souches dites APEC (Avian Pathogenic *E. coli*) peuvent être responsables de manifestations cliniques dans les élevages, entraînant de la mortalité associée notamment à des omphalites, des infections respiratoires ou des boiteries. Etant données les difficultés de maîtrise de la maladie dans les élevages, le projet COLISEE « Maîtrise de la colibacillose du poulet: quelles pistes d'action? » est conduit par l'UMT Sanivol (ITAVI/ANSES), l'unité Mycoplasma Bactériologie et Antibiorésistance et la plateforme Identypath de l'ANSES en partenariat avec les laboratoires RESALAB, FINALAB et LABOCEA et avec le concours de l'UMR1282 de l'INRA. Ce projet vise à proposer des moyens de prévention de la colibacillose aviaire par l'identification des facteurs déclenchants en élevage au cours d'une étude épidémiologique dans 80 élevages de poulets, par une meilleure compréhension du contexte « psycho-social » dans lequel l'éleveur gère le risque sanitaire et par le développement de vaccins expérimentaux. Ce projet a également pour objectif de développer des technologies d'analyses innovantes par spectrométrie de masse MALDI-TOF et par PCR haut débit, en caractérisant la virulence des souches d'*E. coli* collectées lors de l'étude épidémiologique. Ce travail présente les résultats intermédiaires descriptifs des données pour les 40 premiers élevages enquêtés.

1. MATERIELS ET METHODES

40 lots de poulets de chair standard de 4 organisations de production, mis en place en Bretagne et Pays de Loire entre mai 2017 et mars 2018, sont inclus dans l'étude intermédiaire (choix aléatoire). Pour chaque lot de poulets, 2 visites sont réalisées aux périodes à risque de déclenchement de la colibacillose : au démarrage des poussins et à 3 semaines d'âge. Par ailleurs, en cas de suspicion d'une colibacillose en cours d'élevage, un diagnostic bactériologique est réalisé pour recherche d'*E. coli*.

1.1. Visite des élevages à l'arrivée des poussins

Environ une heure avant l'arrivée des poussins, 5 chiffonnets sont réalisés dans le bâtiment : sur les parois, sur le matériel (mangeoires et abreuvoirs), sur

les soubassements, sur les entrées d'air et sur la litière, ainsi qu'un prélèvement d'eau en bout de ligne. A l'arrivée du camion de livraison des poussins, 10 poussins et une chiffonnette sur 20 fonds de boîtes sont prélevés. Ces échantillons (chiffonnets, eau, foie et vitellus des poussins) sont analysés pour recherche d'*E. coli* par isolement sur gélose lactosée, identification et sérotypage des souches O1, O2 et O78, conservées ensuite au surgélateur.

Par ailleurs, au déchargement des poussins dans le bâtiment, une notation individuelle de 100 poussins est réalisée selon une grille s'inspirant de la méthode Tona K. et al. (2003). Il est notamment observé l'état du duvet, l'état de cicatrisation de l'ombilic, la présence d'une membrane au niveau de l'ombilic et l'état d'hydratation des pattes. Chacun des 100 poussins est également pesé. Leur comportement à la mise en place dans le bâtiment est observé : il est relevé si les animaux s'alimentent rapidement et ont un accès correct à l'eau. Enfin, des mesures d'ambiance (dioxyde de carbone, température et hygrométrie) sont réalisées dans chaque quart du bâtiment à hauteur des animaux (sonde KIMO®). Lors de cette visite, un questionnaire épidémiologique est rempli avec l'éleveur (descriptif de l'exploitation, du bâtiment et des conditions de démarrage du lot).

1.2. Visite des élevages à 3 semaines d'âge

Comme pour la première visite, des mesures d'ambiance sont relevées à 3 semaines d'âge pour le dioxyde de carbone, la température et l'hygrométrie, ainsi qu'une mesure de NH₃ et 2 mesures de poussières totales. Une notation de 30 poulets permet également d'évaluer les indicateurs de bien-être (Welfare Quality, 2009) : la propreté du plumage (score 0 : plumage propre, score 1 : dégradation minime, scores 2 et 3 : plumage sale et très sale) et les pododermatites (score 0 : absence de lésion, score 1 : lésions minimales et scores 2 à 4 : lésions avérées avec score 2 : légères, 3 : sévères et 4 : très sévères). Lors de cette seconde visite, le questionnaire épidémiologique est complété (problèmes sanitaires, traitements préventifs et curatifs et mortalité du lot).

1.3. Suspicion d'une colibacillose en cours d'élevage

En cours d'élevage, en cas de suspicion d'une colibacillose par l'éleveur et/ou le technicien, des poulets sont déposés dans un laboratoire d'analyse partenaire de l'étude, selon des critères de mortalité et de signes cliniques définis. Pour les animaux âgés de moins de 10 jours (suspicion d'une colibacillose précoce), l'éleveur dépose 10 poussins au laboratoire en cas de mortalité >0,3% sur une journée (avec signes lésionnels ou cliniques suspects). Pour les animaux âgés de plus de 10 jours (suspicion de colibacillose tardive), l'éleveur dépose 6 poulets au laboratoire en cas de mortalité > 0,1% par jour sur 2 jours consécutifs (avec signes lésionnels ou cliniques suspects).

Au laboratoire, en cas de suspicion d'une colibacillose précoce, si des lésions septicémiques sur au moins 4 poussins et sur au moins un des organes (vitellus, foie, rate, cœur, articulation) par poussin sont identifiées, alors les organes lésés sont analysés pour recherche d'*E. coli* par isolement sur gélose lactosée, identification et sérotypage des souches O1, O2 et O78. En cas de suspicion d'une colibacillose tardive, si des lésions septicémiques sur au moins 4 poulets et sur au moins un des organes (foie, rate, cœur, articulations, sacs aériens) par poulet sont identifiées, alors ces organes lésés sont analysés de la même manière que pour les colibacilloses précoces. Les souches d'*E. coli* sont ensuite conservées au surgélateur.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Préparation du bâtiment et détection d'*E. coli* avant l'arrivée des poussins

Les 40 lots de poulets ont été élevés dans des bâtiments d'une surface moyenne de 1200 m², avec pour la plupart, un sol en terre battue (28/40 bâtiments). Suite au départ du lot précédent, tous les bâtiments ont été lavés (détergent dans 17 élevages). Une désinfection a ensuite été réalisée dans 21 bâtiments et 2 désinfections dans 18 bâtiments.

La majorité des bâtiments est équipée d'une ventilation dynamique (29/40 bâtiments). Un préchauffage a été réalisé dans tous les bâtiments, pendant en moyenne 49h avant l'arrivée des poussins (20h à 120 h) à une température moyenne de 32,2 °C (28°C à 35°C). La préparation du bâtiment est essentielle avant l'arrivée des poussins, il est généralement conseillé de chauffer au moins 48 heures avant l'arrivée des animaux (Munsch, 2015). Le circuit d'abreuvement a été réalimenté en eau, en moyenne 3,5 heures avant l'arrivée des poussins (0h à 28 h) et l'aliment distribué sur les papiers et dans les assiettes 21h en moyenne (1h à 72 h) avant l'arrivée des poussins.

Avant la livraison des animaux, *E. coli* a été identifié dans 20 bâtiments/40, à partir des chiffonnettes de litière (11 bâtiments), de parois (9 bâtiments), de soubassements (5 bâtiments), des entrées d'air (3 bâtiments) et du matériel (3 bâtiments) (Figure 1). *E. coli* a également été identifié pour 2 élevages dans l'eau en bout de ligne. A partir de ces prélèvements d'environnement, 71 souches d'*E. coli* ont été conservées (93% de sérotypes non déterminés, 5,6% d'O2 et 1,4% d'O1). Dans l'environnement, *E. coli* peut être retrouvé dans les matières fécales, la litière et la poussière. La poussière des bâtiments de volailles peut en effet contenir de 10⁵ à 10⁶ *E. coli*/gramme (Nolan et al, 2013). Différentes sources d'introduction dans les élevages ont également déjà été identifiées, comme les rongeurs ou les ténébrions (Goodwin et al, 1996).

2.2. Conditions de démarrage et détection d'*E. coli* à la livraison des poussins

La durée du transport des poussins entre le couvoir et l'élevage était de 2,8h en moyenne (0,75h à 7h). Pour le déchargement des caisses au bâtiment, le personnel de l'élevage a été aidé par le chauffeur dans 6 élevages et par des intervenants extérieurs (famille, voisins ou amis) pour 31 d'entre eux.

Lors de la livraison des poussins, *E. coli* a été identifié dans 37 lots à partir de la chiffonnette sur les fonds de boîte (Figure 1) et dans 29 lots à partir des poussins (plus de la moitié des poussins positifs/10 dans 14 lots) (Figure 2). A partir des chiffonnettes sur fonds de boîtes, 94 souches ont été conservées (91,5% de sérotypes indéterminés et 8,5% d'O2). Parmi l'ensemble des poussins porteurs (n=157), *E. coli* a été le plus souvent isolé du vitellus pour 44,5% des poussins, des foies et vitellus pour 33,3%, et uniquement du foie pour 22,2% d'entre eux. A partir de ces organes sur poussins, 206 souches ont ainsi été conservées (67% de sérotypes indéterminés, 25,2% d'O2, 7,3% d'O1 et 0,5% d'O78). *E. coli* est un germe qui peut se transmettre par voie verticale : la surface des œufs peut être contaminée par *E. coli*, à l'éclosion le poussin peut ainsi se retrouver dans un aérosol contaminé par des souches d'*E. coli* pathogènes ou non (Giovanardi et al., 2005).

Le poids des poussins à l'arrivée, évalué sur 100 individus était de 40,6g en moyenne (33,6 à 47,8g). Peu d'anomalies sur les critères de qualité physique des poussins ont été relevées avec en moyenne 73,5% de poussins sans anomalie. Les défauts les plus observés étaient la présence d'une membrane sur l'ombilic (dans 32 lots pour en moyenne 5,8% des poussins, de 1% à 19 %) et des ombilics non cicatrisés (dans les 40 lots pour en moyenne 11% des poussins, de 1% à 34 %). La cicatrisation de l'ombilic, une zone vulnérable aux infections bactériennes, est à contrôler au démarrage des poussins (Maatjens et al, 2016).

L'observation du comportement des poussins à la mise en place montre que pour la plupart des lots (27/40), plus de 75% des poussins mangent 1h après leur mise en place et l'accès aux points d'eau est satisfaisant pour 29/40 lots. Il a été montré que le délai d'accès à l'eau et à l'aliment avait un impact sur la qualité du démarrage et les performances des animaux (Bergoug et al., 2013).

La concentration moyenne en CO₂ à la mise en place des poussins, était de 2841ppm (985 à 6509ppm). La température dans les bâtiments était de 31,1 °C en moyenne (28,1 à 33,9°C) et l'hygrométrie de 45,9% (31,8 à 59,5%). Le poussin est incapable de réguler sa température qui varie fortement selon son environnement. L'ambiance doit être stable avec une température d'environ 32°C (Munsch, 2015). L'air doit être renouvelé pour éliminer les gaz toxiques avec une teneur en CO₂ inférieure à 3 000 ppm (Arrêté 28 juin 2010).

2.3. Les cas de colibacilloses et les conditions d'élevages en fin de lot

Des colibacilloses ont été signalées dans 15 élevages: 12 colibacilloses précoces avant 10 jours d'âge et 4 colibacilloses tardives (Tableau 1). Pour les colibacilloses précoces, de la mortalité a été observée en moyenne pendant 5 jours (taux de mortalité moyen 1.7%). Les signes de la maladie ont été observés pendant une plus longue période lors des colibacilloses tardives, en moyenne pendant 12 jours (taux de mortalité 1.5%) et le plus souvent avec des signes de boiteries. *E. coli* a été isolé essentiellement à partir des vitellus (inflammation du sac vitellin dans 11/12 lots) lors des colibacilloses précoces et à partir des foies en cas de colibacillrose tardive (inflammation et hypertrophie du foie dans les 4 lots). Des lésions de l'articulation tibio-tarsienne ont également été observées pour 2 lots. A partir de ces prélèvements de colibacilloses, 156 souches d'*E. coli* ont été conservées (82.7% sérotypes indéterminés, 6.4% d'O2 et 10.9% d'O78). Les manifestations cliniques et la mortalité liée à la colibacillrose sont très variables, les jeunes oiseaux sont souvent atteints par une maladie plus sévère. La colibacillrose peut prendre plusieurs formes : des infections localisées, comme les infections du sac vitellin (avec des omphalites, une inflammation concomitante de l'ombilic) ou des formes systémiques avec des lésions inflammatoires diverses comme des péricardites ou des périhépatites fibrineuses. Les volailles peuvent également développer des lésions chroniques, comme des ostéomyélites ou des arthrites (Nolan et al., 2013). Lors de la seconde visite, les indicateurs de bien-être ont été relevés sur 30 poulets. Des pododermatites (score ≥ 2) ont été observées chez 56,5% des poulets (score 0 : 19,8%, score 1 : 23,6%, score 2 : 32,8%, score 3 : 20,4%, score 4 : 3,3%) à 3 semaines d'âge (un taux de 91,1% avait été observé à l'abattoir lors d'une étude menée en 2009 (Allain et al., 2009)). Très peu de plumages sales ont été observés : score ≤ 1 pour la quasi-totalité des poulets (98,3%). Les pododermatites sont de bons indicateurs de la qualité de la litière et de l'air (Nolan et al., 2013 ; Allain et al., 2009) et une litière humide est favorable au développement d'*E.coli* (Rezende et al., 2001). Les mesures d'ambiance relevées à 3 semaines d'âge indiquent une concentration moyenne en CO2 de 2589 ppm (798 à 5346ppm), une température de 26°C

en moyenne (21 à 33,5°C) et une hygrométrie de 67,9% (39,5 à 78,3%). Le taux moyen de NH3 était de 12,6 ppm (0 à 30 ppm) et de poussière de 3,9 mg/m3 (1,14 à 10,36 mg/m3). L'ammoniac et la poussière peuvent entraîner une irritation de l'appareil respiratoire favorable au développement d'*E. coli*. (Jones et al, 2005). De nombreux facteurs de risque de la colibacillrose aviaire relatifs à l'ambiance, à la qualité de l'eau ou aux conditions d'élevage ont été décrits (Vandekerckhove et al, 2004).

CONCLUSION

Les résultats intermédiaires de l'étude épidémiologique menée dans les 40 premiers lots de poulets de chair montrent une présence d'*E. coli* dans la moitié des bâtiments avant l'arrivée des poussins (notamment sur la litière dans 11 bâtiments/40) et un portage d'*E. coli* par les poussins à l'arrivée dans l'élevage pour la plupart des lots (37/40 pour les fonds de boîte et 29/40 pour les organes). Cependant, *E. coli* est un hôte commun du tube digestif des volailles et la plupart des souches ne sont pas pathogènes, sauf les souches APEC qui peuvent entraîner des colibacilloses cliniques (Guabiraba et Schouler, 2015). Grace aux données collectées relatives aux conditions d'élevage des poulets (conditions de démarrage, ambiance dans les bâtiments, qualité des poussins ...) et aux souches d'*E. coli* isolées à partir des prélèvements d'environnement, de poussins et des épisodes de colibacillrose, l'étude COLISEE permettra de rechercher les facteurs déclenchants de la maladie en élevage en tenant compte de la virulence des souches d'*E. coli*, caractérisée par MALDI-TOF et PCR haut débit. Le développement de vaccins expérimentaux à partir de souches d'*E. Coli* issues de l'étude terrain, permettra également de proposer une approche vaccinale comme stratégie de prévention de la maladie.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée par l'UMT SANIVOL dans le cadre du projet CASDAR COLISEE (2017-2020, n°1608) grâce au financement de la DGER et du CIPC. Les auteurs remercient l'ensemble des éleveurs ayant participé à l'étude épidémiologique, ainsi que les organisations de production.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allain V., Mirabito L., Arnould C., Colas M., Le Bouquin S., Lupo C., Michel V. 2009. Br poultry Science, 50 (4), 407-417.
 Bergoug A, C. Burel, M. Guinebretière, Q. Tong, N. Roulston et al. 2013. World's Poultry Science Journal, Vol. 69.
 Giovanardi D, Campagnari E., Sperati Ruffoni L., Pesente P., Ortali G, Furlattini V. 2005. Avian Pathol, 34(4): 313-318.
 Goodwin M. and Waltman W. 1996. J Appl Poult Res, 5(1): 51-55.
 Guabiraba R and Schouler C. 2015. FEMS Microbiol Lett. Aug;362(15)
 Jones TA., C. A. Donnelly, M. Stamp Dawkins. 2005. Poultry Science 84, 1155-1165.
 Munsch G. 2015. La plume verte. N°38, mars 2015.
 Nolan L. et al. 2013. In : Diseases of poultry. John Wiley and Sons, pp751.
 Rezende C., Mallinson E. T, Tablante N. L., Morales R., Park A. 2001. J Appl Poult Res, 10: 245-251.
 Maatjens CM, I. A. M. van Roovert-Reijrink, I. van den Anker, B. Engel, et al. 2016. Poultry Science, 95, 2136-2144.
 Vandekerckhove D., P. De Herdt, H. Laevens, F. Pasmans. 2004. Avian Pathology 33(3), 337- 342

Figure 1. Détection d’*E. coli* à partir des chiffonnettes dans les 40 élevages.

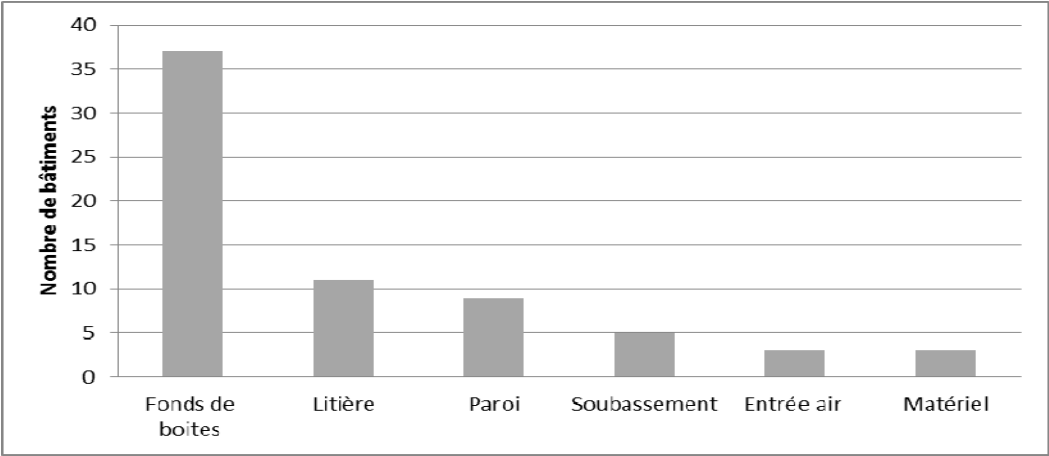


Figure 2. Détection d’*E. coli* à partir des poussins dans les 40 élevages.

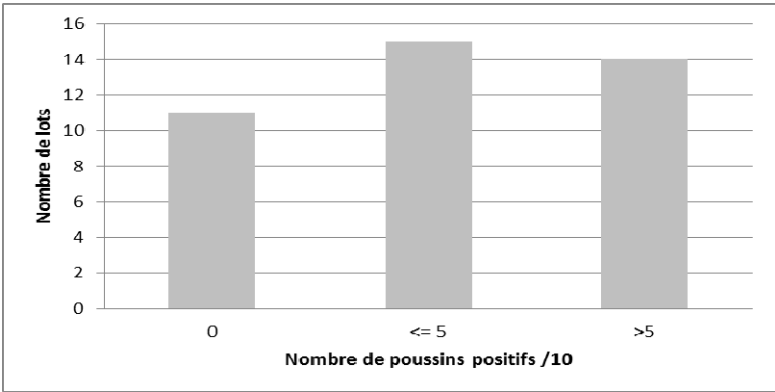


Tableau 1. Les cas de colibacilloses signalés dans les 40 élevages

	Signes cliniques	Durée moyenne de la maladie	Taux de mortalité moyen associé à la maladie	Organes avec lésions septicémiques et isolement d’ <i>E. coli</i>
Colibacillose précoce<10j (n=12 lots)	Mortalité	5 jours (4 à 10j)	1.7% (0.7 à 2.9%)	Inflammation et congestion du vitellus (11 lots), Hypertrophie et inflammation du foie (9 lots), Inflammation du péricarde (5 lots), Hypertrophie de la rate (3 lots), Inflammation des articulations (1 lot)
Colibacillose tardive>10j (n=4 lots)	Mortalité (et boiteries)	12 jours (8 à 17j)	1.5% (1 à 1.8%)	Inflammation du foie (4 lots), Inflammation du péricarde (3 lots), Pus dans articulation tibio-tarsienne (2 lots), Inflammation des sacs aériens (2 lots)

LA PERSISTANCE DE SALMONELLA DANS LES ELEVAGES DE POULETS DE CHAIR A LA REUNION

**Etheves Marie Anaïs¹, Choisis Norma², Alvarez Sara¹, Dalleau Francis², Hascoat
Jeremy¹, Gallard Vincent³, Cardinale Eric¹**

¹ *CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE
POUR LE DEVELOPPEMENT Cyroi Platform- 2 Rue Maxime Rivière 97490 Ste Clotilde*

² *GROUPEMENT DE DEFENSE SANITAIRE REUNION – 1 rue du Père Hauck, PK23
Bâtiment E/F/G 97418 La plaine des Cafres*

³ *COOPERATIVE DES AVICULTEURS DE LA REUNION - 14 rue de l'Etang 97450 SAINT-
LOUIS
marie-anais.etheves@cirad.fr*

RÉSUMÉ

Salmonella est un agent zoonotique responsable de toxi-infection alimentaire. La viande de volaille étant souvent impliquée dans l'infection, l'objectif de cette étude est d'identifier les facteurs de risque de la persistance de *Salmonella* dans les élevages de poulets de chair à La Réunion. Quarante-six élevages de poulets de chair ont été étudiés de mars 2016 à février 2017, où ont été réalisés des contrôles bactériologiques à 5 étapes du cycle d'élevage. Des échantillons de fientes de poulets frais ont été prélevés et un questionnaire a été soumis aux producteurs. La persistance était définie comme une infection du même sérovar avant et après le nettoyage-désinfection des poulaillers. La prévalence en fin de bande était de 24 % avec comme principaux sérotypes isolés *S. Livingstone*, *S. Newport*, *S. Typhimurium*, *S. Weltevreden* et *S. Agona*. L'analyse des relations entre pratiques de nettoyage et présence de *Salmonella* nous a permis d'identifier des groupes d'éleveurs avec un niveau variable de maîtrise du nettoyage. Le nettoyage des accès bétonnés (OR = 0,3) et la désinfection des silos (OR = 0,13) ont permis de limiter le risque de persistance du germe. De plus, l'analyse de l'infection de la faune péri-domestique à proximité des élevages a permis d'identifier leur rôle sur la persistance de *Salmonella*. quinze pour cent des parasites étaient infectés, la présence de ténébrions dans la litière de volaille (OR = 19,49) a permis d'identifier leur rôle dans le risque de persistance. Pour éviter la persistance de *Salmonella* dans les élevages une rénovation des bâtiments anciens, une amélioration des mesures de biosécurité, du nettoyage-désinfection, de la prophylaxie sanitaire et de la lutte contre les nuisibles dans la filière avicole sont donc fondamentales.

ABSTRACT

Risk factors for *Salmonella* persistence in broiler-chicken flocks in Reunion Island.

This study was conducted to identify the main risk factors for *Salmonella* persistence in Reunionese broiler flocks. Forty-six broiler farms were studied from March 2016 to February 2017. Samples of fresh broiler droppings were taken and a questionnaire was submitted to the farmers. Persistence was defined as an infection of the same serovar before and after cleaning-disinfection of poultry houses. *Salmonella* had persisted in 24% of the farms. Cleaning concreted access (OR=0.3) and silos disinfection (OR=0.13) decreased the risk of pathogen persistence. In addition, the analysis of the infection of the pests near the farms had allowed identifying their role in the persistence of *Salmonella*. Fifteen percent of the pests were infected and the presence of mealworms in poultry litter (OR=19.49) were found to be increasing the risk of *Salmonella* persistence. Improved cleaning-disinfection, sanitary prophylaxis and pest control in the poultry sector are therefore essential to avoid the persistence of *Salmonella* in broiler farms.

INTRODUCTION

En France, *Salmonella* est le premier agent pathogène confirmé dans les foyers de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). En 2015, il représentait 48% des foyers pour lesquels un agent pathogène a été confirmé (Données épidémiologiques Santé Publique France, 2017).

En 2016, au niveau national, 83 513 lots de poulets de chair et de dindes d'engraissement, labellisés ou non, ont été dépistés lors de prélèvements obligatoires en fin de bande. Au total, 416 lots ont été placés sous APMS (Arrêté Préfectoral de Mise sous Surveillance) et 28 sous APDI (Arrêté Préfectoral portant Déclaration d'Infection). La répartition géographique de ces lots est inégale et concentrée sur six départements qui abritent près de 40% des cas, le plus grand nombre de cas se trouvant sur l'île de la Réunion (12% des lots sous APMS ou APDI) (Anses Saisine n°2016-SA-0253). Le règlement européen (CE) oblige depuis le 1er janvier 2009, la recherche des infections à *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* dans les élevages de plus de 250 poulets de chair.

À La Réunion, entre 1996 et 2005, 22,2% des intoxications alimentaires ont été provoquées par *Salmonella*, et plus particulièrement par *S. Typhimurium* (D'Ortenzio *et al.*, 2008). En 2008, une épidémie de gastroentérites due à *S. Weltevreden* a été décrite (D'Ortenzio *et al.*, 2008). Plus récemment, deux chocs septiques dus à des salmonelles non typhiques ont eu lieu à La Réunion (Vandroux *et al.*, 2014).

Les aliments les plus souvent incriminés dans les épidémies de salmonellose humaine sont ceux d'origine animale tels que les œufs contaminés et la viande de volaille (Van Immerseel *et al.*, 2005).

La production de viande de poulet à la Réunion n'est que de 8700 tonnes / an, mais c'est aussi la première source de protéines animales (40 kg/ hab./ an) et 25% du poulet est consommé sous forme de produits transformés (particulièrement les saucisses).

Pour prévenir la contamination des carcasses de poulet, il est important de lutter contre l'infection à *Salmonella* tout au long de la chaîne de production alimentaire (Mead, 1993). Les conditions d'élevage à la ferme sont considérées comme un élément clé du contrôle de *Salmonella* (Bailey *et al.*, 2001) et s'attaquer au problème depuis le sommet de la pyramide de production empêcherait la propagation ultérieure de l'infection. Des risques de transmission horizontale ont été identifiés. Ils comprennent le nettoyage et la désinfection inadéquats des bâtiments d'élevage de poulets de chair, entraînant la contamination du lot suivant (Lahellec *et al.*, 1986; Davies *et al.*, 1996; Higgins *et al.*, 1981; Rose *et al.*, 1999, Rose *et al.*, 2000), un faible niveau d'hygiène (Henken *et al.*, 1992), la contamination des aliments pour les animaux (Davies *et al.*, 1997) et la présence de ténébrions dans le bâtiment et de rongeurs à la ferme (Baggesen *et al.*, 1992; Löhren, 1994).

En outre, des travaux récents à la Réunion ont montré que les faunes péri-domestiques telles que les rats, les musaraignes, les blattes et les oiseaux sont porteurs de *Salmonella* (Tessier *et al.*, 2016).

La persistance du même sérovar de *Salmonella* entre deux lots consécutifs est l'un des principaux problèmes qui se posent dans les élevages de poulets de chair. À ce jour, très peu d'informations sont disponibles pour comprendre cette persistance à la Réunion. Nos objectifs étaient d'évaluer le taux de persistance de *Salmonella* dans les élevages de la Réunion et d'expliquer les facteurs pouvant être associés à cette persistance.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Collecte de données

L'étude a été réalisée de mars 2016 à février 2017 et comprenait 46 exploitations de poulets de chair. Les vétérinaires de la coopérative ont fourni les adresses des élevages et la date de la mise en place. La sélection des exploitations était aléatoire mais reposait sur la coopération du propriétaire.

Les exploitations ont été visitées et des échantillons ont été prélevés à différentes périodes d'élevage. À la première visite, cinq échantillons de fientes fraîches ont été prélevés avant l'abattage du lot précédent. Pour vérifier l'efficacité du nettoyage-désinfection. Lors de la deuxième visite, plusieurs pedichiffonnettes et chiffonnettes ont été faites dans le sol du bâtiment, à l'intérieur et à l'extérieur du poulailler. La 3ème et 4ème visite ont été faites avant et après la mise en place des poussins d'un jour. Enfin, les dernières visites ont été effectuées à la fin de la période d'élevage avant l'abattage, afin de définir le statut vis-à-vis de *Salmonella* du lot et pour récupérer des ténébrions.

De plus, des échantillons de musaraignes, de souris, de rats, de mouches, de fourmis, de cafards et d'oiseaux ont été prélevés près des poulaillers. Un questionnaire avec 218 variables a été testé dans trois fermes et a été réalisé par la même équipe formée pour effectuer ce travail, ce questionnaire portant sur tous les facteurs pouvant contribuer à la persistance des salmonelles (environnement avicole, personnel de l'exploitation et visiteurs, nettoyage et désinfection et nuisibles).

1.2. Isolement et identification des salmonelles

Le protocole de recherche de *Salmonella* sur les fientes fraîches (pedichiffonnettes), les chiffonnettes et les vecteurs a été adapté de la méthode normalisée EN ISO 6579 / A1 : 2007, annexe D et le sérotypage des souches a été réalisé selon le schéma de Kauffmann-White (Grimont et Weill, 2007).

1.3. Variables et analyse statistique

Le lot était l'unité d'observation. La persistance a été définie comme une infection de la volaille avec le même sérovar de *Salmonella* sur deux lots

consécutifs. Ainsi, la variable de résultat était dichotomique.

Quarante-cinq variables explicatives ont été sélectionnées à partir de 218 questions fermées et catégoriques. Le nombre de catégories par variable était limité de sorte que les fréquences des catégories étaient $> 10\%$. Toutes les relations entre variables explicatives ont été vérifiées 2 à 2 (χ^2). Pour les relations bilatérales mettant en évidence une association statistique forte et une plausibilité biologique, l'association la plus liée à la variable de résultat a été choisie.

Une méthode en deux étapes a été utilisée pour évaluer la relation entre les variables explicatives et la persistance de *Salmonella*. La régression logistique a été utilisée selon la méthode décrite par Hosmer et Lemeshow (2000). Dans la première étape, une analyse univariée a été réalisée pour relier la persistance de *Salmonella* à chaque variable. Seuls les facteurs associés (test Pearson χ^2 , $P < 0,20$) à la persistance de *Salmonella* ont été proposés à un modèle complet sur logiciel R pour une analyse multivariable (Mickey et Greenland, 1989). La deuxième étape impliquait un modèle logistique de régression multiple. La contribution de chaque facteur au modèle a été testée avec un rapport de vraisemblance χ^2 par une méthode par étapes (en amont et en aval). Dans le même temps, les modèles plus simples ont été comparés au modèle complet par le critère d'information d'Akaike (Akaike, 1974). Ce processus s'est poursuivi automatiquement jusqu'à l'obtention d'un modèle avec tous les facteurs significatifs à $P < 0,10$ (bilatéral). La qualité de l'ajustement du modèle final a été évaluée à l'aide des tests Pearson χ^2 , Deviance et Hosmer-Lemeshow (Hosmer et Lemeshow, 2000). Les interactions n'ont pas été testées (en raison de la petite taille de l'échantillon).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Persistance de *Salmonella*

Le sérotype prédominant (Tableau 1) est la *S. Livingstone* qui, avec la *S. Typhimurium*, sont réparties sur l'ensemble de l'île, alors que *S. Newport* se retrouve majoritairement dans la zone Nord-Est.

Tableau 1 : Salmonelles identifiées dans les prélèvements

Type de salmonelle	Pourcentage sur les positifs (90)	IC95%
<i>S.Livingstone</i>	25,6% (23)	[16,6 ; 34,6]
<i>S.Newport</i>	21,1% (19)	[12,7 ; 29,5]
<i>S.Typhimurium</i>	15,6% (14)	[8,1 ; 23,1]
<i>S.Weltevreden</i>	14,4% (13)	[7,1 ; 21,7]
<i>S.Agona</i>	12,2% (11)	[5,4 ; 19,0]
<i>S.Virchow</i>	8,9% (8)	[3,0 ; 14,8]

Le taux de persistance du même sérotype de *Salmonella* avant et après nettoyage-désinfection (N-D) du poulailler est estimé à 24% (11 sur 46 ; IC à

95% = [11,6 ; 36,2]), prélèvements extérieurs inclus, et à 19,6% (9 sur 46 ; IC à 95% = [8,1 ; 31,0]) en incluant uniquement les prélèvements intérieurs. Les lots de volailles dont seuls les prélèvements extérieurs ont été détectés positifs à *Salmonella* après N-D n'ont pas été infectés à la fin de la période d'élevage.

La persistance de *Salmonella* d'un lot à autre est associée au statut *Salmonella* du lot précédent et du bâtiment après N-D, avant la mise en place (tableau 2). Ainsi, pour les 9 lots de poulets de chair infectés (19,6%) à la fin de la période d'élevage, on observe que 66% des lots précédents étaient également infectés par le même sérovar et 33% des bâtiments après N-D. Seul, un lot de volailles, dont l'élevage était positif au lot précédent et après N-D, n'a pas été détecté positif à la cinquième visite.

2.2. Facteurs de risques

Les vecteurs sont également associés à la persistance de *Salmonella* dans les fermes. Au total, 15% (15/102) des vecteurs se sont révélés infectés par *Salmonella* spp. (tableau 3). Les rats et les musaraignes étaient les plus infectés, avec des prévalences respectives de 33% et 27%.

La prévalence chez les mouches, les ténébrions et les fourmis était respectivement de 15%, 9,5% et 11%.

La persistance de *Salmonella* d'un lot à un autre est associée à l'environnement du poulailler et au nettoyage-désinfection de l'extérieur proche du bâtiment.

Sur les 45 variables testées lors de l'analyse de dépistage, trois ont été retenues dans le modèle (tableau 4). La présence de ténébrions dans les poulaillers est associée à un risque accru de persistance de *Salmonella* dans les exploitations (OR = 19,49*). Un deuxième facteur de persistance identifié est la propreté des accès en béton autour des bâtiments (OR = 0,3). Enfin, la non-désinfection des silos d'alimentation est le troisième facteur de risque identifié. La désinfection des silos est un moyen de limiter la persistance des salmonelles (OR = 0,13).

(* valeur élevée liée au faible nombre d'élevages positifs)

CONCLUSION

Trois facteurs de risque de persistance de *Salmonella* dans l'élevage ont été identifiés. La plupart d'entre eux ont été rapportés dans la littérature, mais c'est la première fois que de tels résultats sont disponibles pour l'île de la Réunion. Le statut de *Salmonella* du lot précédent, le nettoyage-désinfection du poulailler, particulièrement appliqué à l'extérieur, et la présence de nuisibles, contribuent à la persistance de *Salmonella*. La pression environnementale, liée au climat tropical, chaud et humide liée à la forte densité des exploitations agricoles et à l'activité agricole, impose des exigences strictes en matière d'hygiène et de biosécurité dans les élevages de poulets de chair de l'île de la Réunion.

Tableau 2 : Infection à *Salmonella* des élevages de volailles à la fin de la période d'élevage, en fonction de l'infection à *Salmonella* du lot précédent et du nettoyage-désinfection (46 élevages, mars 2016-février 2017)

	Serovar	Infection à <i>Salmonella</i> à la fin de la période d'élevage								
Infection <i>Salmonella</i>		<i>Livingstone</i>	<i>Newport</i>	<i>Typhimurium</i>	<i>Agona</i>	<i>Virchow</i>	<i>Kentucky</i>	Négatif	Total	
	Lot précédent	<i>Livingstone</i>	3					1	3	7
		<i>Newport</i>		2					1	3
		<i>Typhimurium</i>			1				2	3
		<i>Weltevreden</i>								0
		<i>Agona</i>				1				1
		<i>Virchow</i>					1			1
		<i>Livingstone</i> + <i>Typhimurium</i>				1				1
		Négatif	1	1					28	30
	Après Nettoyage- désinfection	<i>Livingstone</i>								0
		<i>Newport</i>		1					2	3
		<i>Typhimurium</i>			1				1	2
		<i>Weltevreden</i>							2	2
		<i>Agona</i>	1			1			1	3
		<i>Virchow</i>					1			1
		<i>Typhimurium</i> + <i>Virchow</i>							1	1
		<i>Livingstone</i> + <i>Weltevreden</i>							1	1
Négatif		3	2		1		1	26	33	
Total		4	3	1	2	1	1	34	46	

Tableau 3. Prévalence d'infection à *Salmonella* chez les vecteurs présents

Vecteur	Ténébrions	Musaraignes	Rats	Mouches	Fourmis	Souris	Cafards	Oiseaux	Total
Livingstone	1								1
Newport	1	1	2						4
Typhimurium		2		2					4
Weltevreden		3		1	1				5
Enteritidis				1					1
Négatifs	19	16	4	22	8	3	8	7	87
Total	21	22	6	26	9	3	8	7	102

Tableau 4. Facteurs de risque de persistance de *Salmonella* dans les élevages de poulets de chair

Variables	Persistance de <i>Salmonella</i> dans le lot (%)	Modèle de régression logistique		
		OR	IC 95%	p-value
Nettoyage des accès bétonnés		0,3	0-0,61	0,023
Oui	63,6			
Non	36,4			
Désinfection des silos		0,13	0,02-0,99	0,049
Oui	36,4			
Non	63,6			
Présence de ténébrions		19,49	1,36-279,88	0,029
Oui	81,8			
Non	18,2			

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akaike, H., 1974. IEEE Trans. Automat. Contr., (19), 716–722.
- Anses 2017, Rapport Saisine n°2016-SA-0253
- Baggesen, D.L., Olsen, J.E., Bisgaard, M., 1992. Avian Pathol., (21), 569-79.
- Bailey, J.S., Stern, N.J., Fedorka-Cray, P., Craven, S.E., Cox, N.A., Cosby, D.E., Ladely, S., Musgrove, M.T., 2001. J. Food Prot. 64 (11), 1690–1697.
- Davies, R.H., Wary, C., 1996. Avian Dis., (40) 626-33.
- Davies, R.H., Nicholas, R.A., McLaren, I.M., Corkish, J.D., Lanning, D.G., Wary, C., 1997. Vet Microbiol., (58) 277±93.
- D’Ortenzio, E., Weill, F.X., Ragonneau, S., Lebon, J.A., Renault, P., Pierre, V., 2008. First report of a *Salmonella enterica* serovar Weltevreden outbreak on Reunion Island, France, August 2007. Euro Surveill. pp13.
- Données relatives aux toxi-infections alimentaires collectives déclarées en France en 2016. Santé publique France 2017.
- Grimont, P.A.D., Weill, F.-X., 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Pasteur Institute, Paris, France.
- Henken, A.M., Frankena, K., Goelema, J.O., Graat, E.A., Noordhuizen, J.P., 1992. Poult Sci., (71) 838-43.
- Higgins, R., Malo, R., René-Roberge, E., Gauthier, R., 1981. Avian Dis., (26) 26-33.
- Hosmer, D.W., Lemeshow, S., 2000. Applied Logistic Regression. Wiley, New York, p. 373.
- Lahellec, C., Colin, P., Bennejean, G., Paquin, J., Guillerme, A., Debois, J.C., 1986. Poult Sci., (65) 2034-9.
- Löhren, U., 1994. Dtsch Tierärztl Wschr., (101) 290-2.
- Mickey, J., Greenlands, S., 1989. Am. J. Epidemiol., (129) 125–137.
- Mead, G.C., 1993. J. R., Soc. Med. 86, 39–42.
- Mickey, J., Greenlands, S., 1989. Am. J. Epid. (129) 125-137.
- Rose, N., Beaudeau, F., Drouin, P., Toux, J.Y., Rose, V., Colin, P., 1999. Prev. Vet. Med., (39) 265–277.
- Rose, N., Beaudeau, F., Drouin, P., Toux, J.Y., Rose, V., Colin, P., 2000. Prev. Vet. Med., (44) 9–20.
- Tessier, C., Parama Atiana, L., Lagadec, E., Le Minter, G., Denis, M., Cardinale, E., 2016. Acta Trop., (158) 6–12.
- Vandroux, D., Jabot, J., Angue, M., Belcour, D., Galliot, R., Allyn, J., Gaüzère, B.-A., (2014). Bull. Soc. Pathol. Exot., (107) 299–301.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Boyen, F., Pasmans, F., Bertrand, S., Collard, J. M., ... & Ducatelle, R., 2005. Annales de Médecine Vétérinaire, (149) No. 1, 34-48.

LA NOUVELLE INTERFACE WEB DU RNOEA (RESEAU NATIONAL D'OBSERVATIONS EPIDEMIOLOGIQUES EN AVICULTURE)

Souillard Rozenn, Allain Virginie, Toux Jean-Yves, Le Bouquin Sophie

ANSES, Unité Epidémiologie Santé et Bien Etre, 22440 Ploufragan

rozenn.souillard@anses.fr

RÉSUMÉ

Depuis sa création en 1988, le RNOEA (Réseau National d'Observations Epidémiologiques en Aviculture) créé et géré par l'Anses Ploufragan, permet de surveiller l'évolution épidémiologique des maladies aviaires en France et de détecter les émergences. La participation au RNOEA est basée sur le volontariat de plus de 50 correspondants adhérents (vétérinaires praticiens et laboratoires d'analyses vétérinaires) qui transmettent les données des maladies aviaires observées au cours de leur activité. Depuis 2017, une Interface Web a été développée afin d'optimiser le fonctionnement du RNOEA. La transmission des données par les adhérents se fait via l'interface Web du RNOEA : ils y saisissent leurs signalements ou déposent leurs fichiers de données laboratoires, extraits à partir de leur base de données interne. Trois types de données sont ainsi collectés: les résultats d'analyses des laboratoires, les signalements des préoccupations sanitaires et les incidences mensuelles des maladies observées par les vétérinaires praticiens. Un programme développé sous R permet de coder les signalements transmis par fichier et d'harmoniser les données avant leur importation dans la base de données du RNOEA. En retour les adhérents ont accès à une application Shiny sous R, dans laquelle des recherches spatio-temporelles interactives peuvent être réalisées sur l'historique des données depuis 1989. Cette consultation propose notamment des graphiques d'évolution temporelle du nombre de signalements et de la fréquence relative d'une maladie (% de la maladie par rapport à l'ensemble des signalements dans une production donnée) et des cartes de répartition des signalements des maladies au niveau départemental ou régional. Les sorties graphiques dépendent de la sélection selon les filtres: maladies, pathogènes, espèces, étages de production et période. L'accès à l'interface Web est sécurisé, réservé uniquement aux adhérents du RNOEA, signataires de la charte, qui garantit notamment l'anonymat et la confidentialité des données. La nouvelle interface Web du RNOEA est un outil interactif, réactif et évolutif permettant d'optimiser le fonctionnement du RNOEA pour une meilleure surveillance des maladies aviaires en France grâce à une participation active et volontaire des adhérents.

ABSTRACT

The new web platform of the French Epidemiological Surveillance Network in Poultry

Since 1988, the epidemiological surveillance network in poultry, managed by ANSES Ploufragan allows to supervise the epidemiological evolution of avian diseases in France and to detect emerging diseases. The participation is based on the volunteering of more than 50 members (veterinarians and laboratories), who transmit the avian diseases observed during their activity. Since 2017, a new web platform has been developed to optimize the management of the network. Data transmission is via the RNOEA Web platform: members can input their data or download their data files, extracted from their internal database. Three types of data are collected: the results of laboratory analyses, the reports of poultry diseases and the monthly incidence of diseases observed by veterinarians. A program developed with R allows to encode the data transmitted by files and to harmonize data before importation into the database of the RNOEA. In return the members have access to a shiny application with R, in which interactive spatio-temporal research can be realized on the data history since 1989. This consultation proposes graphs of the temporal evolution of the number of diseases cases and the relative frequency of a disease (% of a disease compared to all the diseases reported in a production) and maps with diseases repartition in departments or regions. These graphics depend on the selection of the filters: diseases, pathogens, species, production stages and period. The access to the Web platform is secured, reserved only to the members of RNOEA, who signed the charter, guaranteeing in particular the anonymity and confidentiality of the data. The new Web platform of RNOEA is an interactive, reactive and evolving tool to optimize the management of the RNOEA for a better surveillance of avian diseases in France thanks to the active and voluntary participation of the members.

INTRODUCTION

Le RNOEA (Réseau National d'Observations Epidémiologiques en Aviculture) géré par l'Anses Ploufragan depuis 1989, est un réseau d'épidémiosurveillance qui permet de surveiller les maladies aviaires en France grâce à la participation volontaire des correspondants : laboratoires d'analyses vétérinaires et vétérinaires praticiens. Les objectifs du RNOEA sont de surveiller l'évolution épidémiologique des maladies aviaires en France quelles que soient les productions avicoles, de les hiérarchiser, de détecter des émergences ou recrudescences de maladies aviaires. Ce réseau de surveillance permet également de disposer de données épidémiologiques pour les acteurs des filières avicoles et l'orientation des projets de recherche. En 2017, une nouvelle Interface Web a été développée afin d'optimiser le fonctionnement du RNOEA en développant un outil d'échange réactif et interactif entre les correspondants et les gestionnaires du RNOEA.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Les correspondants adhérents à l'interface Web du RNOEA

En 2018, 36 établissements partenaires (laboratoires d'analyses vétérinaires, cabinets vétérinaires ou organisations de production) rassemblant 68 correspondants sont adhérents au RNOEA. L'accès à l'interface Web est sécurisé, réservé uniquement aux correspondants adhérents du RNOEA (compte personnel avec mot de passe) signataires d'une charte d'adhésion. La charte engage les correspondants et les gestionnaires Anses. Elle garantit notamment une transmission régulière des données par les correspondants sur l'interface Web en échange d'une consultation spatio-temporelle confidentielle et anonyme des données qui leur est réservée. Une diffusion extérieure des données du RNOEA est soumise à un accord préalable du comité de pilotage composé de 12 correspondants.

1.2. La transmission des données par les correspondants sur l'interface Web

En se connectant sur l'interface Web, les correspondants peuvent transmettre, selon leur activité, 3 types de données :

- Les résultats d'analyses des laboratoires (produits par les laboratoires adhérents du RNOEA) : données quantitatives du nombre de cas de maladies aviaires (associées ou non à des pathogènes) ou de portages de salmonelles,
- Les préoccupations sanitaires (signalement par les vétérinaires praticiens adhérents du RNOEA d'une situation sanitaire préoccupante,

inhabituelle ou émergente) : données qualitatives des tendances épidémiologiques du terrain,

- Et des incidences mensuelles (signalement par les vétérinaires praticiens adhérents du RNOEA du nombre de bâtiments atteints par une maladie par rapport au nombre de bâtiments sous surveillance).

Les correspondants peuvent saisir ces 3 types de signalements sur l'interface Web. Les champs renseignés pour les signalements au RNOEA concernent : la **période de la maladie** (mois/année ou date précise), l'**âge des animaux** atteints par la maladie, la **localisation** (département ou région), le type de **production** (parmi un référentiel de 19 espèces aviaires, de 11 étages de production et de 9 signes de qualité), la **maladie** (parmi un référentiel de 233 maladies) et les **agents pathogènes** (parmi un référentiel de 368 agents pathogènes et 355 sérotypes de salmonelles).

Afin d'éviter les saisies manuelles pour les laboratoires disposant d'un grand volume de données, les correspondants peuvent également déposer sur l'interface Web un fichier de données sous un format csv. Ce fichier correspond à une extraction d'une partie de leurs données de résultats d'analyse, obtenu grâce à une requête permettant de renseigner les signalements au RNOEA. Ces données transmises (variables correspondant aux champs de l'interface Web, référentiels et format du fichier) ne sont pas identiques et standardisées pour l'ensemble des laboratoires. Un travail de codage et de traitement des données développé sous le logiciel R par les gestionnaires du RNOEA permet ensuite la transformation de ces données dans un format standardisé appelé format pivot. Cette étape permettant la mise au format pivot des données est suivie d'une étape de vérification des données garantissant l'absence d'incohérence. Ces deux étapes sont indispensables avant l'importation des données sous la base du RNOEA.

1.3. La consultation spatio-temporelle des données par les correspondants

En retour des données transmises sur l'interface Web, les correspondants adhérents au RNOEA ont accès à une application Shiny développée sous R, dans laquelle des recherches spatio-temporelles interactives peuvent être réalisées sur l'historique des données du RNOEA depuis 1989.

Trois types de sorties graphiques peuvent être réalisés: des synthèses du classement des maladies par période, des graphiques d'évolution temporelle des maladies et des cartographies présentant la répartition des maladies au niveau départemental ou régional. Il est possible d'établir ces sorties graphiques sur une partie des données en sélectionnant les filtres selon :

les maladies, les pathogènes, les espèces, les étages de production et la période.

Le développement d'une application Shiny (hébergée sur le serveur RStudio Connect) permet la visualisation de ces données synthétiques sous forme de tableaux, de graphiques ou de cartographies. Actuellement, seule la présentation des données issues des laboratoires est accessible, l'application est en cours de développement pour les préoccupations sanitaires transmises par les cabinets vétérinaires et les organisations de production. L'accès aux sorties graphiques pour les données des préoccupations sanitaires est prévu début 2019. Concernant les portages de salmonelles, une réflexion est menée pour définir les modalités d'exploitation et de restitution de ces données transmises par les laboratoires.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Un historique des pathologies aviaires depuis la création du RNOEA en 1989

La page d'accueil de l'interface Web rappelle les conditions d'utilisation des données du RNOEA (comme indiqué dans la charte d'adhésion) et indique également des chiffres clefs comme le nombre de signalements transmis au RNOEA depuis sa création en 1989 (312 551 pathologies, 37 944 préoccupations sanitaires et 148 358 portages salmonelles) et le nombre de données transmises au cours du dernier mois (Figure 1).

Ces signalements ont été transmis dans l'ensemble des productions avicoles françaises avec la répartition par espèce suivante : les *Gallus* (chair et ponte) (49,1%), la dinde (20,6%), le canard (20,1%), la pintade (4%), le gibier (4,8%), les oies (0,9%) et les pigeons (0,5%).

2.2. Une hiérarchisation des pathologies aviaires

Pour chaque production avicole et selon une période définie, il est possible de réaliser un classement des maladies aviaires selon leur fréquence:

- Tableau avec un classement décroissant des pathologies en fonction de leur fréquence dans la production considérée.
- Diagramme avec la part en % de chaque pathologie sur l'ensemble des pathologies signalées dans la production considérée.

A titre d'exemple, le classement des maladies signalées dans l'espèce *Gallus* chair en 2017 est présenté (Figure 2). Au cours de l'année 2017, 4687 maladies ont été transmises dans cette production. Pour cette période, la maladie la plus fréquemment signalée par les laboratoires est l'omphalite (20,1% des maladies), suivie de la colibacillose-septicémique (14%), des syndromes digestifs avec diarrhée ou entérite non spécifique (11,2%) et de la colibacillose respiratoire (9,6%). Les omphalites sont des infections

le plus souvent colibacillaires (Nolan, 2015). Les signalements de colibacilloses sont, depuis plusieurs années, les maladies les plus souvent signalées au RNOEA dans l'espèce *Gallus* chair. Elles représentent en effet l'infection bactérienne la plus fréquente en production avicole, entraînant de la mortalité, l'utilisation d'antibiotiques et des pertes économiques importantes (Nolan, 2015). En lien avec ce constat, un projet Casdar COLISEE (2017-2020, N°1608) « Maitrise de la colibacillose aviaire en élevage de poulets de chair » piloté par l'UMT SANIVOL (ITAVI/ANSES) est actuellement en cours. Les objectifs sont notamment d'identifier les facteurs déclenchants de la colibacillose en élevage et de développer des outils analytiques de caractérisation de la virulence des souches d'*E. coli* afin de proposer des moyens de prévention de la maladie.

En vue d'améliorer la classification des maladies aviaires, il est prévu de regrouper certaines dénominations de maladies en une catégorie synthétique, comme les colibacillose-septicémiques, les colibacillose-respiratoires et les colibacilloses (non précisées) sous le groupe « colibacillose ».

2.3. Une surveillance de l'émergence des pathologies aviaires

Pour chaque maladie aviaire, il est possible de réaliser des graphiques d'évolution des signalements dans le temps afin de repérer les émergences ou les recrudescences de ces maladies selon une production et une période donnée avec :

- Un histogramme du nombre de cas de la maladie par mois/année
- Une courbe de la fréquence relative d'une maladie : % de la maladie par rapport à l'ensemble des signalements dans une production donnée par mois/ année

A titre d'exemple, une recrudescence du botulisme aviaire en 2007/2008 avec un nombre de cas qui passe d'une vingtaine en 2006 à plus de 80 en 2007 a été observé, pour revenir à partir de 2012 au niveau antérieur avec moins d'une vingtaine de cas par an (Figure 3). Ce recueil de données montre que le botulisme est une maladie rare en France chez les volailles, avec une fréquence relative inférieure à 1%, mais une maladie grave associée à de fortes mortalités avec un impact économique majeur. Suite à la recrudescence du botulisme aviaire, des investigations épidémiologiques ont été menées dans les élevages par l'unité EPISABE et le LNR botulisme aviaire de l'Anses Ploufragan pour mieux comprendre et prévenir les épisodes de botulisme dans les élevages de volailles (Souillard et al, 2014).

2.4. Une localisation des pathologies aviaires en France

Sur l'interface Web du RNOEA, il est aussi possible de réaliser des cartes afin de localiser les maladies aviaires signalées (Figure 4) avec:

- Une répartition des signalements par département (carte choroplèthe avec un code couleur selon le nombre de signalements de maladies par département) (figure 4.a)
- Une carte interactive permettant de visualiser des informations complémentaires sur les cas signalés par département (figure 4.b), (informations actuellement proposées : répartition des signalements par espèce).

Ainsi, les données du RNOEA sont pour la plupart localisées dans le Grand Ouest et suivent la répartition des productions avicoles en France. Selon les filtres disponibles, il est ainsi possible d'obtenir la répartition au niveau départemental d'une maladie dans une production donnée et pour une période considérée.

CONCLUSION

Le RNOEA est un réseau d'épidémiosurveillance géré par l'ANSES Ploufragan et spécifiquement dédié depuis 1989 au suivi de l'évolution épidémiologique des maladies aviaires en France. Il s'agit d'un réseau d'épidémiosurveillance passif basé sur une transmission volontaire des données par les correspondants adhérents (vétérinaires praticiens et laboratoires d'analyses vétérinaires). Il rassemble la

majorité des laboratoires, cabinets vétérinaires et organisations de production, intervenant dans les filières avicoles en France. Mais, la représentativité des données collectées est difficile à évaluer et il est nécessaire de considérer ces limites dans l'interprétation des données du Réseau. Cependant, grâce à la participation active de ses correspondants, un historique de plus de 300 000 maladies aviaires a été collecté depuis 30 ans. Le RNOEA permet ainsi de surveiller l'évolution des maladies aviaires pour l'ensemble des productions avicoles en France. La nouvelle interface WEB développée en 2017 permet d'optimiser le fonctionnement du réseau. Il s'agit d'une plateforme d'échanges entre les gestionnaires et les correspondants : un outil réactif, interactif et évolutif, permettant le développement de nouvelles fonctionnalités en fonction des attentes et des besoins des différents acteurs du RNOEA.

REMERCIEMENTS

Les gestionnaires du RNOEA remercient l'ensemble des correspondants pour leur participation active au RNOEA depuis 30 ans.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Nolan L. et al. 2015. In: Manuel de pathologie aviaire, pp300.
Souillard et al. 2014. Avian Pathol, vol. 43, No. 5, 458-464.

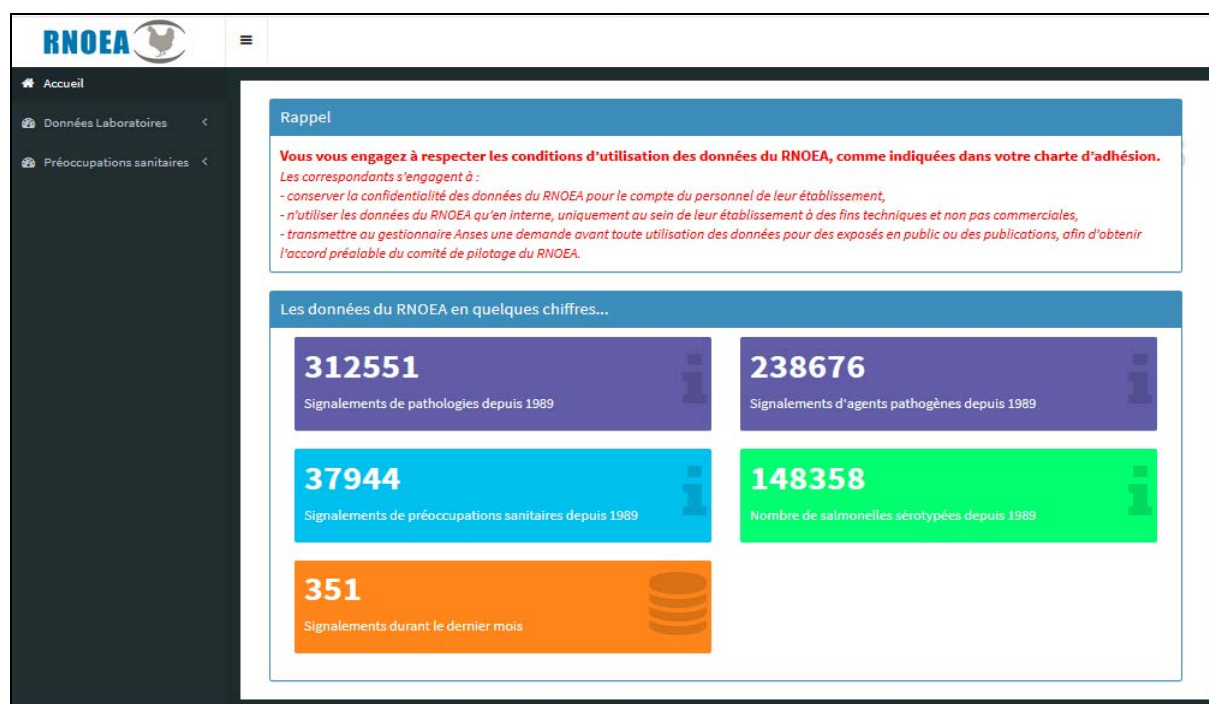
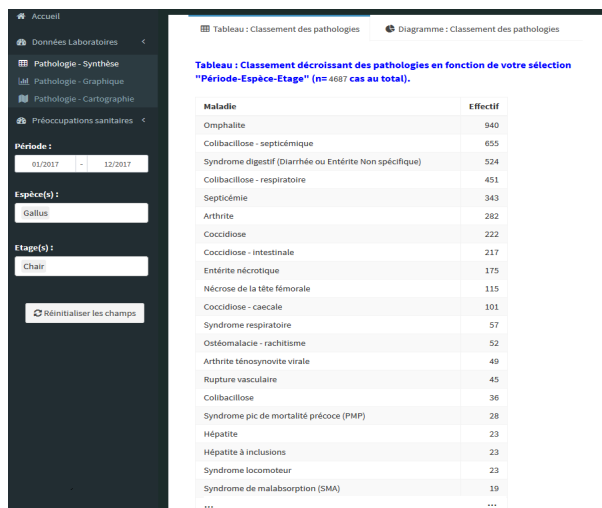
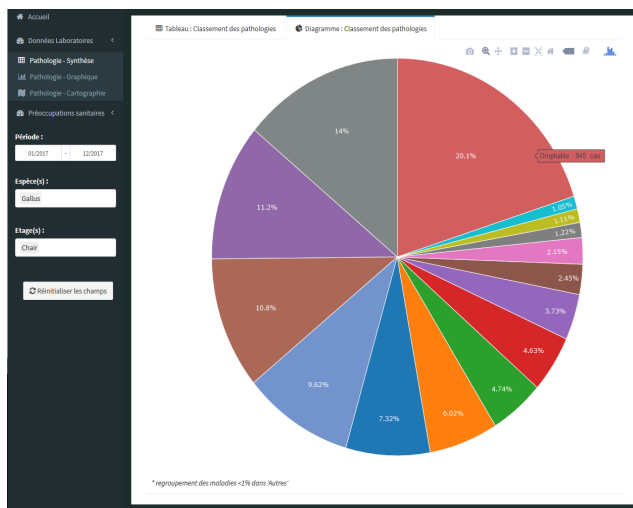


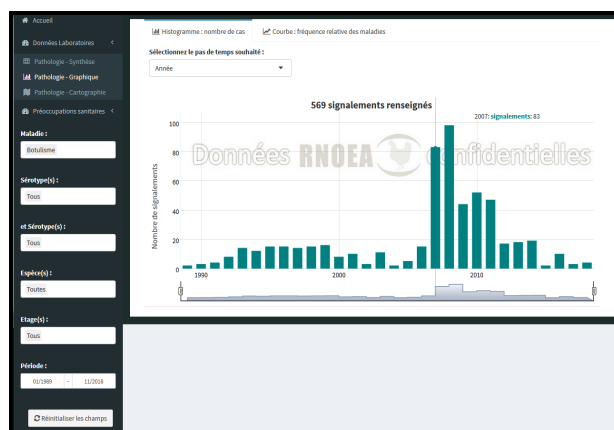
Figure 1. Page d'accueil de l'application Rshiny pour le RNOEA



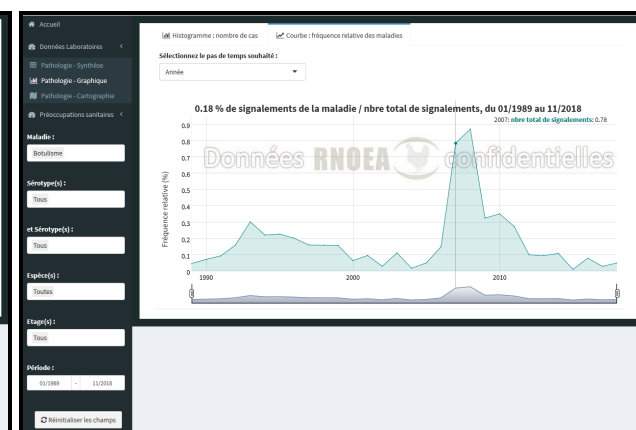
(a) Tableau : Classement des pathologies



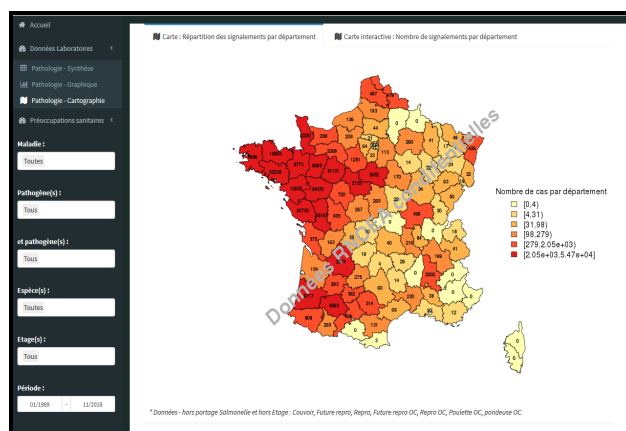
(b) Diagramme : Classement des pathologies

Figure 2. Classement décroissant des pathologies signalées au RNOEA chez le Gallus chair en 2017 (n=4687).

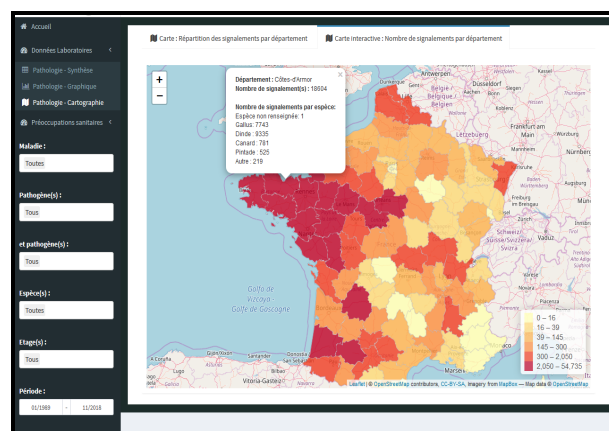
(a) Histogramme : Nombre de cas par an



(b) Courbe : Fréquence relative annuelle

Figure 3. Evolution temporelle des signalements de botulisme au RNOEA entre 1989 et 2018 (n=569).

(a) Carte chloroplèthe



(b) Carte interactive

Figure 4. Répartition géographique des maladies signalées au RNOEA de 1989 à 2018 (n=312551).

LE BOTULISME AVIAIRE EN FRANCE : BILAN DES EPISODES DIAGNOSTIQUES PAR LE LNR BOTULISME AVIAIRE DEPUIS 2013

C. Le Maréchal¹, **T. Poezevara**¹, S. Rouxel¹, V. Ballan¹, E. Houard¹, R. Souillard², M. Chemaly¹

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

² Anses, Laboratoire de Ploufragan – Plouzané, Unité Epidémiologie Santé et Bien-Etre, Université Bretagne-Loire, BP 53, 22440 Ploufragan, France

Caroline.lemarechal@anses.fr

RÉSUMÉ

Le botulisme animal est considéré en Europe depuis une dizaine d'années comme une maladie émergente préoccupante pouvant entraîner des pertes économiques majeures dans les élevages de volailles. En France une forte hausse du nombre de foyers a été observée en volaille entre 2007 et 2010. Dans ce contexte, le LNR botulisme aviaire a été mis en place à l'Anses en 2012.

L'objectif de cette étude est de présenter les caractéristiques des foyers de botulisme aviaire confirmés par le LNR botulisme aviaire depuis 2013. Le diagnostic en laboratoire est réalisé par l'analyse de foies prélevés sur des animaux symptomatiques par PCR en temps réel pour la détection des gènes codant pour les types C, D, C/D, D/C et E, après enrichissement de ceux-ci en condition anaérobie à 37°C pendant minimum 24h.

Un total de 107 épisodes de botulisme aviaire confirmés par PCR des foies (67 en volaille et 40 en faune sauvage) est inclus dans cette étude. Le type C/D est le plus fréquent (80 %), suivi par le type D/C (9,2 %). Parmi les 107 foyers confirmés, les espèces aviaires concernées sont principalement les dindes (28,7% des épisodes) et les poulets (18,5 % des épisodes) en élevage et les canards (28,7% des épisodes), notamment les colverts en faune sauvage (28 épisodes sur 40 concernant les canards). Des épisodes ont aussi été confirmés en élevage de pintades, canards mulards, faisans, pondeuses et élevages reproducteurs. Les épisodes de type D et D/C ont majoritairement été diagnostiqués en élevage de dindes (92,3%).

Le botulisme est saisonnier avec un pic observé en été : 67 % des épisodes ont été diagnostiqués entre juillet et septembre, même si des épisodes sont recensés tout au long de l'année. Le nombre moyen d'épisodes de botulisme aviaire toutes espèces confondues confirmé par le LNR est relativement stable depuis 2013 (moyenne de 18,7 ± 6,8 épisodes par an). Ce danger sanitaire de première catégorie reste préoccupant : le caractère sporulant de la bactérie lui confère en effet une résistance dans l'environnement entraînant un fort risque de récurrence, nécessitant la mise en place d'une gestion appropriée.

ABSTRACT

Avian botulism in France: overview of outbreaks diagnosed by the French National Reference for avian botulism since 2013

Animal botulism is considered as an emerging disease in Europe for the last decade inducing large economic losses in poultry farms. In France, a raise in the number of outbreaks in poultry was reported between 2007 and 2010. In this context, the French National Reference Laboratory for avian botulism was created at Anses in 2011.

The objective of our study is to present the characteristics of the avian botulism outbreaks that have been diagnosed by the avian botulism NRL since 2013. Diagnosis is based on the analysis of livers collected on symptomatic animals using real-time PCR for the detection of genes encoding for botulinum neurotoxins type C, D, C/D and D/C, after an enrichment step in anaerobic conditions at 37°C during at least 24 hours.

107 avian botulism outbreaks were confirmed using the PCR analysis of livers (67 in poultry farms, 40 in wild birds). Type C/D was the most common BoNT type (80 %), followed by type D/C (9.2 %). Among the 107 outbreaks, turkeys (28.7% of outbreaks) were particularly concerned, as well as broilers (18.5%) and ducks (28.7 %), especially mallards that was the most common wild bird species involved in wild bird outbreaks (28 out of 40). Outbreaks are also reported in guinea fowls, pheasants, laying hens, breeding hens and mulard ducks. Type D/C outbreaks were mainly diagnosed in turkeys (92.3 %).

Avian botulism is seasonal: a raise is observed in summer (67 % of outbreaks are confirmed between July and September), but outbreaks are detected all along the year. The average number of outbreaks is stable since 2013 (18,7 ± 6,8 outbreaks per year). This disease is of main concern: spores are highly resistant in the environment and recurrence of the disease is quite common, requiring the implementation of appropriate management of the outbreaks.

INTRODUCTION

Le botulisme est une affection neuromusculaire due à l'action de la toxine botulique produite principalement par *Clostridium botulinum*, une bactérie anaérobie et sporulante. Il existe 7 types toxiques caractérisés annotés de A à G. Le botulisme humain est associé aux types A, B, E et F. Le botulisme animal est principalement associé aux types C, D, C/D et D/C. Des épisodes de botulisme aviaire de type E sont rapportés en faune sauvage, notamment aux Etats-Unis (Lan Chun et al., 2015) et des épisodes de type E ont été rapportés en France en élevage de volailles à la fin des années 90 (AFSSA, 2002).

Le botulisme aviaire est considéré comme la maladie des oiseaux la plus importante en termes de mortalité au niveau mondial (Rocke, 2006). En Europe, le botulisme animal est considéré comme une maladie émergente préoccupante (Skarin et al., 2013a) pouvant entraîner des pertes économiques majeures dans les élevages de volailles (Le Marechal et al., 2016). En France entre 2000 et 2013, les réseaux d'épidémiosurveillance SAGIR (« Surveiller et Agir ») et le RNOEA (Réseau National d'Observations Epidemiologiques en Aviculture) ont rapporté 129 foyers de botulisme signalés chez les oiseaux sauvages et 396 chez les volailles (Ventujol et al., 2017). Une forte augmentation du nombre de foyers de botulisme en élevage avicole a été observée entre 2007 et 2011 sans que l'origine de cette augmentation n'ait été identifiée. C'est dans ce contexte que le Laboratoire National de Référence pour le botulisme aviaire a été mis en place en 2012 à l'Anses au laboratoire de Ploufragan.

Dans le cadre de ses activités de référence, le LNR a développé et validé une méthode de confirmation en laboratoire du botulisme aviaire basée sur une méthode PCR. Dans cette étude, nous présentons les caractéristiques des foyers de botulisme confirmés par le LNR botulisme aviaire depuis 2013 et la mise en place de cette approche diagnostique.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Echantillonnage

Afin d'optimiser le diagnostic du botulisme aviaire, un protocole a été mis en place en collaboration avec le LABOCEA de Ploufragan à partir de 2013. Les foies (le LNR recommande l'envoi de 4 foies entiers pour la confirmation du botulisme en laboratoire) sont envoyés par les vétérinaires, le personnel de l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, les fédérations de chasse ou les laboratoires départementaux lorsque les signes cliniques sont évocateurs de botulisme (paralysie flasque ascendante). Les foies sont expédiés sous régime du froid dans les 24 heures qui suivent le prélèvement ou congelés si une durée de stockage plus importante est à envisager.

1.2. Analyses des suspicions de botulisme aviaire

Le diagnostic en laboratoire pour le botulisme aviaire se fait selon la méthode développée et validée par le LNR (Le Marechal et al., 2017). Celle-ci consiste en l'analyse de foies entiers (max 25 g) prélevés sur des animaux symptomatiques. Les foies sont dilués individuellement au 1/10^{ème} dans du bouillon régénéré Tryptone Peptone Glucose Yeast (TPGY) (Skarin et al., 2010) puis homogénéisés à l'aide d'un Pulsifier® (Microgen, Surrey, UK) pendant 15 secondes. L'ensemble des prélèvements est incubé pendant au moins 24h à 37°C dans une enceinte anaérobie (station A35, Don Whitley).

L'extraction d'ADN est réalisée à partir d'1ml de chaque enrichissement via le kit commercial QiaAmp DNA MiniKit® (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

La détection des gènes codant pour les toxines C, D, C/D, D/C et E est réalisée par PCR en temps réel tel que décrit précédemment (Le Marechal et al., 2017) et un kit commercial (QuantiFast Pathogen +IC kits, Qiagen) est utilisé comme contrôle interne.

Cette méthode a un seuil de détection de 5 spores par gramme de foie pour le type C et D et 250 spores par gramme de foie pour le type E (détermination selon les critères de la norme NF U 47-600). La spécificité diagnostique de cette méthode à l'échelle d'une suspicion est de 100 % et la sensibilité de 95,35 % (Le Marechal et al., 2017).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Nombres de suspicions analysées

225 suspicions de botulisme aviaire ont été traitées par le LNR botulisme aviaire entre février 2013 et août 2018. 107 épisodes de botulisme aviaire ont été confirmés, 67 en élevages de volailles et 40 en faune sauvage. Le nombre total de suspicions toutes espèces confondues est stable (environ $37.5 \pm 13,3$ suspicions par an) ainsi que le nombre d'épisodes confirmés (moyenne de $18,7 \pm 6,8$ épisodes par an) (cf. Figure 1). Il est moins élevé que celui observé sur la période 2007-2011 où le nombre d'épisodes confirmés avait fortement augmenté mais des épisodes continuent d'être confirmés annuellement que ce soit en volaille ou en faune sauvage.

Le botulisme animal n'est pas à déclaration obligatoire dans la plupart des pays (Skarin et al., 2013), il y a donc très peu de données disponibles sur le nombre d'épisodes retrouvés dans les autres pays. Il est donc difficile de comparer les données du LNR avec les données des autres pays.

2.2. Saisonnalité du botulisme

Un effet saison du botulisme aviaire est observé : la majorité des foyers de botulisme est déclarée en été (67,3% des épisodes confirmés ont été diagnostiqués entre juillet et septembre). Cette saisonnalité est particulièrement marquée en faune sauvage où 90% des épisodes ont été confirmés pendant cette période. En élevage, la majorité des foyers de botulisme (53,7%) est retrouvée en été, des cas sont cependant confirmés toute l'année (cf. Figure 2). La saisonnalité du botulisme est bien connue (Ventujol et al., 2017) notamment en faune sauvage où les facteurs de risque d'initiation d'un épisode sont les plus importants lorsque la température est élevée, notamment la température de l'eau et le potentiel redox faible. Ces conditions sont retrouvées en été et le nombre d'épisodes recensés est important lorsque les températures sont élevées (Le Maréchal et al., 2015).

2.3 Types toxiques

Toutes espèces aviaires confondues, le type toxinique le plus fréquent est le type C/D (80%) suivi par le type D/C (9,2%) (cf. Figure 3 et 4). Le type C/D est rapporté comme étant le type toxinique majoritairement impliqué dans les épisodes de botulisme aviaire en Europe actuellement (Anza et al., 2014; Bano et al., 2017; Woudstra et al., 2012).

Dans tous les épisodes de botulisme en faune sauvage, le type toxinique identifié est le type C/D. Dans 2 de ces épisodes, plusieurs types toxiques ont été mis en évidence (1 cas avec une souche de C et C/D en 2015 et 1 cas C/D et E en 2018). Des épisodes de botulisme aviaire impliquant plusieurs types toxiques ont déjà été rapportés par ailleurs dans la littérature (Woudstra et al., 2012). A notre connaissance la détection concomitante du type E et C/D à partir de l'analyse du foie d'un oiseau (canard colvert) est rapporté ici pour la première fois. Les implications de la détection du type E dans le foie d'un oiseau sauvage en terme de gestion pour la santé publique sont donc difficiles à évaluer pour le moment.

En élevage, le type C/D est retrouvé dans 72% des cas. Parmi les 28 % restants, 9% des élevages sont positifs pour le type C/D associé avec un autre type toxinique (C/D et C, C/D et D ou C/D et D/C). Les types D (15,6%) et D/C (3,4%) n'ont été identifiés qu'en élevage (Figure 3). Aucun cas de botulisme de type C ou E seul n'a été détecté en élevage par le LNR botulisme aviaire entre 2013 et 2018.

Les épisodes de botulisme humain ne sont pas associés au type C/D, C, D ou D/C. Ces types toxiques semblent uniquement associés aux épisodes de botulisme animal; le type C/D apparaissant comme particulièrement adapté aux espèces aviaires.

Au contraire le type E est retrouvé dans des cas humains et pourrait donc présenter un risque pour la

santé publique. L'identification du type toxinique est un élément essentiel pour la mise en place de mesures de gestion appropriées des épisodes de botulisme aviaire, l'objectif principal étant de démontrer que le type E n'est pas impliqué.

2.4 Répartition des épisodes de botulisme en fonction des espèces aviaires

Dans 70 % des foyers de botulisme en faune sauvage, des canards colverts étaient impliqués. La deuxième espèce représentée est le cygne (15%). D'autres espèces d'oiseaux ont été analysées au LNR comme des bécassines des marais, des goélands, des corneilles, des sarcelles d'hiver, des oies, des fuligules morillons, des hérons, des poules d'eau ou des canards souchets.

En volaille, 48% des foyers de botulisme aviaire concernent des dindes, 34% des élevages de productions de Gallus (poulets ou poules), 9% des élevages de pintades et ~5% des élevages de canards et de faisans. Les types toxiques D et D/C ne sont quasiment retrouvés que sur les dindes et le mélange C et C/D a été identifié à deux reprises en canard, une fois en faune sauvage et une fois en élevage.

Les épisodes de botulisme impliquant des dindes sont peu rapportés dans la littérature (Popp et al., 2012), bien qu'elles apparaissent comme sensibles. De plus, les dindes semblent sensibles au type C/D mais également au type D et D/C.

CONCLUSION

Le botulisme aviaire touche de nombreuses espèces aviaires et peut engendrer des mortalités importantes. C'est une maladie saisonnière, principalement retrouvée en été, même si des épisodes peuvent être diagnostiqués toute l'année. Le type C/D est le type toxinique le plus fréquent dans les épisodes de botulisme aviaire. Il est à noter la détection du type E et C/D par PCR dans le foie d'un canard colvert en 2018.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFSSA, 2002. Rapport sur le botulisme d'origine aviaire et bovine.
- Anza, I., Skarin, H., Vidal, D., Lindberg, A., Baverud, V., Mateo, R., 2014. The same clade of *Clostridium botulinum* strains is causing avian botulism in southern and northern Europe. *Anaerobe* 26, 20-23.
- Bano, L., Drigo, I., Tonon, E., Pascoletti, S., Puiatti, C., Anniballi, F., Auricchio, B., Lista, F., Montecucco, C., Agnoletti, F., 2017. Identification and characterization of *Clostridium botulinum* group III field strains by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Anaerobe* 48, 126-134.
- Lan Chun, C., Kahn, C.I., Borchert, A.J., Byappanahalli, M.N., Whitman, R.L., Peller, J., Pier, C., Lin, G., Johnson, E.A., Sadowsky, M.J., 2015. Prevalence of toxin-producing *Clostridium botulinum* associated with the macroalga *Cladophora* in three Great Lakes: growth and management. *The Science of the total environment* 511, 523-529.
- Le Maréchal, C., Decors, A., Quintaine, T., 2015. Le botulisme, une gestion délicate. *Lettre SAGIR* 182, 4-7.
- Le Marechal, C., Rouxel, S., Ballan, V., Houard, E., Poezevara, T., Bayon-Auboyer, M.H., Souillard, R., Morvan, H., Baudouard, M.A., Woudstra, C., Mazuet, C., Le Bouquin, S., Fach, P., Popoff, M., Chemaly, M., 2017. Development and Validation of a New Reliable Method for the Diagnosis of Avian Botulism. *PLoS One* 12, e0169640.
- Popp, C., Hauck, R., Gad, W., Hafez, H.M., 2012. Type C botulism in a commercial Turkey farm: A case report. *Avian Diseases* 56, 760-763.
- Rocke, T.E. 2006. The global importance of avian botulism, In: G.C. Boere, C.A.G., D.A. Stroud (Ed.) *Waterbirds around the world*. The stationery office, Edinburgh, UK, 422-426.
- Skarin, H., Lindberg, A., Blomqvist, G., Aspan, A., Baverud, V., 2010. Molecular characterization and comparison of *Clostridium botulinum* type C avian strains. *Avian Pathology* 39, 511-518.
- Skarin, H., Tevell Åberg, A., Woudstra, C., Hansen, T., Löfström, C., Koene, M., Bano, L., Hedeland, M., Anniballi, F., De Medici, D., Olsson Engvall, E., 2013. The workshop on animal botulism in Europe. *Biosecurity and Bioterrorism* 11, S183-S190.
- Ventujol, A., Decors, A., Le Maréchal, C., Toux, J.Y., Allain, V., Mazuet, C., Bayon-Auboyer, M.-H., Le Bouquin, S., Souillard, R., 2017. Le botulisme aviaire en France: Etude des cas signalés dans la faune sauvage et dans les élevages par deux réseaux de surveillance entre 2000 et 2013. *Epidémiologie et santé animale* 72, 85-102.
- Woudstra, C., Skarin, H., Anniballi, F., Fenicia, L., Bano, L., Drigo, I., Koene, M., Bayon-Auboyer, M.H., Buffereau, J.P., De Medici, D., Fach, P., 2012. Neurotoxin gene profiling of *Clostridium botulinum* types C and D native to different countries within Europe. *Appl Environ Microbiol* 78, 3120-3127.

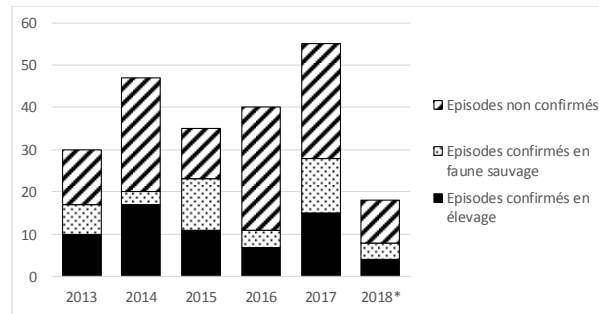


Figure 1 : Nombre de suspicions de botulisme analysées entre 2013 et 2018 et répartition des épisodes confirmés (* : Janvier-Août 2018)

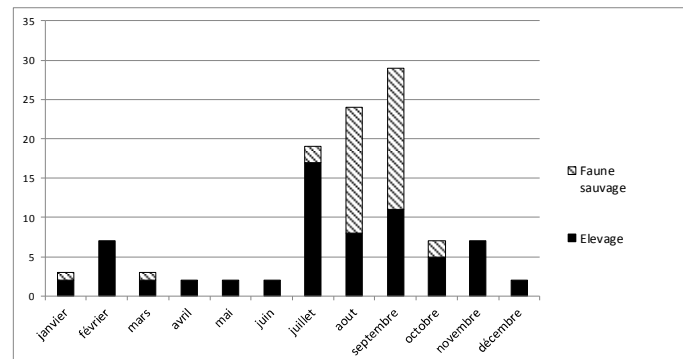


Figure 2. Répartition des épisodes de botulisme aviaire en fonction des mois de l'année

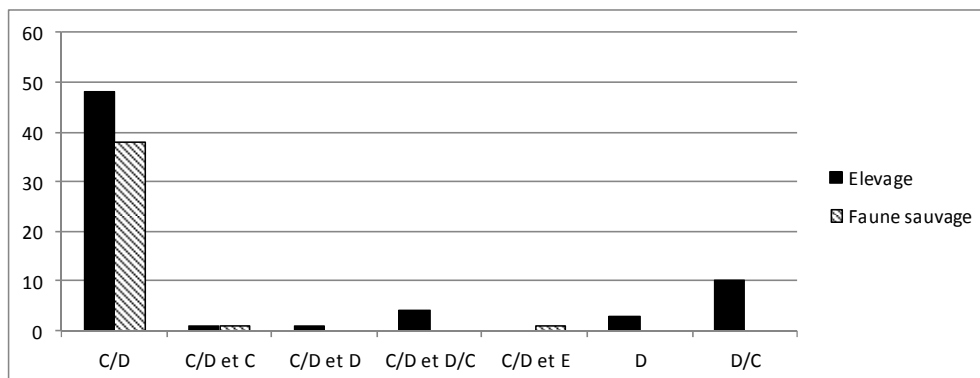


Figure 3. Répartition des épisodes de botulisme en fonction du type toxinique

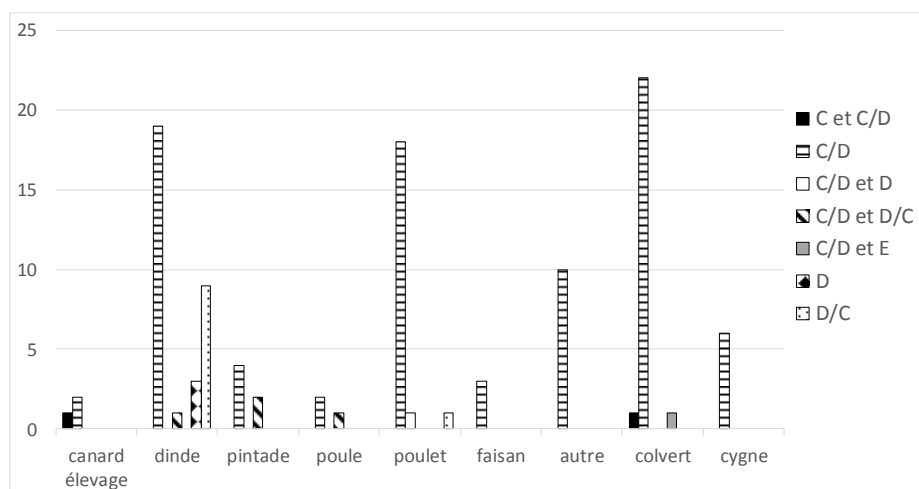


Figure 4 : Répartition des types toxiques en fonction des espèces

ENDOCARDITES INFECTIEUSES CHEZ LE CANARD MULARD : ETUDE EPIDEMIOCLINIQUE ET ASSOCIATION ETIOLOGIQUE DE *STREPTOCOCCUS* *PLURANIMALIUM*

M. Souvestre¹, L. Robertet¹, S. Castaing², E. Huchin³, L. Deffreix⁴, L. Corrand⁵, D. Dubois⁶, G. Croville¹, M.-N. Lucas¹, M. Delverdier¹, E. Oswald⁶ et J.-L. Guérin¹

¹ENVT, INRA, ENVT 23, chemin des Capelles, 31076 Toulouse, France

²Biovol 47 - Réseau Cristal, Vignes de la justice, 47150 Monflanquin, France

³Abiopole, Cabinet vétérinaire, 19270 Ussac, France

⁴SOCSA Elevage 40, 281 avenue du Béarn, 40330 Amou, France

⁵Anibio, ENVT, ENVT 23, chemin des Capelles, 31076 Toulouse, France

⁶Service de Bactériologie, CHU Toulouse Purpan, 31100 Toulouse, France

jl.guerin@envt.fr

RÉSUMÉ

L'infection à *Streptococcus pluranimalium* associée à des septicémies et des endocardites valvulaires a été décrite chez le poulet de chair (Hedegaard et al., 2009). Elle n'a toutefois jamais été rapportée chez le canard. Entre Janvier et Mars 2018, quatorze élevages de canards mulards prêts à gaver de divers départements du Sud-Ouest ont présenté de la mortalité soudaine sur des sujets de 15 à 58 jours. L'étude a été menée sur onze de ces élevages. A l'autopsie, un tableau lésionnel identique a été observé sur les animaux présentant une nécrose de la rate et une endocardite végétante sévère touchant la valve mitrale. A l'histologie, le tableau incluait une endocardite végétante septique, une congestion hépatique et/ou pulmonaire passive ainsi que des infarcti myocardiques et spléniques. Des examens bactériologiques complétés par des analyses moléculaires ont été réalisés sur les végétations présentes sur les valves mitrales et ont mis en évidence *Streptococcus pluranimalium*. Des analyses PCR complémentaires recherchant la présence d'éventuels agents viraux (parvovirus de la maladie de Derzsy, circovirus, polyomavirus) ont été également réalisées et ont révélées 7 élevages positifs pour le virus de la maladie de Derzsy. A plus long terme, l'inclusion de nouveaux cas spontanés et éventuellement la reproduction expérimentale de l'infection permettra de mieux comprendre le rôle étiologique propre de *S. pluranimalium* et la pathogénèse.

ABSTRACT

Infectious endocarditis in the mule duck: clinical epidemiology and etiological association of *Streptococcus pluranimalium*

Streptococcus pluranimalium infection associated with septicemia and valvular endocarditis has been reported in broiler chickens (Hedegaard et al. 2009). However, it has never been reported in ducks. Between January and March 2018, fourteen farms breeding mule duck in several departments of South West of France showed sudden mortality between 15 and 58 days of age. The study was conducted on eleven of these farms. At necropsy were observed a splenomegaly with a usually associated spleen necrosis, severe vegetative endocarditis affecting the mitral valve. Histological exams were in line with macroscopic observations and illustrated the vegetative septicemic endocarditis, passive hepatic and / or pulmonary congestion, and myocardial and splenic infarction. Bacteriological exams supplemented by molecular analyzes were carried out on vegetative lesions observed on the mitral valves and *Streptococcus pluranimalium* was identified. Additional PCR assays for the presence of other viral agents of interest (parvovirus of Derzsy's disease, circovirus, polyomavirus) were also performed and 7 farms were positive for the Derzsy's parvovirus. Looking further ahead, including new field cases and possible experimental reproduction of the infection will give the opportunity to more precisely assess the pathogenesis and etiological role of *Streptococcus pluranimalium*.

INTRODUCTION

Au début de l'année 2018, le Sud-ouest de la France a connu une forte incidence de cas de mortalité anormale dans certains élevages de canards mulards prêts à gaver (PAG). Les principales lésions observées étaient une splénomégalie sévère associée à des lésions d'endocardites végétantes et d'infarcti spléniques.

Chez les galliformes, les septicémies bactériennes conduisant à des lésions d'endocardite sont très souvent associées aux genres *Streptococcus* et *Enterococcus* (Hedegaard et al., 2009; Bisgaard et al., 2010). Ainsi, une infection expérimentale sur des poulets reproducteurs de chair a démontré le rôle de *Streptococcus pluranimalium* dans la survenue des lésions d'endocardites (Hedegaard et al., 2009). L'absence de cas d'endocardites rapportées chez le canard dans la littérature et la survenue antérieure d'épisodes sporadiques similaires en France ont justifié la mise en place d'une collaboration entre l'ENVT et les vétérinaires praticiens.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Description de l'étude clinique

Sur la période de janvier à mars 2018, une mortalité anormale associée à un isolement et une identification Maldi-Tof par les laboratoires vétérinaires partenaires de *Streptococcus pluranimalium* a été rapportée dans quatorze élevages de canards mulards prêt-à-gaver, dans divers départements du Sud-Ouest (Corrèze, Aveyron, Landes, Lot). Il a été demandé aux vétérinaires des élevages concernés d'envoyer les colonies isolées des élevages touchés ou d'effectuer un suivi d'élevage en collaboration avec l'ENVT. 7 souches issues de 7 élevages différents ont été envoyées à l'ENVT et quatre élevages ont été directement audités par l'ENVT permettant l'autopsie d'animaux, la collection de prélèvements ainsi que la réalisation d'examen complémentaires sur organes. Ainsi, 11 souches de 11 élevages différents ont été collectées. Sur deux des quatre élevages audités, il a été réalisé, en plus des analyses bactériologiques et histologiques sur lésions, une approche moléculaire.

1.2. Histopathologie

Dans deux élevages investigués, les cœurs présentant des endocardites ont été fixés dans du formol à 10% et une analyse histologique a été réalisée par le laboratoire d'histologie de l'ENVT.

1.3. Examen bactériologique

Sur les quatorze élevages répertoriés, 7 souches identifiées comme étant du *Streptococcus pluranimalium* nous ont été envoyées par les laboratoires partenaires. Leur isolement a été réalisé

par ensemencement sur gélose au sang à 5% sang de mouton (Biorad - ref 63784) puis incubé pendant 16h à 37°C en aérobie et/ou atmosphère enrichie en CO₂. Une lecture culturale suivi d'un repiquage, une coloration de Gram, un test catalase et une identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF ont été réalisés avant le transfert des isolats à l'ENVT envoyés en gélose de conservation (Biorad – ref 63683).

Dans les 4 élevages suivis par l'ENVT, les animaux ont été autopsiés et les organes prélevés entiers le plus stérilement possible. Les cœurs, foie et rate ont été cautérisés en surface avant d'être ouverts sous hotte à flux laminaire. Lors de la dissection du cœur gauche, des fragments de bourgeonnements anormaux situés sur la valve mitrale ont été prélevés et étalés sur gélose Columbia + 5% sang de mouton (COS) (Biomerieux - ref 43041). Après lecture, les colonies présentant une hémolyse partielle (alpha) ont été repiquées sur gélose Acide Nalidixique Colistine + 5% sang de mouton (CNA) (Biomerieux – ref. 43071) puis incubés 24h à 48h sous cloche, en atmosphère enrichie en CO₂ à 37°C avant d'être déposées sur plaque afin d'être identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (MALDI-Bio Typer, Bruker ©, Billerica, Etats-Unis).

1.3. Biologie moléculaire

Il a été découpé 3mm³ de valve mitrale présentant des lésions puis il a été réalisé deux lyses chimiques sur tissu à l'aide du kit DNeasy blood and Tissue Kits (Qiagen ©). L'ADN a été extrait à l'aide du Nucleospin RNA virus kit (Macherey-Nagel ©, Düren, Allemagne) à partir de végétations prélevées stérilement sur les valves mitrales. Une PCR classique a été réalisée à l'aide du couple d'amorces 534R-27F ciblant la région d'intérêt V1-V3 de l'ARN 16S. Les mélanges PCR ont été réalisés à l'aide du KAPA Taq PCR kit (Sigma-Aldrich©, St. Louis, USA) et contenait 16,9 µL d'eau distillée, 2,5µL of 10x KAPA Taq buffer, 0,5µL of 10mmol/litre KAPA dNTP mix, 1µL of 10 µmol/litre d'amorce 27F (Jiang et al., 2006) et 1µL de 10 µmol/litre d'amorce 534R (Muyzer, et al., 1993), 0,1 µL of KAPA Taq polymérase et 3 µL d'ADN. Le programme d'amplification a débuté par une étape de 3 minutes à 95°C suivie de 40 cycles aux conditions suivantes : 30 s à 95°C, 30 s à 50°C et 60 s à 72°C. La fin du programme s'est terminée par 3 min à 72°C. La taille du fragment d'ADN amplifié était de 490 pb.

Les produits d'amplification ont été purifiés après une migration sur gel d'agarose à 1,5% de 40 minutes à l'aide du kit Nucleospin Gel and PCR Clean up (Macherey-Nagel ©, Düren, Allemagne). Le séquençage du fragment d'ADN a été réalisé par GATC (Eurofins Genomics Compagny, Allemagne) par la méthode Sanger. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel BioEdit © afin de réaliser un blast

des séquences (Altschul et al., 1990)) pour confirmer l'identification.

2. RESULTATS

2.1. Autopsies et analyse histologique

Les 11 élevages de canards présentant des signes cliniques étaient âgés de 15 à 58 jours. Ils présentaient une forte hétérogénéité associée à une mortalité brutale comprise entre 1.1 et 30% du lot indépendamment de l'état des canards (petits sujets ou sujets en très bon état corporel). Il a aussi été constaté dans deux élevages la présence assez importante de becs courts et de canards ayant des « profils d'oies » au sein du lot, pouvant faire suspecter une atteinte par la maladie de Derzsy. A l'autopsie des cas suivis par l'ENVT, une cardiomégalie et une splénomégalie sévères avec présence de foyers nécrotiques allant jusqu'à 5 mm de diamètre étaient présentes (Figure 1a)). De même, à l'ouverture des cœurs présentant une cardiomégalie, les valves mitrales étaient dans la très grande majorité touchées par des lésions d'endocardites végétantes (Figure 1b).

Les animaux autopsiés par les différents laboratoires vétérinaires présentaient également systématiquement ces deux observations : splénomégalie avec foyers nécrotiques (Figure 1c) et endocardites végétantes comme lésions principales.

L'analyse histologique a mis en évidence :

- Un thrombus volumineux, fibrino-leucocytaire et adhérent en surface de la valve mitrale avec de très nombreuses colonies bactériennes, des infarcti myocardiques (Figure 2a) évocateur d'une endocardite végétante septique.
- Un large foyer fibrino-nécrotique et hémorragique au sein de la pulpe splénique cerné d'une réaction macrophagique avec cellules géantes multinucléées (Figure 2b), des infarcti spléniques.
- Une congestion hépatique et/ou pulmonaire passives

2.2. Analyses microbiologiques et virologiques

Dans les 4 élevages étudiés, les examens bactériologiques à partir des végétations ont mis en évidence des cultures pures de colonies bactériennes d'aspect lisse blanchâtre de petite taille présentant une hémolyse partielle (Figure 3a). Les colonies à partir de chacun des élevages ont été identifiées par spectrométrie de masse comme étant du *Streptococcus pluranimalium*. Dans le cadre de l'approche moléculaire, le séquençage a montré que les deux séquences d'ADN correspondaient bien à l'espèce *Streptococcus pluranimalium* et que celles-ci possédaient un pourcentage d'homologie similaire (isolat 13 et 14). De plus, les 7 isolats provenant des

isolements de terrain ont également été reconfirmées par MALDI-TOF à l'ENVT. Dans un des élevages présentant deux bâtiments, il a été isolé deux souches. Il a ensuite été réalisé un dendrogramme de 12 souches provenant des 11 élevages étudiés afin d'évaluer leur degré de similitudes (Figure 3b). Les vétérinaires associés ont également transmis les résultats complémentaires d'analyses PCR réalisés par Scanelis© (9 Allée Charles Cros, 31771 Colomiers Cedex, France) sur écouvillon cloacal, rate et bourse de Fabricius prélevés dans les différents élevages. Ainsi, sur les onze élevages répertoriés, 7 étaient positifs pour la PCR ciblant le parvovirus de la maladie de Derzsy (GPV) avec des charges variables. Un seul lot était également positif pour la PCR circovirus du canard (DuCV).

2.3. Pathogénie de l'infection

En médecine humaine, l'endocardite infectieuse est très bien décrite avec notamment une forte proportion d'endocardites à streptocoques et à staphylocoques. L'association des lésions d'endocardites et des foyers nécrotiques observée sur la rate s'explique par un mécanisme très bien décrit en médecine humaine. Dans le cas précis des streptocoques causant des endocardites, une septicémie sévère entraîne la formation de nombreux thrombi végétants à la surface de la valve. L'infection devient alors chronique et des embolies bactériennes sont relâchées à intervalles réguliers dans la circulation générale. Ceux-ci peuvent notamment atteindre la rate et former des abcès spléniques (McDonald et al., 2009). Les lésions observées sur les valves et endocarde peuvent rapidement conduire à une insuffisance cardiaque et peuvent expliquer la mort subite observée chez ces canards. On peut supposer dans notre cas que *Streptococcus pluranimalium* est ici la cause des lésions d'endocardites et d'infarcti spléniques. Cependant, l'origine de cette septicémie sévère reste à éclaircir. En effet, elle peut être le résultat du pouvoir pathogène primaire de *Streptococcus pluranimalium*, ou être secondaire à l'action d'un facteur immunosuppresseur, comme par exemple le virus de la maladie de Derzsy. En effet, celui-ci est souvent présent en élevage car sa circulation dépend de la biosécurité existante sur l'élevage et de la protection vaccinale des reproducteurs. De la même façon, un stress environnemental ou une erreur technique peuvent également être à l'origine d'une baisse immunitaire favorisant les infections bactériennes.

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude a permis de mettre en lumière plusieurs cas d'infection à *Streptococcus pluranimalium* dans des élevages de canards mulards PAG du Sud-Ouest. Le tableau lésionnel associé a présenté des lésions d'endocardites végétantes septiques encore jamais observées à ce jour chez le canard. L'analyse en cours

du génome complet de 2 souches permettra de documenter le contenu génétique dont les facteurs de virulence ainsi que la variabilité. Une amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD), une approche multi-locus (MLST) et des comparaisons de génomes

permettront également de mieux apprécier la proximité des souches identifiées. En complément, une infection expérimentale permettra de mieux comprendre la pathogénie du processus infectieux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bisgaard M, Bojesen AM, 2010. Avian Pathology., (39), 3.
 Hedegaard L., Christensen H., 2009. Avian Pathology, (38), 155–160.
 McDonald, Jay R., 2009. Infectious Disease Clinics of North America. (23), 643–664.
 Altschul SF1, Gish W., 1990. Basic local alignment search tool., Oct 5; 215(3) : 403-10.
 Muyzer, G.A, de Waal E.C, 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol. 59 (3) : 695-700.
 Jiang H., Dong, H., 2006. Microbial Diversity in Water and Sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline Lake in Northwestern China. Appl Environl Microbiol. 72 (6).

REMERCIEMENTS

La docteure Sonia Chesnier (Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal), les vétérinaires praticiens, les éleveurs et les étudiants en clinique aviaire à l'ENVT ont contribué aux résultats de cette étude.

Figure 1 : Tableau lésionnel macroscopique de canards infectés à *Streptococcus pluranimalium*. a) La flèche indique les foyers nécrotiques sur l'épicaarde. b) Le cœur ouvert présente des végétations sur la valve mitrale. c) Illustration d'un foyer nécrotique sur une rate hypertrophiée.

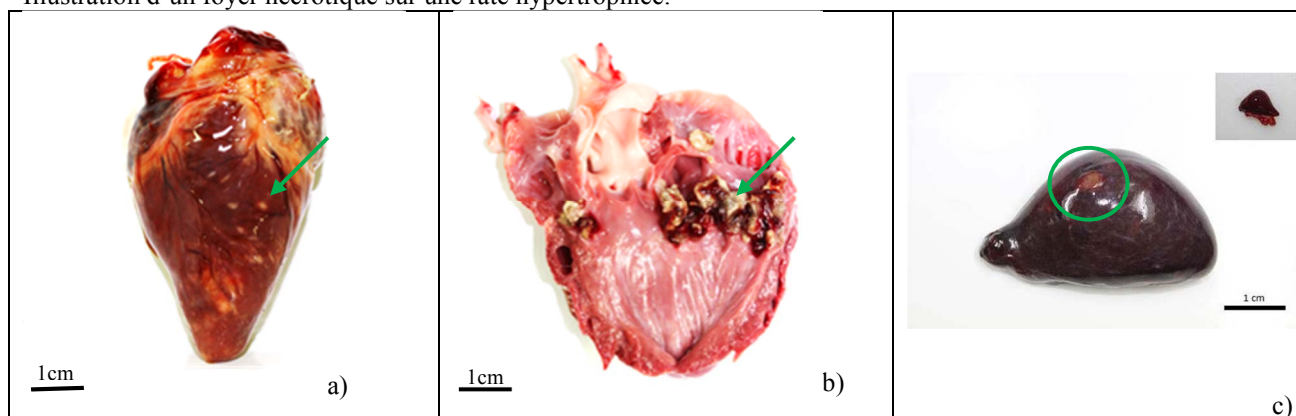


Figure 2 : Tableau lésionnel microscopique des lésions végétantes prélevées sur les valves mitrales

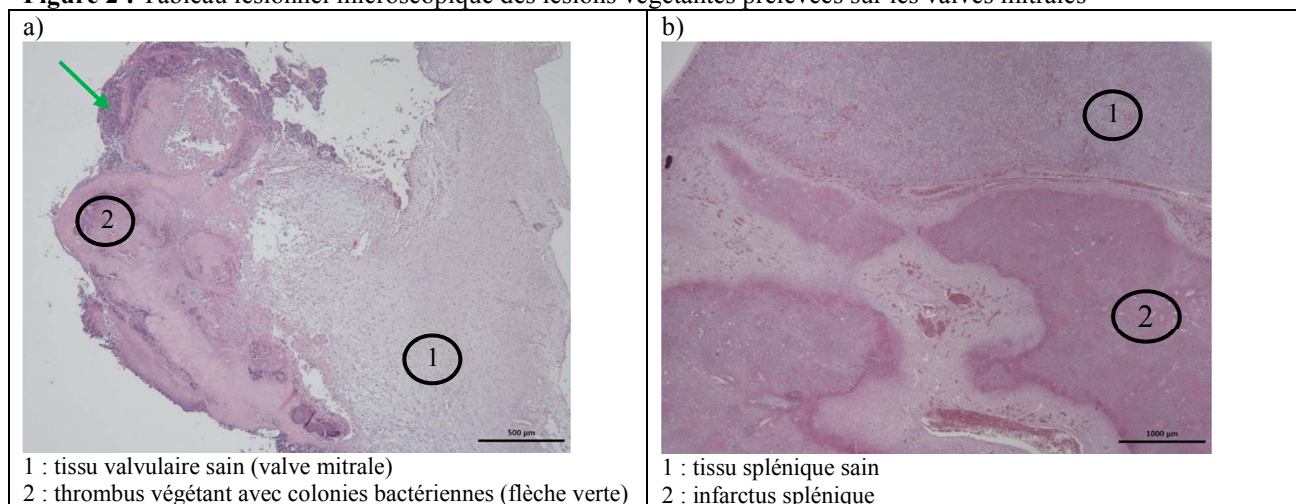
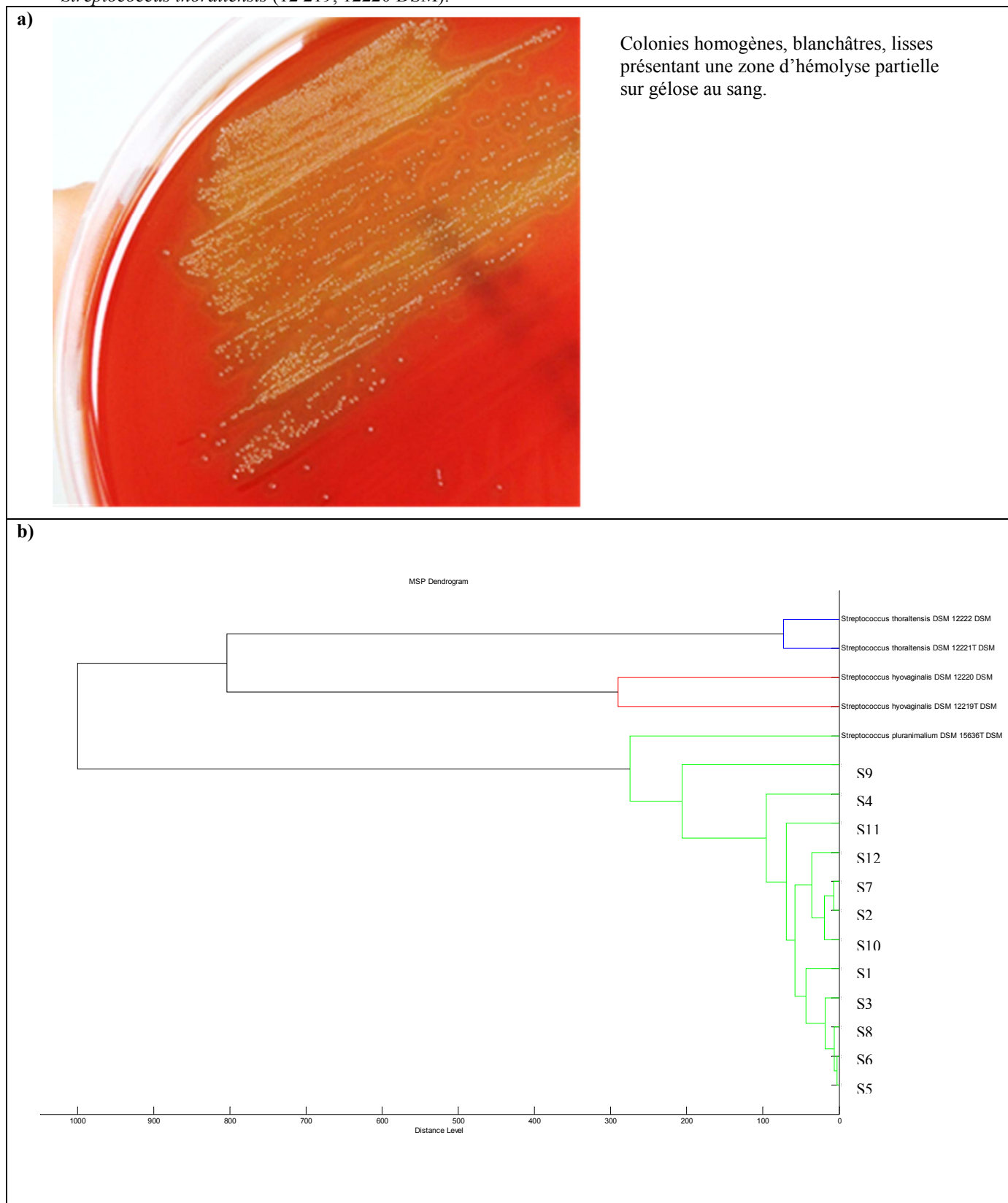


Figure 3. a) Aspect des colonies sur gélose au sang et identification par MALDI-TOF des isolats. La figure a) illustre l'aspect des colonies *Streptococcus pluranimalium* présentes sur gélose COS. **b)** Dendrogramme de 12 souches isolées (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12) ainsi que des souches de la base de donnée commerciale Bruker souche de *Streptococcus pluranimalium* (15636 DSM) ainsi qu'un « outgroup », ici des isolats des deux espèces les plus proches de *Streptococcus pluranimalium* (*Streptococcus hyovaginalis* (12 221, 12222 DSM) et *Streptococcus thoraltensis* (12 219, 12220 DSM).



CONTEXTE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA COCCIDIOSE DU POULET DE CHAIR :

Evaluation des âges à risque par l'analyse d'une base de données

Goudeau Christèle¹, Lartet Myriam¹, Creux François¹ et Agnes-Montagu Christine¹

¹ELANCO FRANCE -24, bd Vital Bouhot, CS 50004, 92521 NEUILLY SUR SEINE CEDEX
goudeau_christele@elanco.com

RÉSUMÉ

La coccidiose est une maladie due à des parasites microscopiques, les coccidies. Cette maladie peut induire une perte économique estimée à 10 centimes par poulet lorsqu'elle est associée à une entérite subséquente. Ainsi, un gaspillage des ressources naturelles estimé à 6% (eau de boisson, aliments, et terres agricoles) associés à des impacts sur le bien-être des poulets et la sécurité alimentaire du consommateur, sont les conséquences qui menacent la durabilité de la filière avicole. Les coccidies sont omniprésentes dans l'environnement car très difficiles à détruire. Elles touchent toutes les productions de volailles qu'elles soient conventionnelles ou de plein air. **Elanco** propose un outil de pilotage de la santé des poulets HTS (Health Tracking System) depuis plus de 15 ans. Pour chaque organisation de production partenaire, le suivi est réalisé sur un minimum de 10% des lots mis en place tous les mois. Pour chaque lot, 5 poulets vivants sont prélevés autour de 21 jours et plus et font l'objet de 38 points de contrôles nécrosiques pour évaluer la présence de lésions. L'évaluation des lésions de coccidioses selon les indices de Reid et Johnson font partie intégrante du contrôle pour la partie digestive. En France, sur les 3 dernières années, la base HTS totalise l'enregistrement de données sanitaires sur près de 33 000 poulets échantillonnées dans environ 6600 lots de poulets conventionnels et certifiés. Les trois espèces de coccidies retrouvées sont *E. acervulina* ; *E. maxima* et *E. tenella*. L'âge auquel apparaît le pic lésionnel varie selon l'espèce de coccidie. C'est entre 20 et 29 jours que la proportion de poulets atteints de lésions modérées à élevées est la plus importante pour les espèces *E. maxima* et *E. acervulina*, avec un rebond pour cette dernière entre 34 et 37 jours. L'âge critique vis-à-vis d'*E. tenella* se situe entre 33 et 37 jours. L'analyse épidémiologique de l'incidence de ces parasites est un atout majeur pour choisir un programme antiparasitaire adapté à son contexte.

ABSTRACT

Epidemiological context of coccidiosis in broiler chicken: Assessment of at-risk ages through database analysis.

Coccidiosis is a disease caused by microscopic parasites, coccidia. This disease can cause an economic loss up to 10 cents per chicken in case of subsequent enteritis. Thus, an estimated 6% waste of natural resources (drinking water, feed, and agricultural land) associated with impacts on chicken welfare and consumer food safety are the consequences that threaten the sustainability of the poultry sector. Coccidia are omnipresent in the environment because they are very difficult to destroy. They affect all poultry production, whether conventional or outdoor. Elanco has been offering HTS (Health Tracking System) health management tool for more than 15 years. For each partner production organization, monitoring concerns 10% of the minimum flocks each month. For each flock, five live broilers are sampled around 21 days old and more and 38 necrotic control points are evaluated by necropsy. The evaluation of coccidiosis lesions according to Reid and Johnson indices is an integral part of the control for the digestive part. In France, over the last 3 years, Elanco's database has included nearly 33,000 autopsied broilers sampled in approximately 6600 conventional or free range flocks. The three species of coccidia found are *E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella*. The age at which the peak of lesions appears varies according to the species of coccidia. For *E. maxima* and *E. acervulina*, lesions are highest between 20 and 29 days, with a second peak between 34 and 37 days. The critical age for *E. tenella* is between 32 and 37 days. Epidemiological analysis of the incidence of these parasites is a major asset in choosing an appropriate parasite control program.

INTRODUCTION

Une perte d'intégrité liée à la coccidiose et aux entérites subséquentes peut avoir un impact important sur la durabilité de la filière poulet. Van der Sluis (2000) et Williams (1999) estime que l'impact économique peut aller jusqu'à 10 cents d'€ par poulet. Les ressources naturelles peuvent être également impactées par un gaspillage de 6% de la consommation d'eau de boisson, d'aliment, et des surfaces agricoles (Bostvironnois and al, 2010). Enfin, coccidiose et entérites subséquentes impactent le bien-être animal en entraînant la dégradation des litières favorisant l'apparition notamment d'ampoules de bréchet (Clave and al, 2004) ou de pododermatites.

La coccidiose est une maladie due à des parasites microscopiques, les coccidies, omniprésentes dans l'environnement de tous types de production de volaille.

Un suivi épidémiologique robuste reste un pilier important pour choisir un programme antiparasitaire adapté.

Depuis plus de 15 ans, le suivi HTS (Health Tracking System) d'Elanco aide les organisations de production à piloter au plus près la santé des poulets. Ce suivi sanitaire permet, au travers de l'évaluation de 38 points de contrôle nécrosiques, d'évaluer les pertes d'intégrité intestinale associées à d'éventuels dommages collatéraux tels que des lésions induites sur l'appareil locomoteur, l'appareil respiratoire et la qualité des carcasses.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. L'échantillonnage des lots inclus dans HTS

Le suivi HTS concerne la production de poulets de chair conventionnel et label. Il repose sur la réalisation d'autopsies sur un minimum de 10% des lots mis en place chaque mois dans les organisations de productions partenaires. Environ une 15^{ème} d'organisations sont suivis tous les mois. L'essentiel du suivi porte sur des organisations de production de poulets de chair conventionnels et certifiés. Les lots sont choisis aléatoirement parmi le parc de production de chaque structure de production. Pour chaque troupeau, 5 poulets vivants représentatifs du lot sont prélevés de façon aléatoire dans le poulailler autour de 21 jours et plus, la plupart des contrôles s'effectuant entre 23 et 28 jours.

1.2. Le guide référentiel

Après avoir respecté les bonnes pratiques d'euthanasie, 38 points de contrôles sont réalisés sur les 5 poulets prélevés dans chaque troupeau. Un guide référentiel permet d'établir la définition de chaque point de contrôle ainsi que les barèmes de notation de

l'intensité des lésions. Le barème peut s'étendre de 0 (absence de lésion) jusqu'à 3 à 4 (lésions très sévères) selon les points de contrôle lésionnels. Pour permettre, une certaine précision dans la notation de l'opérateur, chaque score lésionnel est illustré par une photo. Pour ce qui concerne les lésions de coccidioses, les indices lésionnels sont notés selon la méthode de Reid and Johnson (1970).

Le suivi des paramètres concerne en majorité la santé digestive (lésions de coccidiose et intégrité intestinale). D'autres aspects sont également contrôlés : aspects locomoteurs (pododermatites), santé respiratoires, immunitaire et qualité des carcasses (griffures et lésions cutanées infectieuses).

1.3. La base de données

En France, une vaste base de données compile tous les résultats des analyses HTS réalisées via des laboratoires vétérinaires spécialisés (27 laboratoires partenaires). Sur les trois dernières années (2015, 2016, 2017), environ 33000 poulets de chair conventionnels et certifiés, prélevés dans près de 6600 élevages, ont été inclus dans le suivi HTS. Des poulets labels sont également inclus dans ce suivi mais dans une moindre mesure. De ce fait, les résultats suivant ne concerneront que les poulets conventionnels et certifiés.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

L'analyse des données HTS collectées en production de poulets de chair conventionnels et certifiés, sur les trois dernières années (2015, 2016, 2017) montrent les éléments suivants :

- Sur ces productions, trois espèces de coccidies sont retrouvées : *E. acervulina*, *E. maxima* et *E. tenella* au travers des notations de lésions qui leur sont spécifiques selon les indices de Reid and Johnson (1970). Selon Repérant (2015), certaines espèces comme *E. mitis* ou *E. praecox* se manifestent par des lésions qui ne sont pas faciles à mettre en évidence car peu caractéristiques. Leur suivi épidémiologique reste donc compliqué à mener. Il ne faudrait pas pour autant déduire que ces espèces sont inexistantes sur le terrain et n'impactent pas les lots de poulets. Pour les espèces comme *E. necatrix* et *E. bruneti* décrites parmi les 7 espèces de coccidies de l'espèce *Gallus gallus*, il est évalué que ces deux espèces apparaissent plus tardivement (Repérant, 2015) à partir de 8 semaines d'âge et plus et concernent principalement l'élevage de poulettes futures pondeuses.
- Il est reconnu que les lésions de score ≥ 2 sur l'échelle Reid et Johnson impactent les performances de croissance des poulets pour *E. acervulina* et *E. maxima* (Conway and al, 1993 et Mc Dougald and al, 1997). La

localisation de ces deux espèces de coccidies dans l'intestin grêle explique l'impact majeur qu'elles peuvent avoir sur la croissance des oiseaux. En effet, cette partie du tube digestif est le siège des transformations et de l'absorption des nutriments au travers des villosités. Toutes destructions de ces dernières entraînent une perturbation dans la valorisation des nutriments et la couverture des besoins de croissance. Le suivi HTS met en évidence deux périodes à risque concernant l'impact d'*E. acervulina* et d'*E. maxima* sur les performances de croissance : de 20 à 29 jours et de 34 à 37 jours. Sur ces périodes, 20% des poulets environ de notre échantillonnage présentaient un risque d'impact sur leur croissance du fait de lésions de coccidiose à *E. acervulina* ≥ 2 . L'incidence des lésions d'*E. maxima* était bien moindre : en moyenne 2,7% de l'échantillonnage présentant des risques de perte de croissance liées à des indices lésionnels ≥ 2 , sur la période de 20 à 29 jours.

- Concernant *E. tenella*, le pic lésionnel se situe entre 33 à 37 jours. Les impacts lésionnels de cette coccidie restent

probablement plus limités sur la croissance des poulets du fait de sa localisation dans les caeca, partie de l'intestin moins essentielle à l'efficacité de la transformation et de l'absorption des nutriments.

CONCLUSION

Le suivi HTS d'Elanco (Heath Tracking System) permet de mettre en évidence les lésions de coccidiose et le risque de perte d'intégrité intestinale associée à celle-ci. Le recueil d'informations épidémiologiques sur cette maladie est fondamental pour adapter au mieux les programmes de contrôle.

La perte d'intégrité intestinale peut avoir un impact important sur la durabilité de la filière poulet : impact économique, impact sur la santé et le bien-être animal, et impact sur les ressources naturelles.

C'est pourquoi, en complément de pratiques d'hygiène rigoureuses, d'un bon programme nutritionnel, d'une eau de qualité, d'une ventilation efficace, la mise en place d'un programme antiparasitaire adapté, tout au long de la vie des poulets est un choix pertinent et une solution durable.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Van der Sluis, W. (2000) "Clostridial enteritis is an often underestimated problem." World Poultry. 16(7): 42-43.
- (2) Williams, R. (1999). "A compartmentalized model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry." International Journal for Parasitology. 29(8):1209-1229.
- (3) Bostvironnois, C. and al. (2010). "Economical impact of losing intestinal integrity in broilers: new data", Poster in XIIIth European Poultry Conference- Tours, 2010.
- (4) Clave and al. (2004). "Essai de comparaison de différentes préventions anticoccidiennes chez le poulet label à chair jaune". Sciences et techniques avicoles N° 47, p 4-8.
- (5) Reid, J. and Johnson, W. M. (1970). "Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens"- Experimental Parasitology, Vol. 28, Issue 1, p 30-36
- (6) Repérant J. M. (2015). "La coccidiose du poulet de chair: le parasite, la maladie, les bonnes pratiques d'un diagnostic de coccidiose"-AVIPOLE FORMATION Ploufragan, 1-34.
- (5) Conway, D. P. and al (1993). "Effects of Different Levels of Oocyst Inocula of *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, and *E. maxima* on Plasma Constituents, Packed Cell Volume, Lesion Scores, and Performance in Chickens" - Avian Diseases, Vol. 37, No. 1, p.118-123.
- (6) Mc Dougald, L. R. and al. (1997) Protozoa (chap 34) – Coccidiosis- Diseases of Poultry, 10th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, p 867-878

Figure 1. % de poulets dont la croissance est impactée par une coccidiose à *E. acervulina* et *E. maxima* en fonction de l'âge de production

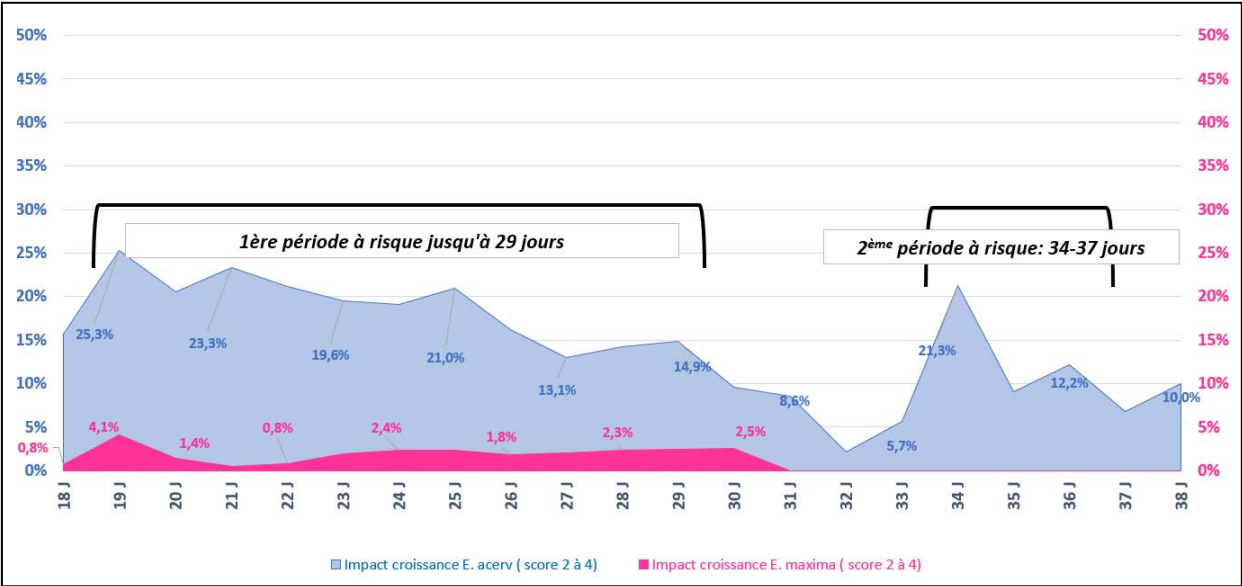
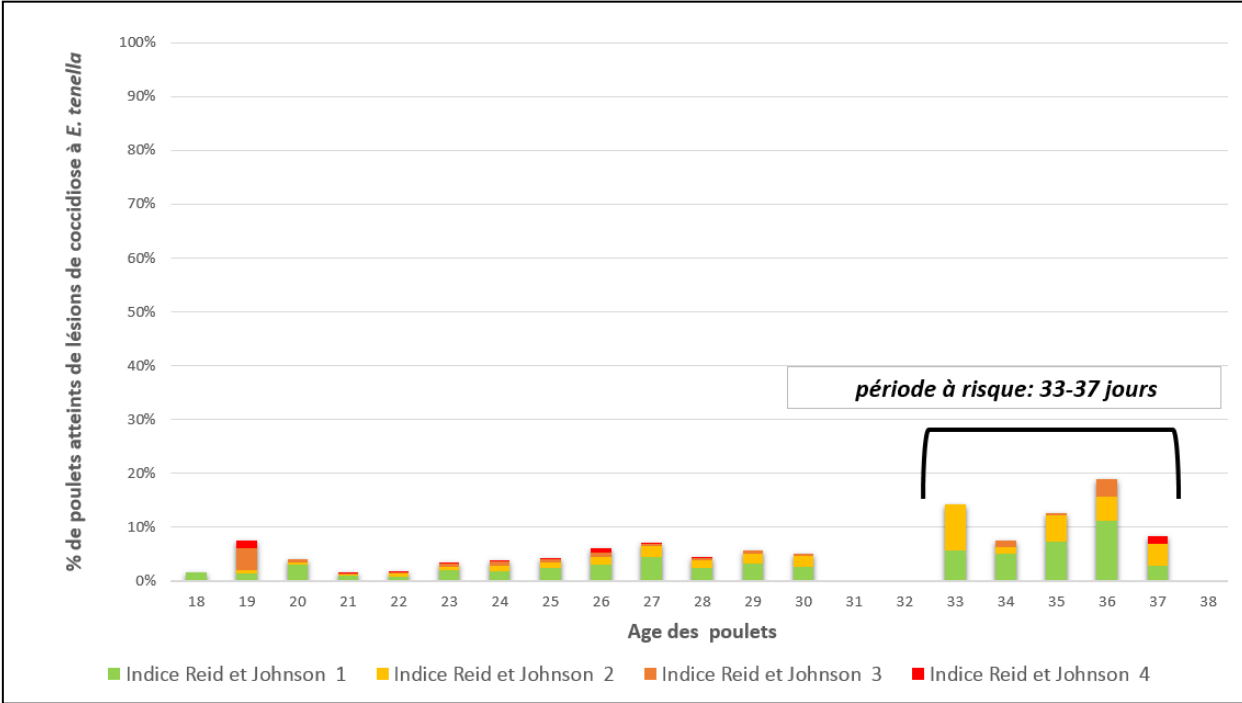


Figure 2. Evolution du % de poulets atteints par classe d'indices de Reid et Johnson selon l'âge (*E. tenella*)



ETUDE DE L'EVOLUTION TEMPORELLE DE LA RESISTANCE ET DE LA VIRULENCE DES *E. COLI* INTESTINAUX DU POULET DE CHAIR

Mourand Gwenaelle¹, Le Devendec Laetitia¹, Dieng Gilbert¹, Keita Alassane¹, Amelot Michel¹, Jaunet Hervé², Dia Mohamed El Hassimiou² et Kempf Isabelle¹

¹ Anses laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Zoopole les croix, 22440 Ploufragan, France

² ZOOPOLE développement, 2 rue Jean Rostand - BP 7, 22440 Ploufragan

Isabelle.Kempf@anses.fr

RÉSUMÉ

L'évolution de la population d'*Escherichia coli* résistants à différents antibiotiques ou porteurs de gènes de virulence a été étudiée au cours de la vie de poulets de chair. Deux expérimentations ont été conduites en animaleries protégées sur poussins conventionnels élevés sur litière. A l'âge d'un jour, la moitié des poussins (premier essai) ou tous les poussins (second essai) ont été inoculés par voie orale avec deux souches d'*E. coli* résistantes au cefotaxime, ceftiofur, tétracycline, fluoroquinolones, triméthoprim et/ou sulfamides. Des prélèvements de matières fécales ont été collectés chaque semaine, ainsi que les caeca des oiseaux sacrifiés à 2, 3 ou 6 semaines d'âge. Les titres d'*E. coli* totaux ou résistants à différents antibiotiques ont été déterminés et la présence de quatre gènes de virulence (*ompT*, *iutA*, *iroN* et *iss*) a été recherchée.

Aucun *E. coli* résistant au cefotaxime ou à la ceftiofur n'a été détecté chez les sujets non-inoculés. Pour le premier essai, les deux souches ont colonisé tous les oiseaux inoculés. Leurs titres dans les matières fécales ont décliné régulièrement de J7 à J41, mais tous les caeca des oiseaux sacrifiés à J42 étaient positifs. La caractérisation des isolats a montré que les gènes de résistance *bla*_{CMY-2} ou *bla*_{CTX-M-1} présents dans les souches inoculées pouvaient être transférés vers d'autres *E. coli* commensaux des poulets. Pour le second essai, les titres d'*E. coli* résistants au cefotaxime, à la ceftiofur et à la gentamicine ont montré une décroissance, mais les nombres d'*E. coli* résistants à la ciprofloxacine étaient stables. Le nombre de gènes de virulence d'*E. coli* par souche semble également globalement décroître lors des premières semaines. Cette étude montre que les populations d'*E. coli* du poulet de chair évoluent avec l'âge des oiseaux. Des transferts spontanés de gènes de résistance sont observés.

ABSTRACT

Time evolution of resistance and virulence of broilers intestinal *Escherichia coli*

The evolution of the antimicrobial-resistant and virulence genes-carrying intestinal *E. coli* was studied during the broiler lifetime. Two experiments were conducted on conventional chicks in animal facilities. At one day of age, chicks were orally inoculated or not inoculated with two *E. coli* strains resistant to cefotaxime, ceftiofur, tetracycline, fluoroquinolones, trimethoprim and/ or sulfonamides. Fecal samples were collected weekly, and ceca were obtained from birds sacrificed at 2, 3 or 6 weeks of age. Titers of *E. coli* or *E. coli* resistant to different antimicrobials were determined, as well as the presence of virulence genes.

No cefotaxime- or ceftiofur-resistant *E. coli* was isolated from non-inoculated birds. For the first trial, the two strains colonized all inoculated birds. Their titers decreased regularly from Day 7 to Day 41, but ceca from all birds sacrificed on Day 42 were still positive. The resistance genes of the inoculated strains, *bla*_{CMY-2} or *bla*_{CTX-M-1}, were transferred to other commensal *E. coli* strains. For the second trial, titers of *E. coli* resistant to cefotaxime, ceftiofur and gentamicin decreased but the numbers of ciprofloxacin-resistant *E. coli* were stable. Ratios of virulence genes also varied with time. Globally this study shows that the broiler *E. coli* population varies with time. Spontaneous transfer of resistance genes occurs.

INTRODUCTION

L'antibiorésistance est un problème majeur de santé animale et de santé publique. Les *Escherichia coli* résistants présents dans le microbiote des poulets peuvent être à l'origine de colibacilloses aviaires et constituent également un réservoir de bactéries et de gènes de résistance susceptibles de contaminer la chaîne alimentaire, par le biais de carcasses souillées, et l'environnement lors de l'épandage des effluents. L'objectif de notre étude est d'analyser l'évolution de la population d'*E. coli* résistants à différents antibiotiques d'intérêt majeur (céphalosporines, fluoroquinolones, gentamicine) au cours de la vie de poulets de chair. Pour cela, deux expérimentations ont été conduites, sur des poussins conventionnels élevés en animaleries protégées, et inoculés ou non avec des souches multi-résistantes. Les proportions de souches d'*E. coli* porteuses de gènes de virulence extra-intestinale ont également été étudiées, en se focalisant sur les gènes prédictors d'APEC (Avian Pathogenic *E. coli*) décrits par Johnson et al. (2008).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Souches bactériennes

Deux souches d'*E. coli*, COV36 et COV38, isolées de poulets ont été utilisées. COV36 est résistante aux céfoxitine (FOX), ceftriaxone, triméthoprim sulfamides, tétracyclines et streptomycine. Elle contient un plasmide de type IncII/ST12 portant le gène *bla_{CMY-2}*. COV38 est résistante aux céfotaxime (CTX), sulfamides, tétracycline, ciprofloxacine et streptomycine, et contient un plasmide de type IncII/ST3 contenant les gènes *bla_{CTX-M-1}*, *tetA* et *sul2*. COV36 et COV38 appartiennent respectivement aux groupes phylogénétiques C et B1.

1.2. Protocole expérimental

Des poussins de chair conventionnels Ross 308 ont été élevés sur litière (n=90 pour le premier essai, n=180 pour le second essai). A l'âge d'un jour, la moitié des poussins (premier essai) ou tous les poussins (second essai) ont été inoculés par voie orale avec les deux souches d'*E. coli* (par poussin, environ 9700 CFU de chaque souche pour le premier essai, et environ 440 CFU pour le second essai). L'autre moitié des poussins du premier essai a été inoculée avec un milieu stérile. Les oiseaux non inoculés sont élevés dans une animalerie séparée. Des prélèvements de matières fécales ont été collectés chaque semaine, ainsi que les caeca des oiseaux sacrifiés à 2, 3 ou 6 semaines d'âge.

1.3. Analyse des prélèvements

Les titres d'*E. coli* totaux ou résistants à FOX, CTX, ainsi que pour le second essai à la ciprofloxacine (CIP) et à la gentamicine (GEN) ont été déterminés par ensemencement sur milieux supplémentés. Les isolats résistants ont été identifiés et caractérisés par PCR (groupes phylogénétiques (Clermont et al., 2013), présence de gènes de résistance *bla_{CMY-2}* ou *bla_{CTX-M-1}*). De plus, pour le second essai, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de ciprofloxacine ou de gentamicine ont été déterminées selon le CLSI M7-A10. Les seuils de résistance utilisés sont >0,06 mg/L pour la ciprofloxacine et >8 mg/L pour la gentamicine. Egalement pour le second essai, les gènes de virulence *iutA*, *iss*, *iroN* et *ompT* ont été recherchés par PCR. La souche *E. coli* BEN2908 (C. Schouler, INRA Nouzilly) a été utilisée comme témoin positif pour la recherche des gènes de virulence.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Premier essai

Aucun *E. coli* résistant à FOX ou CTX n'est détecté dans les matières fécales ou les caeca des oiseaux non-inoculés, confirmant l'absence de contamination initiale des poussins et l'efficacité des mesures de biosécurité entre les animaleries.

L'analyse des isolats provenant des oiseaux inoculés montre que plus de 90% possèdent le gène attendu (*bla_{CMY-2}* pour ceux obtenus sur milieu avec FOX et *bla_{CTX-M-1}* sur milieu avec CTX). La majorité de ces isolats correspond aux souches inoculées, mais certains *E. coli* porteurs de *bla_{CMY-2}* ou *bla_{CTX-M-1}* appartiennent à d'autres groupes phylogénétiques, révélant un transfert spontané de ces gènes de résistance vers des souches commensales des poulets. Les cultures des matières fécales sur milieux supplémentés en FOX ou CTX montrent des titres élevés lors des premières semaines, baissant ensuite progressivement (Tableau 1). Les caeca des poulets sacrifiés 14, 21 ou 42 jours sont tous positifs pour les milieux supplémentés en FOX ou CTX et révèlent la persistance jusqu'à l'âge d'abattage des poulets de chair des souches inoculées et/ou de souches ayant acquis *bla_{CMY-2}* ou *bla_{CTX-M-1}*.

2.2. Second essai

L'analyse des CMI d'une cinquantaine d'isolats obtenus sur les milieux supplémentés en CIP ou en GEN confirme que respectivement 100% et 90% sont effectivement résistants à ces molécules. La majorité des isolats obtenus sur milieux supplémentés en FOX ou CTX contient le gène *bla_{CMY-2}*, et non le gène *bla_{CTX-M-1}*, ce qui semble indiquer que la souche COV38 ne s'est pas implantée, peut-être en raison du plus faible inoculum utilisé lors du second essai. Le gène *bla_{CMY-2}* est présent dans d'autres isolats que COV36, suggérant un transfert de ce gène de la

souche COV36 vers d'autres souches commensales des oiseaux.

Les titres d'*E. coli* totaux dans les matières fécales varient peu au cours du temps (Tableau 2). Les titres des *E. coli* résistants à FOX, CTX ou GEN montrent une décroissance, mais les nombres d'*E. coli* résistants à CIP sont stables et représentent une part importante de la population des *E. coli* totaux. Ces *E. coli* résistants à CIP ne contiennent pas les gènes *bla_{CMY-2}*, ou *bla_{CTX-M-1}*, et correspondent probablement à des souches commensales déjà présentes chez le poussin.

Tous les 90 poulets sacrifiés à 21 jours d'âge hébergent des *E. coli* résistants à CTX, FOX, GEN ou CIP dans leurs caeca. Pour les 60 poulets sacrifiés à 42 jours, tous les caeca sont positifs sur milieux supplémentés en GEN ou CIP, et 21 (35%) ou 49 (82%) sont positifs sur milieux supplémentés en CTX ou FOX respectivement.

La recherche de quatre facteurs de virulence pour deux souches par poulet et par date de J5 à J35 montre que chaque oiseau peut être porteur de souches différentes, ainsi qu'observé par Kemmet et al (2013), utilisant un panel de gènes de virulence différent.

A J5, l'analyse de deux isolats par poussin montre que pour neuf des 33 poussins, les deux souches possèdent

les quatre gènes de virulence recherchés. Six profils de virulence différents sont détectés. Plus de 80% des isolats possèdent les gènes *iroN*, *ompT* et *iss*. En moyenne à J5, chaque souche de *E. coli* contient plus de trois des quatre gènes recherchés. Ce nombre moyen de gènes de virulence par souche diminue ensuite pour être inférieur ou proche de 1,5 à J14 et J20 mais est compris entre 2 et 3 à J28, J35 et J41. De même, dans une étude terrain, Kemmet et al. (2013), observaient des variations de la proportion des souches d'*E. coli* pathogènes, avec l'âge des oiseaux.

CONCLUSION

Cette expérimentation nous a permis de décrire l'évolution du portage de souches de *E. coli* résistantes ou porteuses de gènes de virulence au cours de la vie de poulets de chair. Les résultats montrent que des souches inoculées multirésistantes infectant les oiseaux dès le premier jour peuvent persister, à faible titre, jusqu'à l'âge d'abattage et transmettre leurs gènes de résistance à d'autres souches. Les sous-populations de *E. coli* résistants fluctuent dans le temps. La fréquence de gènes de virulence d'APEC dans les souches fécales semble diminuer au cours du temps. Ce phénomène sera prochainement étudié plus en détail.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Baron, S., Jouy, E., Touzain, F., Bougeard, S., Larvor, E., de Boisseson, C., Amelot, M., Keita, A., Kempf, I., 2016. Veterinary microbiology (185), 29-33.
- Clermont O., Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.M., 2013. Environmental microbiology reports 5, 58-65
- Kemmett, Kirsty, Tom Humphrey, Steven Rushton, Andrew Close, Paul Wigley, and Nicola J. Williams. 2013. , PLoS ONE (8) 67749.1-10
- Johnson, T.J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S.J., Rosenberger, S.C., Nolan, L.K., 2008. J Clin Microbiol (46), 3987-3996.

Tableau 1. Premier essai : titres moyens obtenus pour les échantillons de matières fécales ensemencés sur milieux supplémentés en céfoxitine ou en céfotaxime

Jour	7	14	21	28	35	42
Nombre de prélèvements	10	20	25	23	21	21
FOX (16 mg/L)	6,8*	6,4	5,5	4,0	3,6	2,4
CTX (8 mg/L)	6,3	5,9	5,0	4,3	4,2	3,8

*Titre en Log10/g de matière fécale

Tableau 2. Deuxième essai : titres moyens obtenus pour les échantillons de matières fécales ensemencés sur milieux non supplémentés ou supplémentés en céfoxitine, céfotaxime, gentamicine ou ciprofloxacine

Jour	5	14	20	28	35	41
Nombre de prélèvements	50	101	80	75	75	76
Non supplémenté	6,3*	5,2	6,0	5,2	6,2	5,9
FOX (32 mg/L)	4,2	4,1	2,9	1,2	1,5	0,8
CTX (8 mg/L)	3,9	3,7	2,8	0,5	0,7	0,2
GEN (8 mg/L)	4,3	5,2	4,1	1,9	1,5	1,5
CIP (0,06 mg/L)	5,6	4,9	5,9	4,4	5,6	4,9

*Titre en Log10/g de matière fécale

Tableau 3. Deuxième essai : titres moyens obtenus pour les échantillons de caeca ensemencés sur milieux non supplémentés ou supplémentés en céfoxitine, céfotaxime, gentamicine ou ciprofloxacine

Jour	Nombre de prélèvements	Milieu MacConkey				
		Non supplémenté	Cefotaxime 8 mg/L	Céfoxitine 32 mg/L	Gentamicine 8 mg/L	Ciprofloxacine 0.06 mg/L
21	90	7,8*	4,3	4,7	5,6	7,0
42	60	7,7	0,9	2,5	3,7	7,6

*Titre en Log10/g de matière fécale

IDENTIFICATION DE MYCOPLASMES DANS DES LOTS DE POULES PONDEUSES ATTEINTS PAR LE SYNDROME DES ŒUFS A EXTREMITÉ DE VERRE.

**M. Cisneros-Tamayo^{1,3,4}, I. Kempf^{1,3}, M. Cineux^{1,3}, R. Busson^{1,3}, C de Boissésou^{2,3},
P. Lucas^{2,3}, M.-H. Baÿon-Auboyer⁵, A.V. Gautier-Bouchardon^{1,3}.**

¹ Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité MBA, Ploufragan, France.

² Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité GVB, Ploufragan, France.

³ Université Bretagne Loire, Rennes, France.

⁴ Universidad Central del Ecuador, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Quito, Ecuador. ⁵ Laboce, Ploufragan, France.

anne.bouchardon@anses.fr

RÉSUMÉ

Mycoplasma synoviae (MS) est l'agent responsable du syndrome des œufs à extrémité de verre (EAA, Eggshell Apex Abnormality), caractérisé par une altération de l'apex et une augmentation du nombre d'œufs déclassés, et exacerbée par l'association de MS et du virus de la bronchite infectieuse. Une étude de terrain a été réalisée entre 2015 et 2017 dans des élevages de poules pondeuses atteints par le syndrome, localisés dans différentes régions françaises, avec des poules élevées en cages aménagées (CA) ou systèmes alternatifs (ALT) afin (i) de déterminer le pourcentage d'échantillons positifs vis-à-vis de MS en fonction du type de prélèvements et du type d'élevage et (ii) isoler des souches récentes de MS d'élevages atteints du syndrome. Au total, 1136 échantillons ont été prélevés dans 28 lots atteints par le syndrome. Des cultures ont été réalisées dans du milieu FM4 liquide puis sur gélose FM4 pour cloner des colonies. Les échantillons, cultures et clones ont été analysés avec une PCR spécifique de MS. Des analyses de spectrométrie de masse (MALDI-TOF) et du séquençage de nouvelle génération (NGS) ont été effectués sur des clones négatifs en PCR. MS a été détecté dans 25/28 lots dans les deux systèmes de production, avec une détection significativement plus élevée dans les écouvillonnages trachéaux que dans les écouvillonnages cloacaux, les albumens et les jaunes d'œuf. L'isolement de MS a été rendu difficile par la présence d'un autre mycoplasme à croissance plus rapide *in vitro*. L'utilisation du MALDI-TOF et du NGS a permis l'identification de *Mycoplasma pullorum*, détecté dans 14/25 lots atteints par le syndrome. *M. pullorum* a été isolé à partir de prélèvements trachéaux, cloacaux et d'œufs dans différents systèmes de production. Ces résultats ont confirmé la présence du syndrome EAA en France. Des études devront être menées pour étudier le rôle possible de *M. pullorum* dans l'expression des symptômes de l'EAA.

ABSTRACT

Identification of avian mycoplasmas in samples from layer-hen flocks with eggshell apex abnormality (EAA) syndrome in France.

The eggshell apex abnormality (EAA) syndrome is characterized by an altered shell surface, increased translucency, shell thinning, and cracks and breaks in the eggshell apex. *Mycoplasma synoviae* (MS) is the agent responsible for the EAA syndrome, which is exacerbated by the association of MS and infectious bronchitis virus. A field study was conducted between 2015 and 2017 in different regions of France in egg-layer farms with clinical signs of EAA in order to (i) determine the percentage of MS-positive samples based on the type of samples and production systems (furnished cages or alternative systems) and (ii) isolate recent MS strains from farms with the syndrome. In total, 1136 samples were collected from 28 EAA-positive flocks. Cultures were carried out in liquid FM4 medium then on FM4 agar to clone colonies. Samples, broth cultures and clones were analyzed with a MS-specific PCR. MALDI-TOF mass spectrometry and new generation sequencing (NGS) were performed on PCR-negative clones. MS was detected in 25/28 farms, from both production systems. Detection of MS was significantly higher in tracheal swabs than in cloacal, albumen and egg yolk swabs. Isolation of MS was made difficult due to the presence of another *Mycoplasma* species growing faster *in vitro*. The use of MALDI-TOF and NGS enabled identification of *Mycoplasma pullorum*, which was detected in 14/25 EAA-positive flocks. *M. pullorum* was isolated from tracheal, cloacal and egg swabs in different production systems. These results confirmed the presence of the EEA syndrome in France. Studies will need to be conducted to investigate the potential role of *M. pullorum* in the expression of EAA clinical signs.

INTRODUCTION

Mycoplasma synoviae (MS) provoque des infections subcliniques des voies respiratoires supérieures (entraînant des diminutions des performances zootechniques dans les troupeaux) et des synovites infectieuses (arthrites, boiteries) chez la poule et la dinde (Fergusson-Noel et Noormohammadi, 2013). *M. synoviae* est également l'agent responsable du syndrome des œufs à extrémité de verre (EAA, Eggshell Apex Abnormality), qui entraîne une altération de l'apex (cône supérieur de l'œuf) caractérisée par une surface de coquille altérée (aspect plus rugueux), un amincissement de la coquille, une translucidité accrue (détectable de manière macroscopique, en particulier lors du mirage des œufs) et l'apparition de fissures et de cassures (Gautier-Bouchardon, 2012) (Figure 1). Les lésions de la coquille de l'œuf sont limitées à une région d'environ 2 cm de diamètre autour de l'apex. Cette altération de l'œuf, très caractéristique, est exacerbée par l'association de *M. synoviae* et du virus de la bronchite infectieuse (Feberwee *et al.*, 2009). Ces lésions sont à l'origine d'une augmentation du nombre d'œufs déclassés (cassés, souillés). Le taux de déclassement peut atteindre 25-30% dans certains élevages (Feberwee *et al.*, 2009 ; Gautier-Bouchardon, 2012). Le syndrome est observé de façon plus fréquente dans les élevages multi-âges que dans les élevages en bande unique (risque de contamination plus élevé des nouvelles bandes de poules). Des traitements antibiotiques (oxytétracycline ou tylosine) permettent de réduire momentanément les conséquences du syndrome (diminution significative du nombre d'œufs déclassés, augmentation de la résistance des coquilles), mais une rechute est généralement observée une dizaine de jours après l'arrêt des traitements (Feberwee *et al.*, 2009 ; Catania *et al.*, 2010). Certains lots de poules pondeuses sont réformés plusieurs semaines avant l'âge moyen de réforme (70 semaines) car ils ne sont plus viables économiquement (trop d'œufs déclassés, traitements antibiotiques inefficaces) et/ou parce que les œufs issus de ces élevages ne sont plus acceptés par les centres de conditionnement (temps accrus de nettoyage des installations, œufs souillés) (Feberwee *et al.*, 2009 ; Catania *et al.*, 2010 ; Gautier-Bouchardon *et al.*, 2012).

Le diagnostic du syndrome EAA repose initialement sur l'observation d'œufs d'aspect caractéristique de l'EAA au sein de l'élevage.

Le syndrome a été décrit dans plusieurs pays et a été identifié en France en 2009 (Feberwee et Landman, 2008 ; Gautier-Bouchardon *et al.*, 2010). Peu de données sont disponibles sur la prévalence de ce syndrome et sur le type d'élevages touchés.

Les objectifs de cette étude étaient (i) d'identifier *M. synoviae*, agent étiologique du syndrome EAA, dans différents types d'échantillons (pour déterminer

le pourcentage de prélèvements positifs en fonction du type d'échantillon), provenant de lots de poules pondeuses atteints par le syndrome EAA dans différentes régions françaises et au sein de différents systèmes de production et (ii) d'isoler des souches de *M. synoviae* d'élevages atteints du syndrome pour des études ultérieures (notamment une comparaison des génomes de souches isolées de différents types d'infections MS).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Récolte d'échantillons dans des élevages de poules pondeuses atteints par le syndrome EAA

Une étude de terrain a été réalisée entre 2015 et 2017 dans des élevages de poules pondeuses produisant des œufs à extrémité de verre. Ces élevages étaient localisés dans différentes régions françaises, avec des poules élevées en cages aménagées (CA) ou systèmes alternatifs (ALT).

Les prélèvements ont été réalisés par des vétérinaires lors de visites dans 28 élevages atteints par le syndrome, sur des poules pondeuses âgées de 22 à 68 semaines. Les poules ont été échantillonnées au hasard dans chaque élevage. Dans la majorité des cas, des écouvillonnages trachéaux et cloacaux ont été prélevés sur les mêmes poules, et des œufs ont parfois également été envoyés (essentiellement des œufs présentant des anomalies de l'apex). Au total, 1136 échantillons (544 écouvillonnages trachéaux et 371 écouvillonnages cloacaux, 111 albumens et 110 jaunes d'œuf) ont été reçus et traités au laboratoire.

1.2. Traitement des prélèvements au laboratoire

Les écouvillonnages trachéaux et cloacaux ainsi que des écouvillons trempés dans les jeunes d'œufs ou les albumens ont été placés dans 2 mL d'eau peptonée tamponnée et vortexés. Ces différentes suspensions initiales ont ensuite été utilisées pour effectuer en parallèle des mises en culture et des tests PCR spécifiques de *M. synoviae*.

Quatre dilutions de raison 10 ont été réalisées en milieu de culture liquide FM4 (Frey *et al.*, 1968) supplémenté avec des antibiotiques, pour limiter la croissance de contaminants. Ces dilutions ont été incubées à 37 ± 2 °C pendant au maximum 30 jours. La croissance des mycoplasmes en milieu de culture liquide a été détectée par virage du milieu (dû à leur activité métabolique). Des cultures sur milieu FM4 gélosé ont été effectuées à partir de ces cultures virées, et incubées à 37 ± 2 °C avec 5% de CO₂ pendant 5 à 10 jours. Les colonies de mycoplasmes ont été clonées et cultivées dans du milieu FM4 liquide comme décrit ci-dessus.

La présence de *M. synoviae* dans les cultures virées et les clones a été confirmée ou infirmée par des tests PCR spécifiques de *M. synoviae* (PCR-MS, Lauerma *et al.*, 1993) après une étape de lyse (Kellog et Kwok, 1990).

M. synoviae étant naturellement résistant à l'érythromycine (Aarestrup et Kempf, 2006), des cultures ont également été réalisées dans du milieu FM4 additionné de différentes concentrations d'érythromycine allant de 4 à 10 µg/mL lorsque la présence d'autres espèces de mycoplasmes rendait l'isolement de *M. synoviae* difficile.

Des analyses complémentaires ont été effectuées sur les clones négatifs en PCR-MS afin d'identifier l'espèce mycoplasmatique :

- des analyses de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF après une étape d'extraction de protéines (Pereyre *et al.*, 2013) à partir de 3 mL de culture ;
- du séquençage de nouvelle génération (NGS) en utilisant la technologie Illumina Mi-Seq.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

M. synoviae a été détecté par PCR-MS dans 25/28 lots (89 %) de poules pondeuses atteints par le syndrome dans différents systèmes de production (5/5 ALT et 20/23 CA), avec une détection significativement plus élevée dans les écouvillonnages trachéaux (59 %) que dans les écouvillonnages cloacaux (10,2 %), les albumens (3,6 %) et les jaunes d'œuf (0,9 %) (Tableau 1). *M. synoviae* a été détecté dans des prélèvements trachéaux de 95,8 % des lots atteints par l'EAA et a été détecté dans des prélèvements cloacaux de 71,4 % des lots atteints par le syndrome. Aucune différence n'a été mise en évidence entre les différents systèmes de production (même pourcentage d'échantillons positifs pour les élevages ALT et CA).

Ce niveau plus élevé de détection de *M. synoviae* dans les écouvillons trachéaux est en accord avec d'autres études (Dufour-Gesbert *et al.*, 2006; Feberwee *et al.*, 2005; Catania *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2015). La différence entre les écouvillonnages trachéaux et cloacaux peut s'expliquer par le fait que *M. synoviae* a un tropisme plus élevé pour les tissus des voies respiratoires (Stipkovits & Kempf, 1996) et que son excrétion cloacale peut être plus faible (sous le seuil de détection), intermittent ou plus irrégulier, comme déjà suggéré par Marois *et al.* (2000). L'isolement ou la détection de *M. synoviae* aurait pu être améliorée en prélevant des échantillons directement à partir de l'appareil reproducteur des poules pondeuses et non du cloaque, mais cette étude reposait sur la collecte d'échantillons à partir d'animaux vivants, conformément aux pratiques vétérinaires sur le terrain pour le diagnostic des mycoplasmoses, sans devoir abattre et autopsier des animaux.

Les résultats de cette étude ont également montré que *M. synoviae* pouvait être détecté dans la plupart des exploitations présentant des signes cliniques d'EAA (25/28 lots échantillonnés, 89,3%). Pour deux des trois élevages où *M. synoviae* n'a pas été détecté, les œufs étaient les seuls échantillons envoyés pour des analyses de laboratoire. La détection et l'isolement de *M. synoviae* significativement plus faibles à partir d'échantillons d'œufs comparés aux écouvillonnages

cloacaux ou trachéaux pourrait ainsi expliquer la non-détection de *M. synoviae* dans ces lots.

Au cours de cette étude de terrain de 30 mois, des clonages ont été effectués à partir de différentes cultures positives détectées par PCR-MS. Cependant, l'isolement de clones MS a été rendu difficile par la présence de contaminations bactériennes, mais aussi principalement par la présence d'une autre espèce de mycoplasme dans de nombreux échantillons, qui se multipliait plus vite que *M. synoviae in vitro*. La présence d'érythromycine dans le milieu de culture n'a pas empêché la croissance de cette autre espèce et n'a pas permis un meilleur isolement des souches de *M. synoviae*.

Les analyses effectuées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF sur 14 clones ont identifié cette espèce comme étant *M. pullorum*. Ces résultats ont été confirmés par NGS : l'alignement du gène de l'ARNr 16S de ces 14 clones avec les séquences disponibles dans la base de données GenBank a montré des similarités de séquence de 98,2 % à 99,4 % avec le gène de l'ARNr 16S de *M. pullorum* (U58504.1). De même, l'alignement d'un sous-ensemble de fragments de séquences (autres que l'ARNr 16S) de ces 14 clones sur la base de données nucléotidique a montré un pourcentage élevé de similitude avec la séquence complète publiée de *M. pullorum* (CP017813.1).

L'absence d'inhibition de *M. pullorum* lors des cultures *in vitro* avec l'érythromycine sont en accord avec les résultats de Whithear *et al.* (1983) montrant que des souches de *M. pullorum* étaient résistantes à l'érythromycine, mais sensibles à la tylosine, suggérant une résistance naturelle aux macrolides possédant un cycle de 14 carbones, comme *M. synoviae* (Aarestrup et Kempf, 2006).

Des analyses ultérieures effectuées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF sur des cultures ont montré que *M. pullorum* était présent dans au moins 14 des 25 (56 %) lots atteints par le syndrome EAA échantillonnés au cours de cette étude.

Au total, 38/71 clones ont été identifiés comme appartenant à l'espèce *M. pullorum* par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF : quatre clones isolés d'écouvillonnages cloacaux et 24 clones isolés d'écouvillonnages trachéaux provenant de lots de poules pondeuses élevées en cages aménagées ; un clone isolé d'un jaune d'œuf et neuf clones isolés de trachées provenant de lots élevés en systèmes alternatifs. De plus, 33/71 clones ont été identifiés comme appartenant à l'espèce *M. synoviae* par PCR-MS : trois clones isolés d'écouvillonnages cloacaux et 30 clones isolés d'écouvillonnages trachéaux provenant de lots de poules pondeuses élevées en cages aménagées.

Très peu d'études ont été publiées sur *M. pullorum*. Cette espèce a été isolée de faisans et de perdrix présentant des signes d'infection des voies respiratoires supérieures, mais a été considéré comme une espèce de mycoplasme saprophyte à croissance rapide empêchant l'isolement d'un autre mycoplasme

pathogène (Bradbury *et al.*, 2001). Cependant, *M. pullorum* a été isolé, seul ou avec d'autres espèces de mycoplasmes, à partir de lésions au niveau de la trachée ou des sacs aériens de poulets présentant des problèmes respiratoires (Benčina *et al.*, 1987; Lobo *et al.*, 2004) et d'embryons de poulets morts (Benčina *et al.*, 1987). *M. pullorum* a également été identifié dans des embryons de dinde morts (Moalic *et al.*, 1997). L'isolement de clones dans des écouvillons d'œuf et de cloaque dans notre étude, et dans des embryons de dindon et de poulet dans de précédentes études suggère fortement la possibilité d'un tropisme génital et donc d'une transmission verticale de *M. pullorum*. Le rôle joué par *M. pullorum* dans le développement de l'EAA mérite des études plus approfondies. Il sera important notamment de rechercher dans des élevages de poules pondeuses s'il existe des cas d'EAA sans isolement de *M. synoviae* et avec isolement de *M. pullorum* (aucun cas de ce type n'a été détecté dans la présente étude), d'évaluer et de comparer la sévérité des signes cliniques dans les élevages infectés par *M. synoviae* et/ou *M. pullorum*, qui de *M. synoviae* et *M. pullorum* infectent les poules en premier. Des infections expérimentales pourraient également permettre de déterminer si, comme le virus de la bronchite infectieuse, une association *M. synoviae* / *M. pullorum* pourrait exacerber les

signes cliniques (augmentation du nombre d'œufs déclassés).

Cette étude a permis d'isoler des souches récentes de *M. synoviae* dans des élevages atteints par le syndrome des œufs à extrémité de verre. Des études d'épidémiologie moléculaire pourront être menées en comparant ces souches avec des souches isolées d'autres infections dues à *M. synoviae* (infections subcliniques des voies respiratoires, synovites infectieuses) afin de déterminer si les souches responsables du développement du syndrome sont différentes des souches "classiques".

CONCLUSION

Ces résultats ont confirmé la présence du syndrome EAA dû à *M. synoviae* en France et dans différents systèmes de production d'œufs de consommation (cages aménagées ou systèmes alternatifs).

Des études complémentaires (infections expérimentales et/ou enquêtes sur le terrain, développement d'une PCR spécifique pour détecter cette espèce dans des échantillons sans étape de culture) devront être menées pour étudier le rôle possible de *M. pullorum* dans l'expression des signes cliniques de l'EAA en co-infection avec *M. synoviae*, l'agent initiateur du syndrome.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarestrup F.M., Kempf I., 2006. In Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin (Aarestrup F.M., Ed), ASM Press, Washington DC, USA. p 239-248.
- Benčina D., Mrzel I., Tadina T., Dorrer D., 1987. Mycoplasma species in chicken flocks with different management systems. Avian Pathol., 16, 599-608.
- Bradbury J.M., Yavari C.A., Dare C.M., 2001. Mycoplasmas and respiratory disease in pheasants and partridges. Avian Pathol., 30, 391-396.
- Catania S., Bilato D., Gobbo F., Granato A., Terregino C., Iob L., Nicholas R.A., 2010. Avian Dis., 54, 961-964.
- Dufour-Gesbert F., Dheilly A., Marois C., Kempf I., 2006. Vet. Microbiol., 114, 148-154.
- Feberwee A., Landman, 2008. World Poultry, 24, 22-23.
- Feberwee A., Mekkes D.R., de Wit J.J., Hartman E.G., Pijpers, A., 2005. Avian Dis., 49, 260-268.
- Feberwee A., de Wit J.J., Landman W.J., 2009. Avian Pathol., 38 (1), 77-85.
- Fergusson-Noel N., Noormohammadi A., 2013. In Diseases of poultry (Swayne D.E. *et al.*, Eds.), Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA. p. 877-893.
- Frey M.L., Hanson R.P., Anderson D.P., 1968. Am. J. Vet. Res., 29, 2163-2171.
- Gautier-Bouchardon A.V., 2012. Le Nouveau Praticien Vétérinaire, 5 (20), 40-43.
- Gautier-Bouchardon, A.V., Ferré, S., Kempf, I., 2010. 19^{ème} Congrès de l'International Organisation of Mycoplasma (IOM), Toulouse, France, p. 161.
- Kellog, D.E., Kwok, S., 1990. In PCR Protocols (Innis M.A. *et al.*, Eds.). Academic Press, San Diego, USA, p. 337-347.
- Lauerman L.H., Hoerr F.J., Sharpton A.R., Shah S.M., Van Santen V.L., 1993. Avian Dis., 37, 829-834.
- Lobo E., García M.C., Moscoso H., Martínez S., Kleven S.H., 2004. Strain heterogeneity in *Mycoplasma pullorum* isolates identified by random amplified polymorphic DNA techniques. Spanish J. of Agricultural Res., 2, 4.
- Marois C., Dufour-Gesbert F., Kempf I., 2000. Vet. Microbiol., 73, 311-318.
- Moalic P., Kempf I., Gesbert F., Laigret F., 1997. Identification of two pathogenic avian Mycoplasmas as strains of *Mycoplasma pullorum*. Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiol., 47, 171-174.
- Moreira F.A., Cardoso L., Coelho A.C., 2015. Vet. Italian J., 51, 93-98.
- Pereyre S., Tardy F., Renaudin H., Cauvin E., Del Pra Netto Machado L., Tricot A., Benoit F., Treilles M., Bébéar C., 2013. J. Clin. Microbiol., 51, 3314-3323.
- Whithear K.G., Bowtell D.D., Ghiocas E., Hughes K.L., 1983. Avian Dis., 27, 937-949.

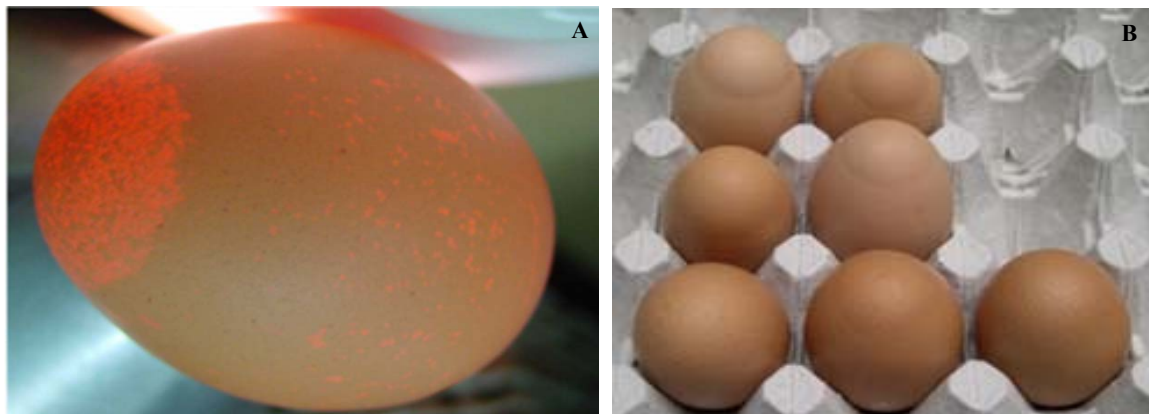
Tableau 1. Détection de *M. synoviae* par PCR-MS dans différents types de prélèvements

Echantillons	Cages aménagées (CA)	Systèmes alternatifs (ALT)	Total	Pourcentage d'échantillons MS+
Trachée	289/490	32/54	321/544 ^a	59,0 %
Cloaque	39/371	NE	39/371 ^b	10,2 %
Albumen	1/95	3/16	4/111 ^c	3,6 %
Jaune d'œuf	1/95	0/15	1/110 ^c	0,9 %
TOTAL	330/1051	35/85	365/1136	32,1 %

^{a, b, c} : les résultats avec des lettres différentes sont statistiquement significativement différents ($p < 0,05$).

NE : non échantillonné

Figure 1. Augmentation de la translucidité (A) et altération de la surface de l'apex des œufs (B) dans des lots de poules pondeuses atteints du syndrome EAA (photos : J.-C. Donval, 2017)



ROLE DES RESEAUX DES MOUVEMENTS DE CANARDS DANS LA PROPAGATION DU VIRUS DE L'INFLUENZA AVIAIRE HAUTEMENT PATHOGENE H5N8, FRANCE 2016-17

Claire Guinat¹, Benoit Durand², Tifenn Corre¹, Timothée Vergne¹
Anne Bronner³, Jean-Luc Guérin¹, Mathilde Paul¹

¹UMR 1225 ENVT-INRA IHAP - 23 chemin des capelles - 31300 TOULOUSE,

²ANSES - 14 rue Pierre et Marie Curie - 94701 MAISONS-ALFORT

³DGAI - 251 rue de Vaugirard - 75732 PARIS

c.guinat@envt.fr

RÉSUMÉ

Au cours de l'hiver 2016-17, le virus H5N8 de l'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) s'est propagé en France, provoquant une épizootie sans précédent. Une des hypothèses fréquemment avancée est que l'IAHP pourrait être transmis entre exploitations avicoles par le transport d'oiseaux vivants infectés. Cette étude vise ainsi à caractériser les mouvements opérés dans la filière palmipèdes gras au cours de l'épizootie 2016-17, et à analyser la contribution du transport d'oiseaux vivants dans la propagation du virus. Cette étude met en évidence une association statistique entre la structure du réseau de mouvements et l'apparition des foyers H5N8, mais révèle également que seul un nombre limité de foyers, principalement groupés dans la phase initiale de l'épizootie, serait le résultat de la propagation de H5N8 par les réseaux de contact. Ces résultats soulignent le rôle clé des efforts effectués pour améliorer la biosécurité des transports dans la maîtrise du risque de dispersion du virus de l'influenza.

ABSTRACT

Role of duck contact networks in shaping HPAI H5N8 disease transmission, France 2016-17

In winter 2016-17, Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) H5N8 virus spread in France, causing unprecedented epizootics. One important hypothesis is that HPAI could be dispersed from an infected poultry holding to the neighbouring holdings by transport of live poultry flocks. The objectives of this study were to characterize flock movements of a past HPAI outbreak and investigate their role in the spread of the disease. This study reveals that a number of outbreaks was the result of the propagation of H5N8 through the contact networks before February 2017. Despite their limited number, these identified at-risk movements may have launched the French epizootic. These findings support efforts to enhance biosecurity along the duck transport to minimize the risk of contact infection.

INTRODUCTION

Au cours de l'hiver 2016-17, le virus de l'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) du sous-type A(H5N8) (clade 2.3.4.4.) a provoqué d'importantes épizooties en Europe, touchant volailles et oiseaux sauvages dans un grand nombre de pays. Avec un total de 484 foyers confirmés chez les volailles au 23 mars 2017, la France a été l'un des pays européens les plus touchés par la maladie au cours de l'hiver 2016-2017. Les foyers ont été principalement reportés en élevage de canards. Lors de l'épizootie, les mouvements d'oiseaux vivants ont été identifiés comme potentiel facteur de la transmission du virus de l'IAHP H5N8 entre les élevages. Cette étude vise ainsi à caractériser les mouvements de lots de palmipèdes au cours de l'épizootie 2016-2017, et à analyser la contribution du transport d'oiseaux vivants dans la dispersion du virus.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Données

La liste des foyers d'IAHP H5N8 apparus en élevage de volailles en France au cours de l'épizootie 2016-17 (28 novembre 2016 au 23 mars 2017) a été obtenue auprès de la DGAL, Paris, France. Pour chaque foyer, des informations supplémentaires ont pu être collectées sur le numéro d'identification de l'exploitation, l'emplacement géographique et la date de suspicion.

La liste des mouvements de lots de canards entre exploitations a été obtenue auprès du CIFO, France. Pour chaque mouvement, des informations étaient disponibles sur la date du mouvement, le numéro d'identification de l'exploitation de départ et d'arrivée et le nombre de canards déplacés. L'analyse des données relatives aux mouvements a été restreinte à la période contemporaine à l'épizootie H5N8, soit la période du 1er novembre 2016 au 31 mars 2017.

1.2. Analyses

Des statistiques descriptives ont d'abord été effectuées sur le nombre d'exploitations actives (c.-à-d. les exploitations qui ont reçu ou envoyé des lots de canards pendant la période étudiée), le nombre de lots déplacés, les distances parcourues par les lots déplacés par paire de types d'exploitation.

Une analyse de réseau a ensuite été effectuée, considérant chaque exploitation comme un *nœud* et un mouvement de lot de canards entre deux exploitations comme un *lien*. Des poids ont été attribués à chaque *lien* en fonction du nombre de lots de canards déplacés entre deux *nœuds*.

Les agrégats de *nœuds*, dits *communautés*, ont été identifiés dans l'ensemble du réseau à l'aide d'un algorithme Walktrap (Pons and Latapy, 2005). Cet algorithme est basé sur des marches aléatoires à travers les *liens* du réseau qui identifient les *communautés*, c'est-à-dire un sous-ensemble de *nœuds* qui ont beaucoup plus de *liens* que prévu. Les 15 plus grandes *communautés* en termes de nombre d'exploitations ont été identifiées et classées en fonction de leur taille et des types de production des exploitations. Les *communautés* identifiées ont ensuite été comparées aux groupes d'organisations de producteurs.

Pour évaluer si la distribution des exploitations infectées par l'IAHP H5N8 résulte d'événements de transmission via le réseau de contact, le k-test (VanderWaal et al., 2016) a été utilisé. Ce test consiste à calculer une statistique k observée qui est ensuite comparée à la distribution de la statistique k aléatoire, c'est-à-dire si les foyers étaient distribués aléatoirement dans le réseau, la p-value correspondant à la proportion de permutations pour lesquelles la statistique k aléatoire est supérieure à la statistique k observée. Dans notre étude, le k test a été adapté en identifiant les mouvements à risque sur fenêtre d'infection possible : un mouvement à risque est défini par un mouvement ayant lieu entre un *expéditeur*, c'est-à-dire une exploitation infectée qui a envoyé des lots dans les 14 jours précédant sa date de suspicion, et un *destinataire*, c'est-à-dire une exploitation infectée qui a reçu des lots dans les 14 jours précédant cette date. La statistique k a donc été définie comme le nombre moyen d'exploitations infectées parmi les voisins de chaque exploitation infectée au sein des mouvements à risque. Les interdictions de mouvement ont été renforcées à partir du 2 février 2017, de sorte que seules les données relatives aux mouvements entre le 1er novembre 2016 et le 2 février 2017 ont été conservées pour cette analyse.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les statistiques descriptives sont présentées dans le **Tableau 1**. Au total, 9096 mouvements de 10945388 canards ont été effectués entre 2098 exploitations entre le 1er novembre 2016 et le 31 mars 2017. La plupart des exploitations réalisant des mouvements ont été caractérisées de type gavage exclusif (48,8%), suivi par élevage exclusif (35,7%) et élevage combiné au gavage (11,9%). Les exploitations étaient principalement situées dans la partie diagonale inférieure gauche de la France. Dans l'ensemble, la plupart des lots (95,8%) sont passés d'exploitations de type élevage à celles de type gavage, et un nombre limité de mouvements ont eu lieu d'exploitations de type démarrage à des exploitations de type élevage.

(4,2%) (**Tableau 1**). Cependant, un plus grand nombre de canards ont été déplacés entre les exploitations de type démarrage à celles de type élevage (taille médiane du lot = 4773) comparativement aux mouvements entre élevage et gavage (taille médiane du lot = 958). La distance moyenne parcourue par les lots lorsqu'ils se déplaçaient d'une exploitation de type démarrage à celle de type élevage est de 57 km, et de l'élevage au gavage de 50 km. Les lots de canards déplacés entre différentes unités d'une même ferme (10,6%) ont tendance à couvrir des distances limitées (distance moyenne de 300 m, avec un maximum de 46 km - données non indiquées).

L'ensemble du réseau a été divisé en 99 *communautés*, dont 2098 exploitations. Les 15 plus grandes *communautés* en termes de nombre d'exploitations comprenaient 91,8% des exploitations. Les *communautés* montrent une distribution spatiale bien distincte dans le Grand-Ouest avec beaucoup de superpositions dans l'espace dans le Sud-Ouest (**Figure 1**), mais des compositions similaires dominées par les exploitations de type élevage et gavage. Ces *communautés* sont très similaires aux 15 plus grands groupes d'organisations de producteurs.

Au total, 6521 mouvements entre 1988 exploitations (dont 104 exploitations infectées) ont eu lieu entre le 1er novembre 2016 et le 2 février 2017. La plupart des exploitations infectées sont de type élevage (39,4%), suivies par type gavage (34,6%) et élevage combiné avec gavage (22,1%). Parmi tous les mouvements, 16 ont été identifiés comme étant à risque avec une distance médiane couverte par des lots de 48 km (max = 200 km). Le k test s'est avéré significatif : le nombre moyen d'exploitations infectées entourant chaque exploitation infectée parmi les mouvements à risque était significativement supérieur à la distribution du nombre obtenu si les foyers avaient été distribués de manière aléatoire dans le réseau (valeur k statistique observée sur l'ensemble des exploitations = 0,22, valeur statistique k aléatoire = $0,13 \pm 0,03$, $p = 0,02$).

CONCLUSION

Entre le 1er novembre 2016 et le 31 mars 2017 en France, le plus grand nombre de mouvements a été observé entre exploitations de type élevage à celles de gavage, avec les plus grandes tailles de lots de canards du stade démarrage à élevage. Ceci concorde avec les caractéristiques du cycle de production, au cours duquel les canards sont d'abord élevés en lots de grande taille pendant près de 12 semaines, et sont ensuite divisés en lots de petite taille pour être transférés dans des unités de gavage. Les différences dans les distances moyennes parcourues par les lots

montrent que les exploitations de type démarrage ont tendance à être liées à des exploitations d'élevage éloignées, tandis que les exploitations d'élevage ont tendance à échanger avec des unités de gavage plus locales. Dans l'ensemble, la plupart des déplacements ont été de courte distance (50% et 75% d'entre eux couvrant moins de 40 km et 75 km, respectivement) et sont principalement concentrés dans deux zones géographiques, le Grand-Ouest et Sud-Ouest de la France, avec un nombre limité de mouvements entre ces deux zones. Ceci expliquerait peut-être pourquoi la plupart des foyers IAHP H5N8 sont restés concentrés dans le Sud-Ouest de la France (Guinat et al., 2018).

L'analyse de réseau a permis d'identifier les 15 plus grandes *communautés* comprenant la majorité des exploitations (91,8%) et sont très similaires aux 15 plus grandes organisations de producteurs. Ceci est important en terme de prévention et de surveillance basée sur le risque, car cela suggère qu'il serait intéressant de cibler ces groupes d'exploitations très connectées, afin de prévenir la propagation de la maladie tout en minimisant la perturbation des échanges commerciaux (Ratananakorn and Wilson, 2011). De plus, le fait d'appartenir à une organisation de producteurs en particulier pourrait signifier qu'ils partagent les mêmes pratiques de biosécurité et de production, ce qui les rend maîtres des programmes de biosécurité des transports.

Le k test montre que les exploitations infectées avaient plus de voisins infectés que celles non infectées. Ceci suggère donc que pour ces mouvements à risque, l'apparition de foyers serait le résultat de la propagation du virus H5N8 par les réseaux de contact. Ces résultats confirment l'intérêt de l'importance portée par les autorités sanitaires et les professionnels des filières sur la biosécurité lors du transport des oiseaux. Néanmoins, il est important de noter que le nombre de mouvements identifiés comme « à risque » dans l'analyse reste finalement assez limité en nombre (16 mouvements) et dans le temps (de novembre à début février). Ceci suggère que, outre le déplacement d'oiseaux vivants potentiellement infectés, d'autres voies de propagation ont joué un rôle important dans la transmission du virus entre élevages lors de l'épizootie. Les travaux d'analyse spatio-temporelle précédemment conduits ont mis en lumière l'importance du phénomène de transmission locale (moins de 10km, via diffusion aéroportée, mouvements locaux de véhicules, d'équipements et de personnel, etc.) dans la propagation (Guinat et al., 2018). D'autres travaux restent nécessaires pour identifier plus précisément la part relative des différentes voies impliquées (notamment via des matériaux inertes contaminés) dans la diffusion du virus sur de courtes distances.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

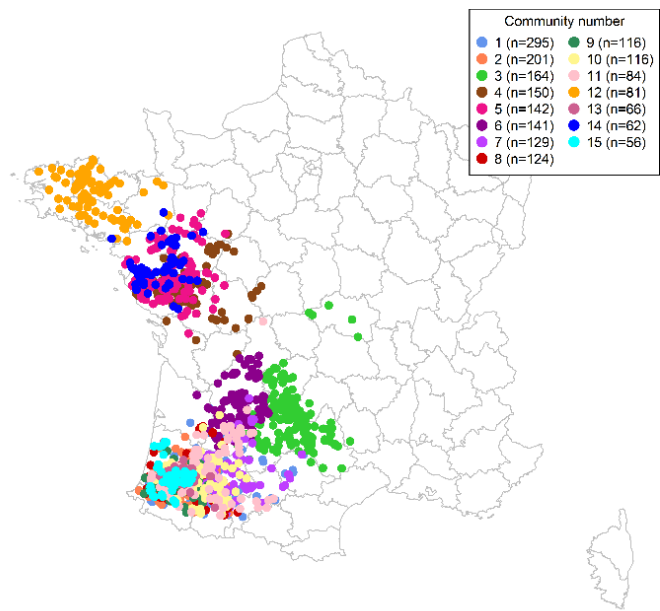
- Guinat, C., Nicolas, G., Vergne, T., Bronner, A., Durand, B., Courcoul, A., Gilbert, M., Guérin, J.-L., Paul, M.C., 2018. Spatio-temporal patterns of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N8 spread, France, 2016 to 2017. *Eurosurveillance* 23. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.26.1700791>
- Pons, P., Latapy, M., 2005. Computing Communities in Large Networks Using Random Walks, in: *Computer and Information Sciences - ISCIS 2005*. Presented at the International Symposium on Computer and Information Sciences, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 284–293. https://doi.org/10.1007/11569596_31
- Ratananakorn, L., Wilson, D., 2011. Zoning and compartmentalisation as risk mitigation measures: an example from poultry production. *Rev. Sci. Tech.-OIE* 30, 297.
- VanderWaal, K., Enns, E.A., Picasso, C., Packer, C., Craft, M.E., 2016. Evaluating empirical contact networks as potential transmission pathways for infectious diseases. *J. R. Soc. Interface* 13, 20160166. <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0166>

Tableau 1. Caractéristiques des mouvements de canards opérés entre le 1er Novembre 2016 et le 31 Mars 2017 en France

Type de mouvements	Nombre de lots déplacés (%)	Nombre de canards déplacés			Distance (km)		
		Mediane	IQR*	Max	Mediane	IQR	Max
Démarrage - Elevage	382 (4.2)	4773	3016-8991	15090	35	1-101	213
Elevage -Gavage	8712 (95.8)	958	628-1188	8050	41	17-72	408

* IQR : Intervalle inter-quartile

Figure 1. Distribution spatiale des 15 plus grandes communautés entre le 1 novembre 2016 and le 31 Mars 2017 en France



**ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DES INFECTIONS À VIRUS INFLUENZA AVIAIRES
H5 HAUTEMENT PATHOGÈNES CHEZ LE CANARD MULARD
COMPARAISON DES SOUCHES FRANÇAISES RESPONSABLES DES FOYERS
DE 2015-2016 ET 2016-2017**

**Niqueux Éric¹, Schmitz Audrey¹, Briand François-Xavier¹, Massin Pascale¹,
Martenot Claire¹, Cherbonnel Martine¹, Allée Chantal¹, Chatel Marina¹,
Guillemoto Carole¹, Guillou-Cloarec Cécile¹, Kerbrat Florian¹, Lebras Marie-Odile¹,
Ogor Katell¹, Pierre Isabelle¹, Amelot Michel², Courtois David², Mangard Jean-Michel²,
Lecoq Thierry², Scoizec Axelle³, Huneau Adeline³, Le Bouquin Sophie³, Keïta Alassane²,
Grasland Béatrice¹, Eterradosi Nicolas¹**

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

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

³Anses, unité EpiSaBE - BP 53 - 22440 PLOUFRAGAN, France,

^{1, 2 et 3}Université Bretagne Loire - CS 54417 - 35044 RENNES, France

eric.niqueux@anses.fr

RÉSUMÉ

De novembre 2015 à juillet 2017, deux épisodes successifs d'infections à virus influenza aviaires (IA) H5 hautement pathogènes (HP) ont touché les élevages de volailles en France, et tout particulièrement la production de palmipèdes gras dans le Sud-Ouest. En 2015-2016, 81 foyers ont concerné exclusivement les élevages de volailles (majoritairement des palmipèdes sans symptômes déclarés). Alors qu'en 2016-2017, les foyers détectés ont touché à la fois les volailles (486 cas) et l'avifaune (55 cas), et la proportion de détections dans le cadre de la surveillance événementielle en élevage était plus élevée que lors de l'épisode précédent.

Un modèle expérimental d'infection chez le canard mulard conventionnel de 6 à 7 semaines a été établi pour une souche H5N1 HP isolée en 2015 et une souche H5N8 HP de 2016. Cette étude a permis de caractériser et de comparer la réceptivité et la sensibilité du canard mulard vis-à-vis de ces souches récentes, ainsi que la dynamique d'infection du virus et son tropisme.

L'infection expérimentale par le virus H5N1 HP n'a engendré ni signes cliniques majeurs ni mortalité liée au virus, et le profil d'excrétion a présenté un tropisme intestinal similaire à celui observé pour des virus IA faiblement pathogènes. Sur ces deux points, le virus H5N8 HP avait des caractéristiques différentes du virus précédent : les signes cliniques étaient plus marqués (avec l'apparition notamment de signes nerveux) et la mortalité était présente (2 canards sur 12). Le tropisme respiratoire marqué de l'infection était également caractéristique des virus H5 HP de lignée A/goose/Guandong/1/1996. Ces caractéristiques expérimentales sont corrélables aux observations épidémiocliniques sur le terrain, et vont permettre une étude des marqueurs génétiques associés à ces phénotypes différents.

ABSTRACT

Highly pathogenic H5 avian influenzavirus experimental infections in mule ducks: comparing French strains from 2015-2016 and 2016-2017 outbreaks

From November 2015 to July 2017, two succeeding episodes of highly pathogenic (HP) avian influenza (AI) H5 infections affected poultry farms in France, mostly domestic ducks raised for fatty liver production in Southwestern France. In 2015-2016, 81 outbreaks were detected in poultry farms only (mostly domestic waterfowl without declared disease). While in 2016-2017, the detected outbreaks affected both poultry (486 cases) and wild birds (55 cases), and the proportion of flocks detected following passive surveillance in poultry was higher than during the previous episode.

An experimental infection model was established in 6 to 7-week old mule ducks, with a HP H5N1 strain isolated in 2015 and a HP H5N8 strain from 2016. We were able to characterize and compare the susceptibility and

sensitivity of mule ducks for these recent strains, as well as the dynamics of infection and the tropism of the tested virus strains.

Experimental infection with HP H5N1 virus did not result in major clinical signs or virus-related mortality, and the excretion pattern had an intestinal tropism similar to that observed for low pathogenic AI viruses. On both previous criteria, the HP H5N8 virus had different characteristics: clinical signs were more noticeable (with the notable appearance of nervous symptoms) and mortality was observed in 2 ducks out of 12. The marked respiratory tropism of the infection was also characteristic of the A/goose/Guangdong/1/1996 lineage HP H5 viruses. These experimental characteristics were consistent with the epidemiological field observations, and will allow further study of the genetic markers associated with these different phenotypes.

INTRODUCTION

De novembre 2015 à juillet 2017, deux épisodes successifs d'infections à virus influenza aviaire (IA) H5 hautement pathogènes (HP) ont touché les élevages de volailles en France, essentiellement en production de canards gras dans le Sud-Ouest. De novembre 2015 à août 2016, 81 foyers d'infections liés à des virus IAHP H5 ont été déclarés dans 10 départements du Sud-Ouest de la France, uniquement en élevages de volailles (Le Bouquin *et al.*, 2016 ; Moisson *et al.*, 2017). Bien qu'au moins trois sous-types de neuraminidase différents (N1, N2 et N9) aient été associés aux virus en cause, les séquences de l'hémagglutinine H5 étaient apparentées entre elles et constituaient un groupe monophylétique dérivé des virus IA H5 de la lignée eurasiennne, distinct de la lignée H5 HP A/goose/Guangdong/1/1996 (Briand *et al.*, 2017 ; Briand *et al.*, 2018). Seuls 30 foyers (15 foyers sur troupeaux de galliformes, soit la totalité des foyers correspondants, et 15 foyers sur troupeaux de palmipèdes) ont été détectés dans le cadre de la surveillance événementielle. Toutefois, le caractère HP de ces virus a bien été confirmé par des tests in vivo de pathogénicité par voie intra-veineuse chez le poulet.

De novembre 2016 à juillet 2017, les foyers d'infections à virus IAHP H5 ont touché à la fois les volailles (486 cas dans 10 départements du Sud-Ouest, de l'Ouest et du Nord de la France) et l'avifaune sauvage (55 cas dans 15 départements sur l'ensemble du territoire). À une exception près, tous ces foyers étaient associés à des virus IA H5 HP différents de l'épisode précédent et appartenant au clade 2.3.4.4 de la lignée A/goose/Guangdong/1/1996, pour lesquels le sous-type de neuraminidase N8 a généralement été identifié (Bronner *et al.*, 2017). La proportion de détections dans le cadre de la surveillance événementielle en élevage (216/486 = 44 %) était plus élevée que lors de l'épisode précédent (30/81 = 37 %) et la présentation clinique relevée sur le terrain était également plus marquée.

Un modèle expérimental d'infection chez le canard mulard conventionnel a été établi afin de caractériser et de comparer la réceptivité et la sensibilité du canard

mulard vis-à-vis de deux souches récentes, issues de chacun des épisodes distincts précédemment décrits. De plus, ce modèle permet la description de la dynamique d'infection du virus et de son tropisme, observés en conditions contrôlées.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Procédure d'expérimentation animale

Animaux

Les canards mulards mâles conventionnels ont été achetés à 1 jour d'âge auprès de Grimaud Frères Sélection (49). Les animaux ont été élevés à l'Anses Ploufragan, en conditions confinées et atmosphère filtrée, jusqu'à leur inoculation ou mise en contact.

Virus

Deux virus issus de chacun des épisodes décrits en introduction ont été retenus :

- H5N1 A/chicken/France/150169a/2015 (H5N1 HP 150169a), isolé à partir d'écouvillons trachéaux prélevés sur des poulets de basse-cour (suspicion clinique) au 2^e passage sur œufs embryonnés de poules EOPS. L'index IPIV du virus sur poulets EOPS de 5 à 7 semaines était de 2,9.
- H5N8 A/decoy duck/France/161105a/2016 (H5N8 HP 161105a, appartenant au clade 2.3.4.4 de la lignée A/goose/Guangdong/1/1996), isolé à partir d'écouvillons trachéaux de canards appelants (suspicion clinique) au 2^e passage. L'index IPIV du virus sur poulets EOPS de 5,5 semaines était de 2,9.

Dispositif expérimental

Pour l'étude de chaque virus, deux groupes de canards mulards mâles conventionnels de 6,5 semaines ont été constitués :

- 8 canards ont été infectés, en isolateur, par instillation oculaire d'une dose de 10^6 DIE₅₀ (dans un volume de 100 µl) de virus ;
- 4 canards contacts non infectés ont été introduits dans le même isolateur 24 heures après inoculation.

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

Les animaux occupaient un isolateur de surface accessible aux animaux de 3 m² sur grillage, et avaient un accès libre à l'eau et à la nourriture.

La procédure d'expérimentation animale a fait l'objet d'un avis favorable du comité d'éthique institutionnel Anses/ENVA/UPEC (demande d'autorisation APAFiS 2017010410579770) et a été conduite en accord avec les législations européennes et françaises.

Prélèvements et examen clinique

Des écouvillons oropharyngés et cloacaux ont été prélevés individuellement quotidiennement après l'inoculation (sauf les 5^e, 6^e, 12^e et 13^e jours) et jusqu'au 18^e jour. Les animaux ont également fait l'objet d'un examen clinique quotidien (observation des signes généraux, respiratoires, nerveux et cutanés éventuels). Des prélèvements sanguins individuels sans anticoagulants ont été réalisés au 7^e jour et au 14^e-15^e jour après l'inoculation, et à la fin de l'étude (22 jours pour le virus H5N1 HP 150169a, et 18 jours pour le virus H5N8 HP 161105a).

1.2. Analyses de laboratoire

Les écouvillons individuels ont été repris, lysés et les ARN totaux ont été extraits comme décrit précédemment (Niqueux *et al.*, 2014). Le génome du virus influenza aviaire de type A a été recherché par rRT-PCR ciblant le gène M selon une méthode dérivée du manuel de diagnostic européen (Cherbonnel *et al.*, 2013 ; JOCE, 2006).

Les sérums ont été testés individuellement par techniques ELISA par compétition (trousses commerciales) pour la recherche d'anticorps anti-influenza aviaire de type A (Influenza A virus Antibody test kit, Idexx Laboratories) et anti-H5 (ID Screen Influenza H5 Antibody Competition, ID Vet). Les valeurs d'indice de densité optique obtenues ont été interprétées selon la notice en vigueur du fournisseur. Des analyses ont également été effectuées par technique d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) selon la méthode normalisée (AFNOR, 2013) avec l'antigène inactivé homologue au virus utilisé au cours de l'essai correspondant. Le seuil de positivité retenu est de 16.

1.3. Analyse des données

Les valeurs brutes de Ct obtenues en rRT-PCR ont été normalisées en utilisant une gamme d'ARN étalon de concentration connue pour chaque essai. Une valeur-seuil de positivité a été établie à partir des valeurs normalisées de Ct en rRT-PCR obtenues à partir d'une série de dilutions de raison 10 d'un stock de chacun des virus, titrés en parallèle sur œufs embryonnés de poules EOPS : soit une dose équivalente à 2 à 6 DIE₅₀ / réaction rRT-PCR selon le virus (Niqueux *et al.*, 2014).

Les résultats normalisés ont été interprétés qualitativement en fonction du seuil de positivité précédemment défini, afin d'estimer la période d'excrétion du virus. Cette durée a été déterminée individuellement comme le nombre de jours

consécutifs où des résultats positifs sont observés par voie oropharyngée ou cloacale (incluant le cas échéant un résultat entièrement négatif isolé, encadré par deux résultats positifs).

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Signes cliniques

Au cours de l'étude expérimentale du virus H5N1 HP 150169a, seuls des symptômes discrets et inconstants de conjonctivite ont été observés. L'un des canards inoculés a été euthanasié au 8^e jour de l'essai, suite à une blessure sévère sans lien avec l'infection.

Pour le virus H5N8 HP 161105a, les 12 canards inoculés ou contacts ont présenté des signes cliniques modérés (œdème du cou et de la base de la tête associé ou non à une conjonctivite) à sévères, avec des symptômes neurologiques évidents (torticolis et ataxie), à partir du 4^e jour après inoculation. Les signes cliniques les plus marqués ont évolué vers la mort tardive d'un canard contact au 13^e jour après inoculation, et l'euthanasie au 14^e jour d'essai d'un canard inoculé trop affaibli par la maladie.

Excrétion virale (Figure 1)

Pour les deux virus testés, l'excrétion virale a débuté (soit par voie oropharyngée seule, soit par voie oropharyngée et cloacale) dès 24 heures après inoculation ou contact pour l'ensemble des canards. Pour le virus H5N1 HP 150169a, l'excrétion oropharyngée et cloacale était simultanée dès le lendemain de la mise en contact, alors que le délai a été de 2 jours après l'inoculation pour les canards directement infectés. Pour le virus H5N8 HP 161105a, le délai a été de 3 jours après inoculation ou contact pour observer une excrétion simultanée.

L'excrétion virale a persisté pour la totalité des sujets infectés et contacts jusqu'à moins de 6 jours et jusqu'à 7 jours après l'inoculation, respectivement pour le virus IAHP H5N1 150169a et le virus IAHP H5N8 161105a. Pour le virus H5N1 HP 150169a, les durées d'excrétion observées s'échelonnaient d'au moins 4 à au moins 10 jours après inoculation ou contact, avec une durée médiane de 8 jours. La proportion de détection par voie cloacale a été significativement plus importante que par voie oropharyngée (test de Mc Nemar ; $p=0,006$), l'excrétion par voie cloacale seule ayant été majoritaire pendant la 2^e semaine de l'essai. Pour le virus H5N8 HP 161105a, l'excrétion virale a persisté pendant 7 à au moins 15 jours après inoculation ou contact, avec une durée médiane de 8 jours. Le profil de détection était inversé par rapport au virus précédent, la proportion de détection par voie oropharyngée ayant été significativement plus importante que par voie cloacale (test de Mc Nemar ; $p=0,011$).

Cinétique de l'immunité humorale spécifique

Pour les deux virus testés, tous les sérums prélevés au 7^e jour après inoculation étaient positifs en ELISA NP et en ELISA H5, sur les 12 canards testés. Pour le

virus H5N1 HP 151169a, les 12 canards étaient positifs en IHA avec l'antigène homologue dès le 7^e jour après inoculation. Pour le virus H5N8 HP 161105a, seuls 6 des 8 canards directement inoculés étaient positifs en IHA vis-à-vis de l'antigène homologue, et aucun des 4 canards contacts n'était positif. Cependant, l'ensemble des 11 canards survivants au 15^e jour avaient bien séroconverti en IHA homologue.

La séropositivité pour les tests ELISA NP, ELISA H5 et IHA homologues persistait au 14^e ou 15^e jour et à l'abattage sur l'ensemble des canards survivants (soit un effectif de 10 à 11 canards selon le virus testé et la date de prélèvement).

CONCLUSION

Les canards mulards de 6,5 semaines étaient très réceptifs à l'infection expérimentale par voie intra-oculaire, pour les virus IAHP H5N1 150169a et H5N8 161105a testés, et la transmission aux canards contacts naïfs a été très efficace et très rapide (dans les 24 heures après introduction).

La sensibilité à la maladie était nulle pour le virus IAHP H5N1 150169a et modérée à importante pour le virus IAHP H5N8 161105a. Pour ce dernier, les symptômes observés étaient discrets à sévères (avec

des signes nerveux dans ce cas) et la mortalité faible et tardive (2 canards morts sur 12 sujets).

Cette différence était corrélée à l'augmentation de la proportion de détections de cas cliniques en élevage lors de la saison 2016-2017.

Bien que les durées d'excrétion observées aient été proches pour les deux virus testés, les profils d'excrétion étaient nettement différenciés. L'excrétion cloacale était dominante pour le virus IAHP H5N1 150169a évoquant des profils d'excrétion typiques de virus influenza aviaires faiblement pathogènes chez le canard (Niqueux *et al.*, 2014) et similaires au profil d'excrétion chez le canard de Barbarie EOPS d'un virus H5N9 HP isolé en 2015 et apparenté au virus H5N1 HP testé ici (Niqueux *et al.*, 2017). Alors que l'excrétion oro-pharyngée était plus prononcée pour le virus IAHP H5N8 161105a, et semblable aux profils d'excrétion décrits chez le canard pour d'autres virus IAHP de la lignée A/goose/Guangdong/1/1996 (Guionie *et al.*, 2010), y compris d'autres virus appartenant au clade 2.3.4.4 (Pantin-Jackwood *et al.*, 2016 ; Lee *et al.*, 2016 ; Grund *et al.*, 2017).

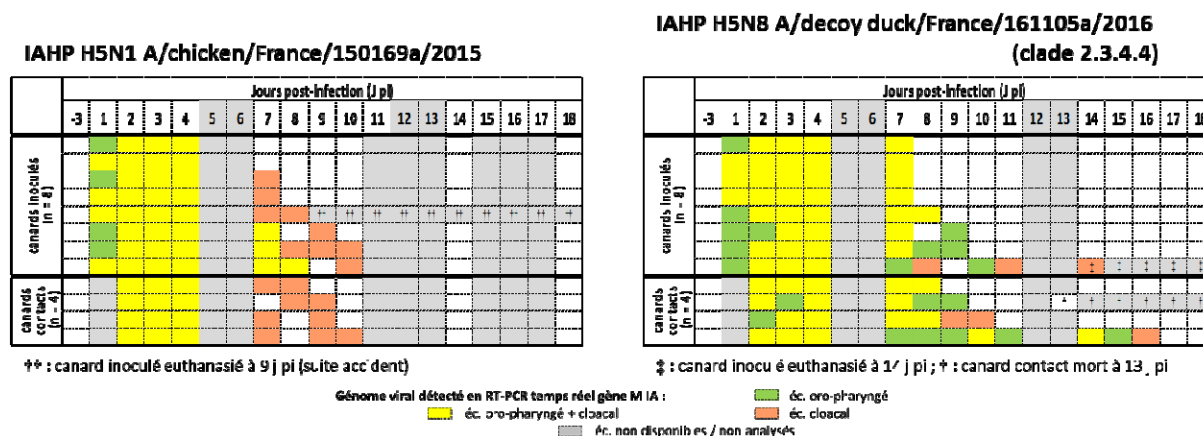
Le modèle expérimental d'infection décrit ici permettra l'étude des facteurs de pathogénicité et de virulence propres à ces virus, après reconstruction par génétique inverse de virus porteurs de différents marqueurs potentiels identifiés.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Le Bouquin S., Huneau-Salaün A., Hamon M., Moisson M.C., Scoizec A., Niqueux É., Schmitz A., Briand F.X., van de Wiele A., Bronner A., 2016. L'épisode d'influenza aviaire en France en 2015-2016 – Situation épidémiologique au 30 juin 2016. BE santé animale et alimentation, (75), 2-8.
- Moisson M.C., Huneau-Salaün A., Hamon M., Niqueux É., Scoizec A., Schmitz A., Briand F.X., Fediaevsky A., Le Bouquin S., Bronner A., 2017. Résultats de la surveillance de l'influenza aviaire en France - Point de situation au 08/08/2016. <https://www.pasteur.fr/fr/article/resultats-de-la-surveillance-de-l-influenza-aviare-en-france-point-de-situation-au-08082016>.
- Cherbonnel M., Henry A., Ogor K., Jestin V., 2013. Validation of a duplex real-time RT-PCR assay to detect avian influenza virus matrix gene using armored RNA as an internal positive control. In : Book of abstracts, WVPAC 2013, 19-23 août 2013, Nantes, France. 466.
- Niqueux É., Picault J.P., Amelot M., Allée C., Lamandé J., Guillemoto C., Pierre I., Massin P., Blot G., Briand F.X., Rose N., Jestin V., 2014. Quantitative transmission characteristics of different H5 low pathogenic avian influenza viruses in Muscovy ducks. Vet Microbiol, (168), 78-87.
- Briand F.X., Schmitz A., Ogor K., Le Prioux A., Guillou-Cloarec C., Guillemoto C., Allée C., Le Bras M.O., Hirchaud E., Quenault H., Touzain F., Cherbonnel-Pansart M., Lemaitre E., Courtillon C., Gares H., Daniel P., Fediaevsky A., Massin P., Blanchard Y., Eterradossi N., van der Werf S., Jestin V., Niqueux É., 2017. Emerging highly pathogenic H5 avian influenza viruses in France during winter 2015/16: phylogenetic analyses and markers for zoonotic potential. Euro Surveill, (22), pii=30473 (11p.).
- Briand F.X., Niqueux É., Schmitz A., Hirchaud E., Quenault H., Allée C., Le Prioux A., Guillou-Cloarec C., Ogor K., Le Bras M.O., Gares H., Daniel P., Fediaevsky A., Martenot C., Massin P., Le Bouquin S., Blanchard Y., Eterradossi N., 2018. Emergence and multiple reassortments of French 2015-2016 highly pathogenic H5 avian influenza viruses. Infect Genet Evol, (61), 208-214.
- Bronner A., Niqueux É., Schmitz A., Le Bouquin S., Huneau-Salaün A., Guinat C., Paul M., Courcoul A., Durand B., 2017. Description de l'épisode d'influenza aviaire hautement pathogène en France en 2016-2017. BE santé animale et alimentation, (79), 13-17.

- Lee D.H., Bertran K., Kwon J.H., Swayne D.E., 2017. Evolution, global spread, and pathogenicity of highly pathogenic avian influenza H5Nx clade 2.3.4.4. *J Vet Sci*, (18 S1), 269-280.
- AFNOR, 2013. NF U 47-036-1 et NF U 47-036-2, Méthodes d'analyse en santé animale – Recherche d'anticorps contre les orthomyxovirus (influenzavirus) aviaires de type A de sous-types H5 et H7 par la technique d'inhibition de l'hémagglutination – partie 1 : criblage et partie 2 : confirmation. 11 octobre 2013. AFNOR (Éd.), Paris, France.
- JOCE, 2006. Décision 2006/437/CE de la Commission du 4 août 2006 portant approbation d'un manuel de diagnostic pour l'influenza aviaire conformément à la directive 2005/94/CE du Conseil. (L237), 1-27.
- Guionie O., Guillou Cloarec C., Courtois D., Bougeard S., Amelot M., Jestin V., 2009. Experimental infection of Muscovy ducks with highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) belonging to clade 2.2. *Av Dis*, (54 S1), 538-547.
- Grund C., Hoffmann D., Ulrich R., Naguib M., Schinköthe J., Hoffmann B., Harder T., Saenger S., Zscheppang K., Tönnies M., Hippenstiel S., Hocke A., Wolff T., Beer M., 2018. A novel European H5N8 influenza A virus has increased virulence in ducks but low zoonotic potential. *Emerg Microbes Infect*, (7), 132 (14 p.).
- Pantin-Jackwood M.J., Costa-Hurtado M., Shepherd E., DeJesus E., Smith D., Spackman E., Kapczynski D.R., Suarez D.L., Stallknecht D.E., Swayne D.E., 2016. Pathogenicity and Transmission of H5 and H7 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Mallards. *J Virol*, (90), 9967-9982.
- Pantin-Jackwood M.J., Swayne D.E., 2009. Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds. *OIE Rev Sci Tech*, (28), 113-136.

Figure 1. Profils individuels d'excrétion des virus IAHP H5N1 150169a et H5N8 161105a chez le canard mulard conventionnel de 6 à 7 semaines



IMPACT TECHNICO-ECONOMIQUE DE LA MALADIE DE DERZSY EN FILIERE CANARD MULARD

**Banse Xavier¹, Landais François¹, Corrand Lény¹, Audoin Laurent², Skiba Fabien²,
Pennanguer Bénédicte², Pinsard Jean-Louis³, Courant Yanneck⁴, Perreul Guillaume⁴**

¹Abiopole - Route de Samadet - 64410 ARZACQ ARRAZIGUET

²Maïsadour – Route de l’Océan – 40500 SAINT SEVER

³BCV - ZI de Bellevue - 35220 CHATEAUBOURG

⁴Boehringer Ingelheim - 29 Avenue Tony Garnier - 69007 LYON

xavier.banse@anibio.fr

RESUME

La maladie de Derzsy est une dominante pathologique chez les palmipèdes domestiques. Chez le canard mulard, la maladie est rapportée cliniquement avec le syndrome nanisme bec court. Aujourd’hui, la forme sub-clinique supplante la forme clinique. Il apparaît donc nécessaire d’évaluer les conséquences technico-économiques d’une circulation du parvovirus pour justifier d’un plan préventif adapté.

Entre septembre et décembre 2015, 184 lots de canards mulards adhérents Maïsadour, sont recrutés. 25 canards sont écouvillonnés par lot à trois et six semaines de vie afin de réaliser une PCR derzsy. Aucun site ne vaccine contre la maladie de Derzsy. Les données de performance de lots sont collectées, puis analysées.

Les écouvillonnages cloacaux montrent une circulation du parvovirus dans 9 % des lots à trois semaines de vie, et 39 % des lots à six semaines de vie. Aucun signe clinique n’a été rapporté.

Le traitement des résultats de lots montre un impact technico-économique significativement plus élevé lors d’une circulation précoce (avant 3 semaines) du parvovirus. L’impact se chiffre alors à 0.64 € par caneton (perte ventilée pour 45 % auprès du résultat de lot de l’éleveur, et pour 55 % auprès de l’abattoir avec un impact sur les rendements magrets et les saisies foies). Lors d’une circulation tardive (entre trois et six semaines) du parvovirus, l’impact se chiffre à 0.27 € par caneton (perte n’affectant pas l’abattoir).

La vaccination précoce du caneton permet de différer la circulation virale en dehors de la période la plus impactante d’un point de vue technico-économique.

ABSTRACT

Technico-economical impact of Derzsy disease on mulard ducks

Derzsy disease is one of the most important disease in mulard ducks, despite a few clinical signs are reported from the field. That’s why the evaluation of technico-economical impacts of this subclinical disease is crucial.

From September 2015 to December 2015, 184 batches of mulard ducks from Maïsadour were selected, without Derzsy vaccination. 25 ducks were swabbed at 3 and 6 weeks old for derzsy PCR. Performances data were registered and analyzed. Cloacal swabs show a Derzsy circulation in 9 % of batches at 3 weeks of age and 39 % at 6 weeks of age. No clinical signs were reported.

According to statistical analysis, the earlier the viral circulation is, the more important the technico-economical consequences are: 0.64 € per duck at 3 weeks and 0.27 € per duck at 6 weeks.

INTRODUCTION

Le parvovirus de la maladie de Derzsy est à l'origine du syndrome « nanisme – bec court ».

Le parvovirus de la maladie de Derzsy a été isolé chez l'oie en France en 1972. Il était déjà connu et étudié en Hongrie par l'équipe du Pr. Derzsy dès 1967. Le virus appartient à la famille des *Parvoviridae*, virus à ADN de petite taille (20 nm de diamètre), non enveloppés à symétrie icosaédrique (Lemière et Fournier, 2015).

La maladie est plus ou moins caractéristique, selon la pression virale du terrain, ayant toujours pour manifestation principale un retard de croissance. La forme clinique est rare, plutôt décrite dans la littérature. La forme subclinique domine. Des malformations telles que le « profil d'oie », la courbure des os longs des membres inférieurs sont associées de façon inconstante au retard de croissance qui peut, dans certains cas, s'avérer harmonieusement réparti. Le taux d'atteinte le plus souvent observé dans une bande est de 10 à 30 %. Le canard mulard, au même titre que l'oie est sensible au parvovirus.

Les conséquences technico-économiques de la maladie de Derzsy sous sa forme sub-clinique sont peu documentées. Bien souvent, la présence du virus de la maladie de Derzsy sur un lot est considérée comme banale, et ne s'accompagne pas d'une analyse de performances de celui-ci. L'objectif de cette étude à large échelle est de comparer les résultats technico-économiques des lots selon leur statut Derzsy à trois ou six semaines de vie.

MATERIELS ET METHODES

1. Critères de recrutement des élevages

184 élevages de canard mulard prêt à gaver (PAG) ont été recrutés au sein de l'organisation de production Maïsadour. Les critères de sélection retenus étaient l'absence de signes cliniques et de vaccination contre la maladie de Derzsy. Un lot par élevage PAG a été retenu.

2. Prélèvements biologiques

Dans chaque site PAG, 25 canards ont été écouvillonnés au niveau du cloaque, à deux âges fixes : trois et six semaines de vie. L'ensemble des prélèvements ont été réalisés entre septembre et novembre 2015 pour les prélèvements à trois semaines, et d'octobre à décembre pour les prélèvements à six semaines. Un même écouvillon

a été répété sur cinq canards différents. Les cinq écouvillons ont été conservés au froid négatif (-18°C) pour être ensuite analysés lors d'une même série au laboratoire Bio Chêne Vert avec le kit commercial PCR Anicon (Kylt® MDPV/GPV – Muscovy Duck Parvo Virus / Goose Parvo Virus). Un pool de cinq écouvillons représentant 25 canards sert donc à caractériser le lot à chaque date. Si le lot de PAG était PCR positif, alors les lots partant en gavage ont aussi été considérés comme positifs dans la base de données.

3. Collecte des données de performances

Les données de performance des élevages de PAG (poids de sortie PAG (kg), indice de consommation en sortie PAG (IC), mortalité (%), marge économique éleveur (MEE exprimée en € / canard) ainsi que celles des lots en gavage (rendements viande cuisses et magrets (%), déclassements magrets (%), déclassements cuisses (%), déclassements manchons (%), saisies (%), classements des foies (%)) ont été collectées.

4. Analyse de l'impact économique

Les motifs de saisies ont été recensés et convertis économiquement. L'impact des saisies foies a été estimée à 0.04 € / canard. Afin d'évaluer l'impact économique cuisse et magret, il a été pris comme référence : 4.2 € / kg de cuisse et 12 € / kg de magret classé contre 5 € / kg de magret déclassé.

5. Analyse statistique

L'ensemble des données ont été analysées par analyse de variance à l'aide du logiciel R.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats des PCR

A trois semaines de vie, 8.9 % des lots sont positifs en PCR GP. A six semaines de vie, 39 % des lots sont positifs en PCR GPV.

Dans cette étude, tous les lots de PAG positifs en PCR à trois semaines de vie, étaient également positifs en PCR à six semaines de vie.

2. Résultats des données de performances des lots positifs à 3 semaines de vie

Les données de performances des lots sont détaillées selon les résultats des PCR réalisés à trois semaines de vie (Tableau 1).

Les lots avec une positivité Derzsy en PCR à trois semaines de vie sont significativement et négativement impactés pour les paramètres suivants :

- détérioration de la marge MEE pour une valeur de 0.29 € / canard,
- dégradation du rendement viande de 1.3 point, estimable à 0.31 € / canard,
- augmentation des gros foies et
- augmentation significative des saisies pour motifs cachexie, foie péritonite et foie congestif, estimable à 0.04 € / canard.

Le cumul des trois impacts significatifs de la Derzsy (marge MEE, rendement viande et augmentation des saisies) est estimable à 0.64 € / canard.

Une augmentation des gros foies (> 600 g) est constatée dans les sites avec une circulation du virus de la maladie de Derzsy.

Les signes cliniques classiques (nanisme, bec court, ailes cassées) ne sont pas rapportés.

3. Résultats des données de performances des lots positifs à 6 semaines de vie

Les données de performances des lots sont détaillées selon les résultats des PCR réalisées à six semaines de vie (Tableau 2).

Les lots avec uniquement une positivité Derzsy en PCR à six semaines de vie sont significativement et négativement impactés pour les paramètres suivants :

- détérioration de la marge MEE de 0.28 € / canard et
- augmentation des gros foies.

Le cumul des impacts significatifs de la Derzsy (marge MEE) est estimable à 0.28 € / canard.

Une augmentation des gros foies (> 600 g) est constatée dans les sites avec une circulation du virus de la maladie de Derzsy.

Les signes cliniques classiques (nanisme, bec court, ailes cassées) ne sont pas rapportés.

Le traitement statistique entre les lots uniquement positifs à six semaines, et ceux positifs à trois et six semaines n'a pas été réalisé.

CONCLUSION

Le virus de la maladie de Derzsy est bien représenté sur le terrain avec près d'un élevage sur 10 positif à trois semaines de vie et près d'un élevage sur trois positif à six semaines de vie.

Plus la circulation du virus de la maladie de Derzsy est précoce (trois semaines de vie), plus les impacts technico-économiques sont importants avec notamment un impact significatif de la présence du virus sur les poids de PAG et les rendements muscles. Les parvovirus sont connus pour leur tropisme musculaire (myocardite, myopathie), et on pourrait supposer que le virus se multiplie d'autant mieux que les cellules musculaires sont en pleine activité de croissance sur des canetons jeunes.

L'intérêt de différer la circulation du virus de la maladie de Derzsy en installant une protection vaccinale dès le premier jour de vie prend ici tout son sens au vu des résultats d'excrétion du virus sauvage au-delà de 21 jours de vie lors d'un challenge précoce (Corrand et al., 2013). Si cette vaccination est estimée à 0.09 € par canard, le retour sur investissement est économiquement intéressant

Lorsque le virus de la maladie de Derzsy circule plus tardivement (six semaines de vie), l'impact technico-économique reste cantonné au résultat de lot en PAG.

REMERCIEMENTS

A Bénédicte Pennanguer et Yanneck Courant pour leur implication assidue dans l'extraction des données de la base.

A Maxime Quentin pour la définition du protocole.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Corrand et al., 2013, JRA-JRPFG
Lemière et Fournier, 2015, Maladie de pathologie aviaire, p597-599

Tableau 1 : Données de performances des lots positifs à trois semaines de vie

Critère		Lots avec PCR négative	Lots avec PCR positive	Probabilité statistique
Marge MEE (€ / canard)		1.99	1.70	0.04
Poids de PAG (kg)		4.20	4.18	NS
IC sortie PAG		3.94	3.93	NS
Mortalité (%)		3.4	3.7	NS
Prix moyen des magrets (€ / canard)		6.02	5.71	
Rendement viande en cuisses et magrets (%)		61.3	60	0.0719
Déclassement magret (%)		35.5	44.6	NS
Déclassement cuisse (%)		3.2	3.2	NS
Déclassement manchon (%)		9.8	9.6	NS
Classement des foies (%)	<300 g	0.7	0.1	NS
	300 – 350 g	1.6	0.6	NS
	350 – 500 g	24.6	13.9	0.09
	500 – 600 g	21.3	12.4	p < 0.0001
	600 – 700 g	45.8	63.1	0.0088
>700 g		6	9.6	0.03
Canards saisis (%)		0.7	0.7	NS
Motifs de saisies (%)	Rouges	53.7	56.9	NS
	Cachexie	8.1	15.9	0.09
	Lésions jabot	2.9	3.1	NS
	Foie couleur	29.4	20	NS
	Foie péritonite	0.5	10	0.0022
	Foie congestif	11.5	35.4	0.0037
	Foie dur	1.6	0	NS
	Foie sclérose	0	0	NS
	Foie hématome	26	27.8	NS
	Foie autre	9.5	0.7	NS
	Foie non développé	20	5	NS
	Foie marbré	1.4	1	NS

Tableau 2 : Données de performances des lots positifs à six semaines de vie

Critère		Lots avec PCR négative	Lots avec PCR positive	Probabilité statistique
Marge MEE (€ / canard)		2.08	1.80	0.0036
Poids de PAG (kg)		4.21	4.25	NS
IC sortie PAG		3.877	3.945	NS
Mortalité (%)		3.2	3.6	NS
Rendement viande en cuisses et magrets (%)		61.4	61.5	NS
Déclassement magret (%)		34.7	32.4	NS
Déclassement cuisse (%)		3.2	3.2	NS
Déclassement manchon (%)		9.9	9.6	NS
Classement des foies (%)	<300 g	0.6	0.6	NS
	300 – 350 g	1.6	1.3	NS
	350 – 500 g	26.9	15.7	0.0034
	500 – 600 g	22.5	16.6	p < 0.0001
	600 – 700 g	43.1	57.4	0.004
	>700 g	5.3	8.2	0.0033
Canards saisis (%)		0.8	0.5	0.0526
Motifs de saisies (%)	Rouges	56.8	58.9	NS
	Cachexie	6.2	8.7	NS
	Lésions jabot	2	1.8	NS
	Foie couleur	29.2	26	NS
	Foie péritonite	0.2	1	NS
	Foie congestif	11.3	13.2	NS
	Foie dur	0.9	2.1	NS
	Foie sclérose	0	0	NS
	Foie hématome	27.2	27.5	NS
	Foie autre	8	12	NS
	Foie non développé	21.9	17.9	NS
	Foie marbré	1.4	0.2	NS

REFA²VI: VERS LA FORMALISATION D'UN RESEAU DE REFERENCES PROFESSIONNELLES FRANÇAIS SUR L'UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES EN EXPLOITATIONS AVICOLES.

Rousset Nathalie¹, Carré Yannick², Richard Anne¹, Brice Yann² et Chauvin Claire³

¹ ITAVI, 7 rue du Faubourg Poissonnière, 75009 Paris, France

² CIDEF-CIPC-CICAR, ZAC Atalante Champeaux 3 allée Ermengarde d'Anjou, 35000
Rennes, France

³ Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzanné - BP53, 22440 Ploufragan, France
rousset@itavi.asso.fr

RÉSUMÉ

En France, un suivi annuel des ventes des médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques, est assuré par l'Anses-ANMV depuis 1999. Ce travail permet de générer des références sur des indicateurs d'exposition pour chaque grande catégorie d'espèces (porcs, volailles, bovins ...). Toutefois, ces données ne permettent pas de produire des références reflétant la diversité d'espèces et de secteurs de production des filières avicoles. Par la signature d'une charte en 2016, les filières volailles de chair se sont engagées à définir un indicateur de suivi de l'utilisation des antibiotiques. C'est pourquoi, l'ITAVI, avec l'interprofession volailles de chair et l'Anses formalisent un réseau professionnel de collecte de données informatisées sur l'utilisation des antibiotiques au niveau des exploitations avicoles (RefA²vi). A partir de données collectées en élevage, une discussion sur les indicateurs les plus pertinents a été conduite pour toutes les productions avicoles. Un schéma possible d'organisation du réseau a été imaginé et testé lors d'une phase pilote. Les données informatisées enregistrées par les organisations de production avicole seront envoyées à l'interprofession pour anonymisation et agrégation, puis l'ITAVI sera chargé des calculs des indicateurs d'exposition suivant une méthode éprouvée définie avec l'Anses. L'ITAVI assurera également l'animation du réseau (publication des résultats, organisation des réunions du comité de pilotage).

ABSTRACT :

RefA²vi: Towards the formalization of a French professional reference network on the use of antibiotics at poultry farms level.

The French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (Anses-ANMV) has been monitoring sales of antibiotics since 1999. Estimates allow estimating the breakdown between major categories of species (pigs, poultry, cattle...). However, this work does not make it possible to distinguish the different species of poultry, nor the different production sectors. Currently poultry production organizations are committed to defining an indicator monitoring the reasoned use of antibiotics. That is why, the French Poultry Institute (ITAVI), with the French poultry's inter-professional organizations and Anses formalize a professional network to collect computerized data on use of antibiotics at farm level (RefA²vi project). In 2014 and 2015, two surveys allowed collecting data from poultry farms in all species and production types. This work aimed to discuss then to choose with the professional actors, the more pertinent indicators for all poultry productions. Finally, partners imagined a scheme of network organization, which have been tested during a pilot phase. The computerized data on use of antibiotics recorded by poultry production organizations will be sent to CIPC-CIDEF-CICAR for anonymization and aggregation, in order to send them at ITAVI, which will calculate the exposure indicators following a proven method defined with Anses. ITAVI will ensure the network's animation (newsletter, organization of steering committee meetings).

CONTEXTE ET INTRODUCTION

La lutte contre l'antibiorésistance constitue aujourd'hui un enjeu majeur pour la santé publique. Afin d'y apporter leur contribution, les filières de productions animales se sont pleinement engagées dans le plan Écoantibio 2017, lancé en 2012 par le Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation. L'engagement de l'ensemble des acteurs a permis aujourd'hui d'atteindre une réduction globale des usages d'antibiotiques en médecine vétérinaire de 39 % par rapport à 2011, et de près de 49 % pour les filières avicoles (Anses, 2018). L'objectif de 25 % de réduction fixé initialement par le plan est donc largement atteint. Néanmoins, les efforts sont à poursuivre afin de pérenniser ces bons résultats. En 2017, malgré une forte réduction des usages, la filière avicole reste l'une des filières de production animale les plus exposées aux antibiotiques, avec un indice ALEA (Animal Level of Exposure to Antimicrobials) de 0,52 (derrière les filières de production porcine et cunivole) (Anses, 2018).

Ces données proviennent du suivi annuel des ventes des médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques, assuré par l'Anses-ANMV depuis 1999. Ce travail permet de générer des références sur des indicateurs d'exposition pour différentes espèces animales (porcs, volailles, bovins ...). Toutefois, les données à la base des calculs collectées auprès des industries du médicament vétérinaire, ne permettent pas de produire des références reflétant la diversité d'espèces et de secteurs de production des filières avicoles.

Au cours des années 2000, des enquêtes en élevages et des outils de suivi permettant de décrire de références sur les usages réels des antibiotiques en élevage ont été mis en œuvre par l'Anses (2001 à 2008) (Chauvin et al., 2005 ; Chauvin et al., 2008 ; Chauvin C., 2009). Un état des lieux a été renouvelé en 2012 en production de poulets et dindes de chair standard, à la demande du CIPC et du CIDEF. Ces travaux permettent d'avoir des références plus détaillées sur les usages d'antibiotiques dans les filières avicoles, mais n'ont cependant pas été pérennisés dans le temps. Le seul dispositif pérenne en place à l'heure actuelle est celui du SYNALAF, propre aux productions « label », qui permet d'obtenir chaque trimestre un indicateur de fréquence d'utilisation des antibiotiques (Adam, 2017).

Le plan Ecoantibio2017 a permis de faire émerger le projet RefA²vi qui vise à formaliser un réseau professionnel de collecte de données informatisées sur l'utilisation des antibiotiques dans les exploitations de volailles de chair.

1. METHODE

1.1 Inventaire des indicateurs possibles

En 2014 et 2015, des questionnaires ont été envoyés par voie postale, à des éleveurs de poulets de chair (916), dindes (552), canards à rôti (400), mixtes

(plusieurs espèces élevées, 607), pintades/cailles (207) et poules pondeuses d'œufs de consommation (700). Ces éleveurs avaient été tirés au sort, et ont répondu de manière anonyme, sur un lot de volailles élevé durant l'année de l'enquête (le dernier à réception de l'enquête).

Les données collectées étaient les suivantes :

- Espèce produite
- Type de production
- Mise en place du lot : date de mise en place et nombre d'animaux mis en place (distinction mâles/femelles pour les productions sexées)
- Enlèvement du lot : dates d'enlèvement, et pour chaque date nombre d'animaux enlevés, poids correspondant et sexe (si production sexée)
- Taux de mortalité
- Traitements administrés au cours du lot enquêté :
 - Date de début et fin
 - Nom du produit
 - Voie d'administration
 - % ou nombre d'animaux traités
 - Poids des animaux lors du traitement
 - Dose ou quantité administrée
 - Motif de traitement

Ces informations ont permis de calculer pour chaque espèce de volailles et type de production, les indicateurs suivants sur la période 2014-2015 :

- Le taux de lots traités par antibiotiques pour chaque espèce
- Le nombre moyen de traitements par lot, par animal
- Le nombre de jours de traitement par lot, par animal
- L'index de fréquence des traitements Antibiotiques (IFTA), qui correspond au nombre de jours d'administration d'antibiotiques, multiplié par le nombre de molécules actives présentes dans le traitement antibiotique, et rapporté à la durée d'élevage (Fortun-Lamothe et al, 2011)
- L'indicateur d'exposition des animaux aux antibiotiques ALEA (Animal Level Exposure to Antimicrobials – rapport de la biomasse traitée sur la biomasse produite en considérant les effectifs et un poids type par espèce) (Anses, 2018)
- Le taux de lots traité par chacune des familles antibiotiques pour chaque des espèces
- L'âge moyen au traitement (pour tout antibiotique et pour chaque famille d'antibiotiques)
- Les proportions de traitements liées aux différentes affections recensées et principaux appareils (locomoteur, digestif et respiratoire)

1.2 Inventaire des données existantes

Afin de construire un schéma de fonctionnement du réseau RefA²vi avec le groupe de travail, qui soit compatible avec les données préexistantes et contraintes pratiques, des entretiens ont été conduits avec des organisations de production disposant de

dispositifs internes permettant la saisie, l'enregistrement et la compilation de tout ou partie des données nécessaires au calcul des indicateurs d'utilisation des antibiotiques retenus pour le réseau RefA²vi. Ces dispositifs sont à l'origine conçus pour des utilisations différentes, ce qui suggère des architectures diverses et des sources de données hétérogènes.

1.3 Phase pilote de test

En 2016, une charte d'engagement de la filière Volailles de chair sur l'usage raisonné des antibiotiques a été signée par l'ensemble des maillons dont les organisations de production et les éleveurs. Il est ainsi proposé dans ce document d'évaluer les indicateurs suivants :

- **IFTA** qui correspond au nombre de jours d'administration d'antibiotiques rapporté à la durée d'élevage (Fortun-Lamothe et al, 2011)
- **L'ALEA** qui correspond selon la définition de l'Anses au rapport du poids vif traité sur la biomasse potentiellement consommatrice d'antibiotique en France sur l'année considérée (Anses, 2018)
- **Le nombre de DDD_{vet} (Defined Daily Dose)**, qui correspond à la quantité de matière active nécessaire pour traiter un animal type pendant un jour avec le traitement en question (EMA-ESVAC, 2016). Cet indicateur est calculé en divisant les quantités de matière active utilisées pour un animal, par les doses de référence DDD_{vet}. Les jours de traitement d'une spécialité antibiotique comprenant une association de deux molécules par exemple, sont comptabilisés deux fois dans le calcul exact du nombre de DDD_{vet}. Cet indicateur habituellement obtenu à partir des données de prescription, revient approximativement à calculer un **nombre de jours de traitement par animal** (sous l'hypothèse que le traitement est prescrit à la dose DDD_{vet}), qui peut être obtenu par ailleurs à partir des données de l'historique des traitements de l'élevage
- **Le nombre de DCD_{vet} (Defined Course dose)** qui correspond à la quantité de matière active nécessaire pour traiter un animal type avec le traitement en question sur toute la durée du traitement (durée de référence DDD_{vet}) (EMA-ESVAC, 2016). Cet indicateur est calculé en divisant les quantités pondérales d'antibiotiques utilisées pour un animal, par la dose de référence DDD_{vet} multipliée par la durée de référence du traitement en question. Les traitements d'une spécialité antibiotique comprenant une association de deux molécules par exemple, sont comptabilisés deux fois dans le calcul exact du nombre de DCD_{vet}. Cet indicateur, également obtenu à partir des données de prescription, revient approximativement à calculer un **nombre de traitements par animal** (sous l'hypothèse que le traitement est prescrit à la dose DDD_{vet}),

qui peut être calculé à partir de l'historique des traitements.

Une phase pilote a été engagée en 2018 pour tester, avec quatre organisations de production de volailles de chair, la faisabilité technique d'un schéma de réseau envisagé avec le groupe de travail du réseau RefA²vi.

Les catégories de données minimales à recueillir sur les traitements antibiotiques d'une part, et sur les lots d'autre part, pour pouvoir calculer les indicateurs retenus ont été listées. Pour chaque indicateur, une voie de calcul « principale » permettant un calcul « exact » (c'est-à-dire avec les hypothèses de calculs employées communément). Par exemple la voie « principale » pour le calcul de l'ALEA est celle réalisée avec les mêmes hypothèses de calcul que celles utilisées par l'Anses-ANMV (Anses, 2018). Une voie de calcul « secondaire » a également été définie pour les situations où toutes les catégories de données ne seraient pas disponibles pour le calcul de l'indicateur « exact ». Cette voie « secondaire » permet le calcul d'un indicateur « déduit » ou « estimé » avec des hypothèses de calcul propres au réseau RefA²vi.

Ainsi, les données d'entrées à recueillir pour le calcul du numérateur de l'ALEA « exact » sont pour chaque traitement, un code d'identification du traitement (ex : code GTIN, code interne, code OPEN data...) permettant son identification dans la base de données OPEN DATA mise à disposition par l'Anses (<https://www.anses.fr/fr/content/suivi-des-ventes-dantibiotiques-v%C3%A9t%C3%A9rinaires>), nombre d'unité de vente délivrées. Pour le calcul du numérateur d'un ALEA « déduit », il est nécessaire de recueillir la date du début de traitement associé à la date de mise en place, ainsi que le nombre d'animaux abattus ou mis en place (associé à un taux de mortalité cumulé sur le lot) et un poids moyen en fin de lot. Le dénominateur de l'ALEA à l'échelle de l'organisation de production, nécessite de recueillir le poids total abattu au niveau de l'organisation de production. Pour un calcul de l'ALEA à l'échelle du lot, il est nécessaire de recueillir le nombre d'animaux abattus ou mis en place (associé à un taux de mortalité cumulé sur le lot) et un poids moyen en fin de lot.

Pour le calcul de l'IFTA « exact », les données à recueillir sont pour chaque traitement, un code d'identification du traitement afin de déterminer le nombre de molécules à comptabiliser, la durée du traitement (ou date de début et fin de traitement), la durée du lot (ou date de mise en place et date d'abattage). Si la durée du traitement n'est pas disponible, il a été défini qu'il serait possible de calculer un IFTA « estimé » en attribuant la durée forfaitaire de traitement utilisées par l'Anses (cf. base de données OPEN DATA).

2. RESULTATS

Lors de la phase d'inventaire des indicateurs possibles, les informations de 361 lots en filière volailles de chair (213 lots de poulets, 65 lots de

dindes, 50 lots de canards à rôti et 29 lots de pintades/cailles) et 148 lots en filière œufs de consommation (26 lots de poulettes et 122 lots de poules pondeuses) ont été collectées sur les deux ans d'enquête. L'objet de cet article étant le dispositif et non les usages en eux-mêmes, les résultats détaillés des résultats obtenus lors de cette phase d'inventaire, ne sont pas présents ici. Bien que les taux de retours de ces enquêtes postales auprès des éleveurs soient faibles, les résultats obtenus ont permis de discuter, avec le groupe de travail assurant le suivi du projet, des indicateurs de suivi des usages d'antibiotiques les plus pertinents à retenir pour le réseau RefA²vi, au regard à la fois des recommandations nationales et européennes, ainsi que l'utilisation de ces indicateurs de référence par les acteurs de terrain.

Le test des calculs des indicateurs conduit dans le cadre de la phase pilote a permis de montrer la faisabilité du calcul de l'ALEA « exact » ou « déduit », ainsi que le nombre de jours de traitement par animal sorti, et le nombre de traitements par animal sorti. Le calcul de l'IFTA s'avère en revanche plus compliqué à réaliser. En effet, si le numérateur est accessible, le dénominateur « durée d'élevage » est en revanche indisponible pour deux des quatre organisations de production incluses dans la phase pilote, ce qui obligerait à utiliser une durée d'élevage standardisée qui ne permettrait d'obtenir qu'un IFTA « estimé ».

Dans le fonctionnement du réseau RefA²vi envisagé par le groupe de travail, les données informatisées enregistrées par les organisations de production avicoles, seront envoyées à l'interprofession pour anonymisation et agrégation, puis l'ITAVI sera chargé des calculs des indicateurs d'exposition suivant

une méthode éprouvée définie avec l'Anses. L'ITAVI assurera également l'animation du réseau (publication des résultats, organisation des réunions du comité de pilotage). Les engagements des parties prenantes seront définis dans une charte d'adhésion.

CONCLUSION

Au final, le groupe de travail a souhaité que le réseau RefA²vi produise une référence par espèce (en priorité poulet et dinde), tous les trimestres sur les indicateurs : « nombre de jours de traitement par animal sorti » (qui est une approximation du nombre de DDD_{vet}), « nombre de traitements par animal sorti » (qui est une approximation du nombre de DCD_{vet}) et « ALEA ». L'IFTA a été écarté pour le moment étant donné les approximations de calcul nécessaires.

Les grandes lignes du cahier des charges auquel le groupe de travail a abouti sont au final les suivantes : le réseau RefA²vi sera animé par l'ITAVI avec l'appui méthodologique de l'Anses. L'institut assurera l'exploitation des données et la publication des références produites. Les données brutes reçues par le réseau seront gérées par l'interprofession Volailles de chair qui s'assurera de leur anonymisation avant leur exploitation par l'ITAVI.

REMERCIEMENTS

Le projet RefA²vi a reçu le soutien financier du plan Ecoantibio 2017. Les auteurs remercient l'ensemble des éleveurs ayant participé, les organisations de production, ainsi que l'ensemble des membres du groupe de travail.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam C., 2017. In : Etude des pratiques en antibiothérapie dans la filière poulet de chair Label Rouge, thèse de Doctorat en Epidémiologie (Université de Clermont-Ferrand edit)
- Anses, 2018. In : Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2017 (Anses edit), pp104
- Chauvin C. Bouvarel I., Beloeil P.A., Orand J.P., Guillemot D., Sanders P., 2005. Vet. Res., 36: 13-25
- Chauvin C. Querrec M., Perrot A., Guillemot D., Sanders P., 2008. J. Vet. Pharm. and Ther, 31(4): 301-311.
- Chauvin C., 2009. J. Vet. Pharm. and Ther, 32(suppl.1): 111-112.
- EMA-ESVAC, 2016. In: Defined daily doses for animals (DDDvet) and defined course doses for animals (DCDvet) (EMA edit), pp 29.
- Fortun-Lamothe, L., Courtadon, H., Croisier, A., Gidenne, T., Combes, S., Le Bouquin S., et Chauvin C., 2011. Proceeding of 14èmes Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, France, 22-23/11/11 :4p.

LES ADDITIFS ALIMENTAIRES PEUVENT-ILS AUGMENTER L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES ANTIBIOTIQUES A LARGE SPECTRE CONTRE *E. COLI* ?

Benedetta Tugnoli¹, Giulia Giovagnoni², Andrea Toschi², Andrea Piva^{1,2}, Ester Grilli^{1,2}

¹ VETAGRO S.p.A., via Porro 2 - 42124 REGGIO EMILIA (ITALIE)

² UNIVERSITE DE BOLOGNE, DIMEVET, via Tolara di Sopra 50 - 40064 OZZANO
EMILIA, BO (ITALIE)

benedetta.tugnoli@vetagro.com

RÉSUMÉ

Le but de cette étude était de vérifier si des additifs alimentaires non antibiotiques, à savoir des acides organiques et des composés de nature identique, pouvaient améliorer l'activité antimicrobienne des antibiotiques à large spectre contre *E. coli*. À cette fin, l'activité antimicrobienne de l'amoxicilline, de la colistine et de la néomycine a été testée contre huit souches d'*E. coli* isolées du foie de poulet de chair, seules ou en combinaison avec de l'acide sorbique (SOR) et du thymol (THY). La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été trouvée avec la méthode de micro-dilution testant: antibiotiques (128-0,5 mg / L), SOR (100-0,78 mM) et THY (6,25-0,05 mM) et la combinaison de SOR + THY (dans un rapport 2:1, de 6,25 mM + 3,12 mM à 0,10 mM + 0,05 mM). Après 24h à 37 ° C, l'inhibition de la croissance a été évaluée par une mesure d'absorbance (630 nm) et les données ont été analysées avec une analyse de variance à un facteur (one way-ANOVA, p <0,05). Toutes les souches étaient résistantes à l'amoxicilline jusqu'à 128 mg / L et sensibles à la colistine jusqu'à 0,5 mg / L. Pour la néomycine, deux souches étaient inhibées à 64 mg / L et quatre souches à 32 mg, les souches restantes étaient résistantes. Les valeurs de CMI pour THY et SOR seuls étaient respectivement de 3,12 et 50 mM, mais lorsque combinées, la CMI était réduite respectivement de 2 et 16 fois (1,56 et 6,25 mM). SOR + THY (1,56 mM + 0,78 mM) a augmenté l'activité antimicrobienne de la NEO de 2 et 3 fois (six souches) et de 10 fois (une souche) et a amélioré l'activité antimicrobienne de l'AMOX jusqu'à 70% dans une souche.

En conclusion, l'acide sorbique et le thymol ont inhibé la croissance d'*E. coli*, montrant un fort effet synergique et leur combinaison a pu améliorer l'activité antimicrobienne des antibiotiques couramment utilisés pour le traitement de la colibacillose chez les volailles.

ABSTRACT

Can feed additives increase the antimicrobial activity of wide-spectrum antibiotics against *E. coli*?

Aim of this study was to test whether non-antibiotic feed additives, i.e. organic acids and nature identical compounds, can improve the antimicrobial activity of broad-spectrum antibiotics against *E. coli*. For this purpose, the antimicrobial activity of amoxicillin, colistin and neomycin was tested against eight strains of *E. coli*, isolated from broiler liver, alone or in combination with sorbic acid (SOR) and thymol (THY). The minimal inhibitory concentration (MIC) was found with micro-dilution method testing: antibiotics (128-0.5 mg/L), SOR (100-0.78 mM), and THY (6.25-0.05 mM) and the combination of SOR+THY (in a 2:1 ratio, from 6.25mM+3.12mM to 0.10mM+0.05mM). After 24h at 37°C, growth inhibition was evaluated by absorbance measurement (630 nm) and data were analyzed with ANOVA (P<0.05). All the strains were resistant to amoxicillin up to 128 mg/L and sensitive to colistin until 0.5 mg/L. For neomycin, two strains were inhibited at 64 mg/L and four strains at 32 mg/L, the remaining strains were resistant. MIC values for THY and SOR alone were 3.12 and 50 mM, respectively, but when in combination the MIC was reduced by 2 and 16-fold respectively (1.56 and 6.25 mM). SOR+THY (1.56mM+0.78mM) increased NEO activity by 2 and 3-fold (six strains) and by 10-fold (one strain) and improved AMOX activity up to 70% in one strain.

In conclusion, sorbic acid and thymol inhibited the growth of *E. coli*, showing a strong synergistic effect and their combination was able to improve the antimicrobial activity of antibiotics commonly used for the treatment of colibacillosis in poultry.

INTRODUCTION

L'*E. coli* est une bactérie à Gram négatif en forme de bâtonnet appartenant à la famille des Enterobactériales, résistante à l'environnement et normalement présente dans le tractus intestinal des animaux, y compris les volailles. C'est l'un des agents pathogènes les plus fréquents dans cette catégorie, provoquant une colibacillose et une colisepticémie. Les pertes économiques peuvent commencer au premier jour de la vie du poulet et durer toute la vie car l'infection à *E. coli* est présente dans tous les groupes d'âge et types de poulets, avec une prévalence particulièrement élevée chez les poules pondeuses (Kabir, 2010; McMullin, 2004; Singer et Hofacre, 2004). La prévention est le meilleur moyen de lutter contre l'infection par *E. coli*, en particulier par le biais de mesures environnementales ou de vaccination. Le traitement de la colibacillose repose principalement sur des antibiotiques, tels que les sulfamides potentialisés, les aminopénicillines, les tétracyclines, la colistine et les aminosides (Agunos et al., 2012), bien que la résistance aux antibiotiques soit répandue dans le monde entier et représente un problème mondial.

Dans un contexte mondial de réduction de l'utilisation d'antibiotiques et de l'augmentation actuelle de la résistance aux antimicrobiens bactériens, les additifs alimentaires aux propriétés antimicrobiennes constituent une stratégie utile. Dans cette optique, les acides organiques (OA) et les composés de nature identique (NIC) peuvent constituer un nouveau moyen de contrôler les infections bactériennes, améliorant ainsi la santé et les performances de croissance des animaux. Leur activité antimicrobienne est bien connue du fait de l'altération du pH bactérien et de la formation de pores dans les membranes bactériennes (Grilli et Piva, 2012).

Sur la base des propriétés antimicrobiennes d'OA et de NIC, le but de cette étude était d'évaluer si la combinaison d'OA et de NIC avec des antibiotiques classiques pour la volaille pourrait augmenter l'activité antimicrobienne des antibiotiques contre les souches de *E. coli* in vitro.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Mise en place de l'expérience

Huit souches d'*E. coli* ont été isolées de cas cliniques (foies de poulets) et ont été cultivées dans un bouillon d'infusion de cœur et cerveau (BHI; Oxoid) au cours de deux incubations ultérieures de 24 h avant le dénombrement sur gélose BHI à 37 ° C dans des conditions aérophiles. Les antibiotiques de cette étude étaient l'amoxicilline (AMOX), la colistine (COL) et la néomycine (NEO) d'Alpha Aesar (Thermo Fisher (Kandel) GmbH), tandis que l'acide sorbique (SOR) et le thymol (THY) ont été achetés à Sigma -Aldrich Merck (Sigma-Aldrich Srl, Italie). Des solutions mères

de chaque substance ont été préparées dans du BHI, ajustées à pH 6,5 et stérilisées par filtration avec une taille de pores de la membrane de 0,22 µm. L'activité antimicrobienne de chaque substance a été déterminée à l'aide d'une méthode de dilution en bouillon dans des plaques de microtitration à 96 puits avec 10⁵ UFC / mL de chaque souche. Après 24 h à 37 ° C, l'inhibition de la croissance a été évaluée par une mesure d'absorbance à 630 nm (Varioskan Lux, Thermo Fisher, Italie). Pour chaque substance la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été définie comme la concentration la plus faible de chaque composé capable de donner une absorbance = 0.

Les tests antimicrobiens ont été réalisés en trois étapes :

1) Composés individuels

Les souches de *E. coli* ont été testées avec une gamme de concentrations (dilutions de 2 fois) d'AMOX, de COL et de NEO (à 128-0,5 mg / L), de SOR (à 100-0,78 mM) et de THY (à 6,25-0,05 mM).

2) Combinaison d'acide sorbique et de thymol

Les souches d'*E. coli* ont été testées avec une combinaison de SOR + THY (dans un rapport de 2:1, choisi sur la base d'études préliminaires) à partir de 6,25 mM + 3,12 mM à 0,10 mM + 0,05 mM.

3) Combinaison antibiotique + acide sorbique + thymol

Les souches d'*E. coli* ont été testées avec la combinaison de SOR + THY (dans un rapport de 2:1, de 6,25 mM + 3,12 mM à 0,10 mM + 0,5 mM) ajoutées à AMOX (128, 64, 32 mg / L) ou NEO (64, 32, 16 mg / L).

1.2. Analyse statistique

Chaque plaque a été analysée en double et les données ont été analysées avec une analyse de variance à un facteur (one way-ANOVA) et des différences considérées comme significatives à $p < 0,05$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les souches d'*E. coli* ont d'abord été testées avec des antibiotiques, de l'acide sorbique ou du thymol individuellement.

En ce qui concerne les antibiotiques, les huit souches ont montré une sensibilité variable. Comme le montre le tableau 1, toutes les souches étaient résistantes à l'AMOX jusqu'à 128 mg / L. Concernant la NEO, deux souches étaient inhibées à 64 mg / L et quatre souches à 32 mg / L, tandis que les autres étaient résistantes. Au contraire, toutes les souches étaient sensibles à la COL avec une valeur de CMI autour de 0,5-1 mg / L.

Comparativement aux antibiotiques, les souches d'*E. coli* ont présenté une réponse plus homogène à l'acide sorbique et au thymol. Pour les huit souches d'*E. coli*, les valeurs de CMI pour le SOR et le THY seuls étaient respectivement de 50 et 3,12 mM (Figure 1), mais lorsque SOR et THY étaient combinés, la CMI était réduite respectivement de 16 et 2 fois (3,12 mM et 1,56 mM). Par conséquent, la combinaison de SOR et de

THY a eu un effet additif permettant de réduire la CMI des deux composés lorsqu'ils ont été testés ensemble. En effet, l'activité antimicrobienne de l'OA et des plantes peut être améliorée en les combinant. Dans une série de travaux, notre groupe de recherche a montré une efficacité marquée de l'OA et des plantes, lorsqu'ils sont utilisés ensemble, *in vitro* contre *Salmonella* et *Campylobacter*: des expériences menées pour tester l'activité antimicrobienne de l'OA et NIC par la méthode de la concentration inhibitrice minimale ont révélé que lorsque les OA sont combinés à des composés identique nature, tels que les monoterpènes, ils sont plus efficaces contre *Salmonella typhimurium* ou *Campylobacter jejuni* que lorsqu'ils sont testés seuls, supportant fortement une action synergique de l'OA et des plantes (Grilli et Piva, 2012; Grilli et al., 2013). Le mécanisme d'action proposé à la base de la synergie entre l'OA et les NIC implique l'effet perméabilisant de ces derniers qui, en modifiant la membrane bactérienne, faciliteraient à terme l'entrée de l'OA et donc l'action antimicrobienne (Grilli et Piva, 2012).

La troisième étape de l'étude comprenait l'addition de la combinaison acide sorbique + thymol à des antibiotiques tels que l'amoxicilline et la néomycine, ce qui n'était pas efficace seul contre les souches de *E. coli*, dans le but d'améliorer leur efficacité.

La combinaison SOR + THY à 1,56 + 0,78 mM a amélioré l'activité antimicrobienne de l'AMOX à la concentration la plus faible testée (32 mg / L) et amélioré l'activité jusqu'à 70% dans une souche et, comme le montre la figure 2-A, pour quatre souches sur huit cela a permis :

- la réduction moyenne de 57% de la croissance bactérienne par rapport à la même concentration d'AMOX seule
- la réduction moyenne de la croissance de 30% des bactéries par rapport à la même concentration de SOR + THY seuls (différence non statistiquement significative)

Encore une fois (Fig. 2-B), la même combinaison de SOR + THY (à 1,56 + 0,78 mM) ajoutée à la néomycine à 16 mg / L a été efficace dans toutes les souches, provoquant :

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agunos A., Léger D., Carson C., 2012. Can. Vet. J., (53), 1289–1300.
- Akond MA., Hassan S.M.R., Alam S., Shirin M., 2009. Am. J. Environ. Sci., (11). 47-52.
- Bearson S., Bearson B., Foster J.W. (1997). FEMS Microbiol. Lett., (147), 173-180.
- Grilli E., Piva A., 2012. In: On-Farm Strategies to Control Foodborne Pathogens. Editors: T.R. Callaway & T.S. Edrington, pp 183-210.
- Grilli E., Vitari F., Domeneghini C., Palmonari A., Tosi G., Fantinati P., Massi P., Piva A., 2013. J Appl Microbiol., (114), 308-317.
- Kabir S.M.L. 2010. Int. J. Environ. Res. Public Health, (7), 89-114.
- McMullin, 2004. A Pocket Guide to Poultry Health and Disease. 5M books Ed. ISBN: 095301505X;
- Shtylla T., Circella E., Madio A., Di Paola G., Çabeli P., Kumbe I., Kika A., Camarda A., 2009. Ital. J. Anim. Sci., (8), 771-774.
- Singer R.S., Hofacre C.L., 2006. Avian Dis. (50), 161-172.
- van den Bogaard E.A., London N., Driessen C., Stobberingh E.E., 2001. J. Antimicrob. Chemother., (47), 763-771.

- la réduction moyenne de 56% de la croissance bactérienne par rapport à la même concentration de NEO seule
- la réduction moyenne de la croissance de 47% des bactéries par rapport aux mêmes concentrations de SOR + THY seuls.

Ces résultats montrent que la combinaison d'acide sorbique et de thymol avec des antibiotiques à large spectre, tels que l'amoxicilline et la néomycine, peut augmenter l'efficacité de ces derniers. Le mode d'action de l'amoxicilline et de la néomycine implique l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne et de la synthèse des protéines, et plusieurs cas de résistance d'*E. coli* à ces antibiotiques ont été rapportés dans le monde entier (Akond et al., 2009; Shtylla et al., 2010; van den Bogaard et al., 2001). Nos résultats suggèrent que l'acide sorbique et le thymol peuvent fonctionner avec l'amoxicilline et la néomycine, peut-être grâce à l'action perméabilisante du thymol sur la paroi cellulaire bactérienne, qui peut favoriser l'entrée d'antibiotiques ou inhiber les pompes à efflux ou d'autres mécanismes de résistance. D'autre part, l'acide sorbique peut altérer le bilan énergétique car la bactérie consomme de l'ATP afin de pomper les protons et de rétablir le pH du cytosol en réponse à la dissociation de l'acide à l'intérieur de la cellule, tandis que l'anion peut être toxique, perturbant ainsi la synthèse de l'ADN et les fonctions métaboliques, et augmentant la pression cellulaire osmotique (Bearson et al., 1997).

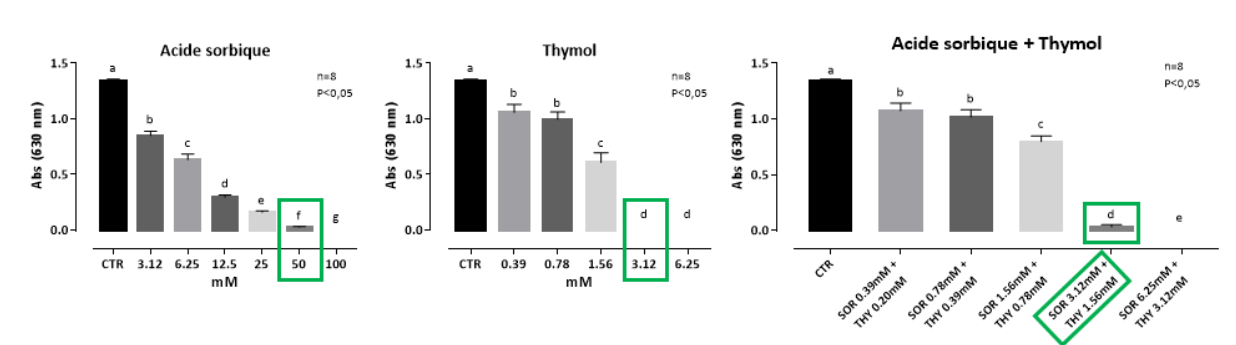
CONCLUSION

Dans cette étude, l'acide sorbique et le thymol inhibaient efficacement la croissance d'*E. coli*, montrant un fort effet synergique. De plus, la combinaison d'acide sorbique et de thymol a pu améliorer l'activité antimicrobienne des antibiotiques couramment utilisés pour le traitement de la colibacillose chez les volailles.

Tableau 1. Distribution des valeurs de CMI (mg / L) d'amoxicilline, de néomycine et de colistine contre 8 isolats *d'E. coli*

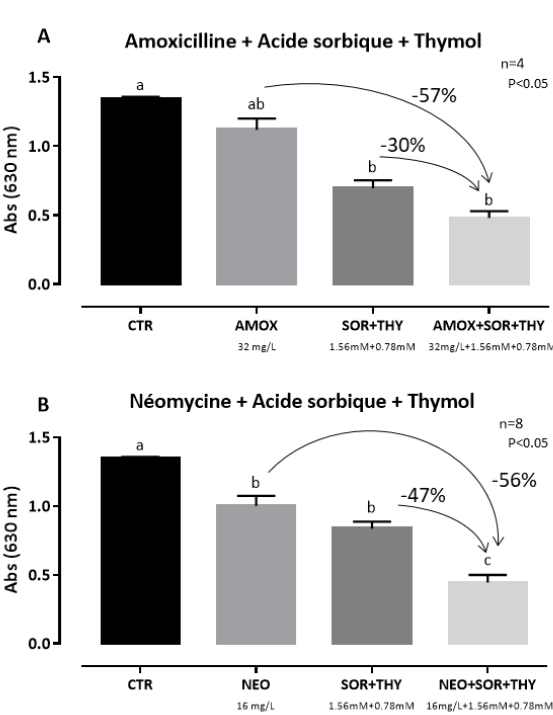
	mg / L									
	> 128	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5
AMOX	8									
NEO	2		2	4						
COL									2	6

Figure 1. Croissance d’*E. coli* après 24 h en présence d’acide sorbique, de thymol ou de la combinaison d’acide sorbique + thymol (dans un rapport de 2:1).



La croissance bactérienne est présentée en valeur d'absorbance (630 nm) et les valeurs sont moyennes \pm SEM de 8 souches. Les valeurs CMI sont mises en surbrillance avec des cadres verts. Les données ont été analysées avec une analyse de variance à un facteur (one way-ANOVA) les colonnes avec des lettres différentes étaient significativement différentes ($p < 0,05$).

Figure 2. Croissance d’*E. coli* après 24 h en présence de l'association acide sorbique + thymol avec de l'amoxicilline (A) et de la néomycine (B).



La croissance bactérienne est présentée en valeur d'absorbance (630 nm) et les valeurs sont les moyennes \pm SEM de 4 souches (A) et de 8 souches (B). Les données ont été analysées avec une analyse de variance à un facteur (one way-ANOVA) et les colonnes avec des lettres différentes étaient significativement différentes ($p < 0,05$).

EFFET DE SOLUTIONS ALTERNATIVES A UN ANTICOCCIDIEN SUR LES PERFORMANCES DU POULET STANDARD LORS D'UN CHALLENGE COCCIDIOSE : ETUDE DE LA CROISSANCE, DES MARQUEURS DE LA COCCIDIOSE ET DE LA CAPACITE DE RECUPERATION

**Auteurs : Barbier Elodie¹, Destombes Nicolas², Roulleau Samuel¹, Roche Ségolène²,
Chevalier Denis¹, Goizin Guillaume¹**

¹ MG2MIX, Zone d'activité de la Basse Haye, 35220 Chateaubourg France

² JEFO, 2 rue Claude Chappe, Espace Performance, La Fleuriaye, BP50776, 44481
Carquefou Cédex France

e.barbier@mg2mix.fr

RESUME

Dans le cadre de l'évolution des pratiques d'élevage visant à favoriser l'utilisation de substances naturelles, cette étude a pour but d'évaluer 3 solutions alternatives au Narasin® dans la gestion des conséquences de la coccidiose en poulets de chair. 3048 poussins ROSS 308 ont été assignés à 5 traitements alimentaires de J7 à J33: aucun additif pour les régimes Témoin non inoculé (TNI) et Témoin inoculé (TI), 60 g/t de Narasin® (Na), 1 kg/t d'acides organiques et extraits de plantes micro encapsulés (AOM+EPm), 500 g/t d'extraits de plantes (EP) et 1 kg/t de tanins de châtaigniers (TC). A l'exception des oiseaux du TNI, tous ont été infestés par 75 000 oocystes d'*Eimeria acervulina* et 7 500 oocystes d'*E.tenella* à J10, via l'eau de boisson. Les données zootechniques ont été relevées par phase alimentaire (à J6 ; 20 et 33) et le comptage de l'excrétion d'oocystes et les notations des lésions intestinales et caecales ont été réalisées après l'infestation (respectivement à J9 ; J16 ; J24 et J30 et à J18 et J32). Le taux de récupération du GMQ a été calculé : (TNI – Traitement) / (TNI-TI). Les mesures statistiques ont été analysées avec le logiciel R® par une ANOVA et traitées au seuil de risque $\alpha < 5\%$. Durant la phase prépatente (de J10 à J16), on observe une dégradation des performances avec +3,3% d'indice de consommation (IC) dû au challenge coccidien. Durant la période post-infection (de J20 à J33), la solution AOM+EPm a permis la récupération totale de l'IC et partielle du GMQ ($p < 0.05$). La solution AOM+EPm présentait les scores lésionnels les plus faibles durant l'infestation face aux autres solutions alternatives ($p < 0.05$). L'excrétion d'oocystes avec la solution AOM+EPm a diminué sur le long terme, favorisant la récupération. Ces résultats montrent que la solution AOM+EPm peut être envisagée dans la réduction de l'utilisation des anti-coccidiens, en limitant l'impact négatif des protozoaires sur les performances du poulet de chair.

ABSTRACT

Effect of alternative solutions to coccidiostat on broiler zootechnical performances under a coccidiosis challenge: study of the growth, coccidiosis markers and recovery ability

In the context of new husbandry practices aiming at improving the use of natural substances, the goal of this study is to evaluate 3 alternative solutions to Narasin® in the control of the consequences of broiler chicken coccidiosis. 3048 ROSS 308 chicks were allocated to 5 dietary treatments from D7 to D33 : no additive for the Non-Infested Group (TNI) and Infested Group (TI), 60 g/t of Narasin® (Na), 1 kg/t of organic acids and micro-encapsulated plant extracts (AOM+EPm), 500 g/t of plant extracts (EP) and 1 kg/t of chestnut tannins (TC). Apart from the TNI birds, all the birds were infected with 75,000 *E.acervulina* and 7,500 *E.tenella* sporulated oocysts at 10 days in drinking water. The zootechnical data were measured according to dietary period (D6 ; D20 and D33) and the oocyst faecal excretion and the intestinal and caecal lesions were performed after infestation (respectively at D9 ; D16 ; D24 and D30 and at D18 and D32). The average daily gain (ADG) recovery rate was calculated as : (TNI – Treatment) / (TNI – TI). The statistical analysis were performed according to the R® software with ANOVA (significance level : $\alpha < 5\%$).

During the prepatent period (from D10 to D16), the coccidian challenge did have a negative impact on performances (+3.3% of FCR). During the post-infective period (from D20 to D33), the treatment AOM+EPm allowed the total recovery of the FCR, and a partial recovery of ADG ($p < 0.05$). The lowest score were observed for the AOM+EPm group ($p < 0.05$). The oocyst excretion decreased in the same group, promoting the recovery. These results show that the AOM+EPm alternative could be considered as a solution in the reduction of the use of chemical coccidiostats, while limiting the negative impact of protozoas on the broiler chicken performances.

INTRODUCTION

La demande en viande de poulet est en croissance dans le monde, imposant pour les élevages de rester efficaces et rentables. Cette compétitivité peut être impactée par des maladies pouvant menacer l'efficacité alimentaire et donc économique en élevage de chair. Parmi ces pathologies, la coccidiose est la première maladie des volailles en France et concerne près de 30% des déclarations aux services vétérinaires, avec des préjudices estimés autour de 50 millions d'euros par an (Souillard et al., 2007). La coccidiose peut entraîner des baisses de performance (IC, GMQ, hétérogénéité) dès les premiers signes sub-cliniques. Les parasites responsables de cette maladie sont les coccidies, protozoaires du genre *Eimeria*. Elles infestent le système digestif de l'hôte et prolifèrent dans les cellules épithéliales de l'intestin ou des caeca selon leur espèce. Il existe sept espèces de coccidies spécifiques de *Gallus gallus* (poules et poulets) dont trois très présentes en élevage : *E. acervulina*, *E. maxima*, et *E. tenella* (Guérin et al., 2011). Le contrôle de la coccidiose aviaire passe habituellement par la supplémentation de l'aliment avec des additifs coccidiostatiques. Il en existe deux grands types : les ionophores (obtenus à partir de micro-organismes producteurs de la molécule par incubation, comme le narasin) et les chimiques (obtenus par synthèse inorganique, comme le decoquinat). Cependant, l'utilisation de molécules chimiques en élevage est de moins en moins bien perçue par les consommateurs et l'utilisation fréquente de ces molécules peut favoriser le développement de souches de coccidies résistantes (Chapman et Jeffers, 2014). La recherche de solutions alternatives est donc nécessaire afin de répondre à ces problématiques. Parmi celles-ci, les vaccins peuvent être utilisés pour des animaux au cycle de production long qui laissent le temps de développer une complète immunité (Blake et Tomley, 2014).

De nombreux additifs à base d'acides organiques, de curcuma (Scheurer et al., 2013), d'artémisine (Almeida et al., 2014) ou de tanins (Rathinam et al., 2014) ont démontré leur efficacité pour les critères secondaires d'évaluation des additifs coccidiostatiques. Cet article présente l'efficacité de trois de ces types d'alternatives.

1. MATERIEL ET METHODES

L'objectif de cette étude est d'évaluer des alternatives au Narasin® dans la gestion des conséquences de la coccidiose en poulets de chair, notamment sur leurs performances.

1.1 Animaux

3048 poussins ROSS 308 de 1 jour (50% mâles / 50% femelles) ont été équitablement répartis dans 24 cases de 6m² (densité de 21,2 sujets/m²). Les animaux

étaient logés sur litière en copeaux de bois dans un bâtiment statique de 400m². L'accès à l'eau et la nourriture se fait *ad libitum*. Un programme standard de température et de luminosité a été suivi.

1.2 Aliments

Les aliments étaient formulés avec du blé, maïs, soja et huile de palme selon les normes nutritionnelles classiques. Les vitamines, minéraux, acides aminés et les différents additifs testés ont été incorporés via un prémix afin d'atteindre les besoins.

De 1 à 6 jours d'âge, les poussins ont reçu le même aliment démarrage (fine miette) ne contenant aucun coccidiostatique (21% de protéine brute, 3,0% de cellulose brute et 4,2% de matière grasse, EM de 3000 kcal/kg). A partir de 7 jours d'âge et jusqu'à l'abattage, les poulets ont été assignés à cinq traitements alimentaires iso-énergétiques et iso-protéiques sous forme de miettes grossières (20,3% PB, 3,0% de CB et 5,4% MG, EM de 3 150 kcal/kg), différant par leurs additifs coccidiostatiques : aucun additif coccidiostatique pour les régimes Témoin non inoculé (TNI) et Témoin inoculé (TI), 60g/T de Narasin® (Na), 1 kg/t d'acides organiques et extraits de plantes micro encapsulés (AOM+EPm), 500 g/t d'extraits de plantes (EP) et 1 kg/t de tanins de châtaigniers (TC).

1.3 Protocole d'infestation

A l'exception des oiseaux du TNI, tous ont été infestés par 75 000 oocystes d'*Eimeria acervulina* et 7 500 oocystes d'*E. tenella* à J10 (souches ANSES), via l'eau de boisson. Les animaux ont été assoiffés pendant une heure et demi afin de favoriser la consommation d'eau contenant les oocystes. Un colorant bleu a été inclus dans l'eau contenant les oocystes afin de vérifier le taux d'animaux ayant bu l'inoculum (sur 200 animaux).

1.4 Mesures

Les aliments et les animaux ont été pesés par case à J6, J20 et J33. Ces mesures ont permis d'établir le poids moyen des poulets (PM), le gain moyen quotidien (GMQ) et l'indice de consommation (IC). Le taux de récupération du GMQ a été calculé de la façon suivante : (TNI – Traitement) / (TNI-TI). Les morts ont été ramassés chaque jour et pesés individuellement. Ils sont pris en compte dans le calcul des indices. Le comptage de l'excrétion d'oocystes a été réalisé à J9 ; J16 ; J24 et J30. Les fèces ont été recueillies via un système Elanco box® placé dans chaque case et le comptage s'est fait selon la méthode de Mac Master. Les notations des lésions intestinales et caecales ont été réalisées à J18 et J32, selon la méthode de Johnson et Reid (1970) (échelle d'indice lésionnel allant de 0 à 4).

1.5 Analyse statistique

Toutes les mesures statistiques ont été analysées avec le logiciel R®. La normalité de la distribution de chaque variable a été vérifiée à l'aide du test de Shapiro-Wilk et l'analyse a consisté en une ANOVA (ou un test de Kruskal-Wallis si les données ne suivaient pas de loi normale) et traitées au seuil de risque $\alpha < 5\%$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

L'infestation par *E.tenella* et *E.acervulina* a été observée une heure après l'infestation par la coloration bleue de la langue de plus de 195 sujets sur 200, soit 97,5%. Elle a été confirmée par une dégradation des performances avec +3,3% d'indice de consommation (IC) et -8% de gain moyen quotidien (GMQ), durant la phase prépatente (de J10 à J16), voir figure 1.

Durant la période post-infection (de J20 à J33), la solution AOm+EPm a permis la récupération totale de l'IC équivalent au Témoin non inoculé (IC respectifs de 1,79 et 1,84), et partielle du GMQ (respectivement 77,3 g/j et 78,6 g/j) ($p < 0,05$), voir figure 2. En revanche, les solutions alternatives EP et TC n'ont pas montré d'effet face à un challenge coccidieux, aucun effet de récupération n'ayant été observé sur les performances.

Aucune excrétion fécale d'oocystes n'a été repérée avant le challenge coccidien à 9 jours d'âge. L'excrétion d'oocystes avec la solution AOm+EPm a diminué sur le long terme favorisant la récupération.

La solution AOm+EPm présentait les scores lésionnels intestinaux et caecaux les plus faibles durant la phase pré-patente face aux autres solutions alternatives, avec des scores respectifs de 1,25 et 1,13 ($p < 0,05$), voir figure 3. Cependant, les lésions ont été jugées faibles dans tous les régimes, ainsi, la dose utilisée de 75 000 *E.acervulina* et 7 500 *E.tenella*, qui a permis d'affecter les PM et IC, pourrait être augmentée afin d'observer plus de différences entre les différentes alternatives. Le choix de ces deux espèces a permis d'observer des effets néfastes de la

coccidiose à différents niveaux : perte d'appétit et désordre digestif avec *E. tenella* (caeca) et destruction des cellules épithéliales chargées de l'absorption des nutriments avec *E. acervulina* (duodenum), pouvant expliquer une dégradation de l'indice de consommation.

Les modes d'actions présumés de ces additifs testés sont peu connus. Celui des tanins semble être l'encapsulation de la paroi protéique protectrice du parasite, ce qui empêche sa sortie une fois ingéré (Fraquelli et al., 2015). L'hypothèse pour les alternatives basées sur l'utilisation de plantes riches en polyphénols réside dans un phénomène similaire qui pourrait avoir lieu avec la paroi protéique de l'oocyste ou pourrait déstructurer la membrane plasmique du parasite au stade oocyste voire à d'autres stades libres (Muthamilselvan et al., 2016). L'hypothèse du mode d'action de la solution AOm+EPm résiderait dans une amélioration de la réponse immunitaire de la muqueuse intestinale, notamment la production de cellules immunitaires dans la lamina propria (Bera et al., 2010), favorisant ainsi la récupération des animaux.

CONCLUSION

Ces résultats montrent que la solution AOm+EPm peut être une solution envisagée dans la réduction de l'utilisation des anticoccidiens chimiques, tout en limitant l'impact négatif des protozoaires sur les performances du poulet de chair. La coccidiose aviaire restera une pathologie importante et coûteuse, ainsi la recherche et le développement de solutions efficaces est un des enjeux pour la recherche appliquée dans les années à venir, tant pour l'industrie de la volaille que pour les autres productions animales touchées par ce parasite. La méthode de challenge utilisée dans cette étude sera un outil puissant d'évaluation des nouvelles solutions qui seront développées pour continuer à protéger efficacement les élevages de poulets de chair des pertes économiques induites par la pression coccidienne.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Almeida G.F.D., Thamsborg S.M., Madeira A.M.B.N., Ferreira J.F.S., Magalhães P.M., Filho L.C.D., Horsted K., Hermansen J.E., 2014. Parasitology, 141, 347-355.
- Bera A.K., Bhattacharya D., Pan D., Manna B., Bandyopadhyay S., Das S.K., 2010. Res. Vet. Sci., 89, 196-199.
- Blake D.P., Tomley F.M., 2014. Trends Parasitol. 30, 12-19.
- Chapman H.D., Jeffers T.K., 2014. Int. J. Parasitol.-Drug. 4, 214-217.
- Fraquelli C., Zanzani S.A., Gazzonis A.L., Rizzi R., Manfredi M.T., 2015. Small Ruminant Res. 126, 19-24.
- Guerin J.-L., Balloy D., Villate D., 2011. In : Maladies des volailles (France Agricole edit.).
- Muthamilselvan T., Kuo T.-F., Wu Y.-C., Yang W.-C., 2016. Evid-Based Compl. Alt. 2016, 1-19.
- Rathinam T., Gadde U., Chapman H.D., 2014. Vet. Parasitol. 202, 265-269.
- Scheurer W., Spring P., Maertens L., 2013. J. Appl. Poultry Res., 22, 591-599.
- Souillard R., Toux J., Le Bouquin S., Michel V., 2007. Le RNOEA: Réseau National d'Observations Épidémiologiques en Aviculture Pathologie aviaire en 2004. In : Bulletin Épidémiologique-AFSSA 24, 6-7.

FIGURES

Figure 1. Performances (IC et GMQ) lors de la phase prépatente (10 à 16 jours d'âge)

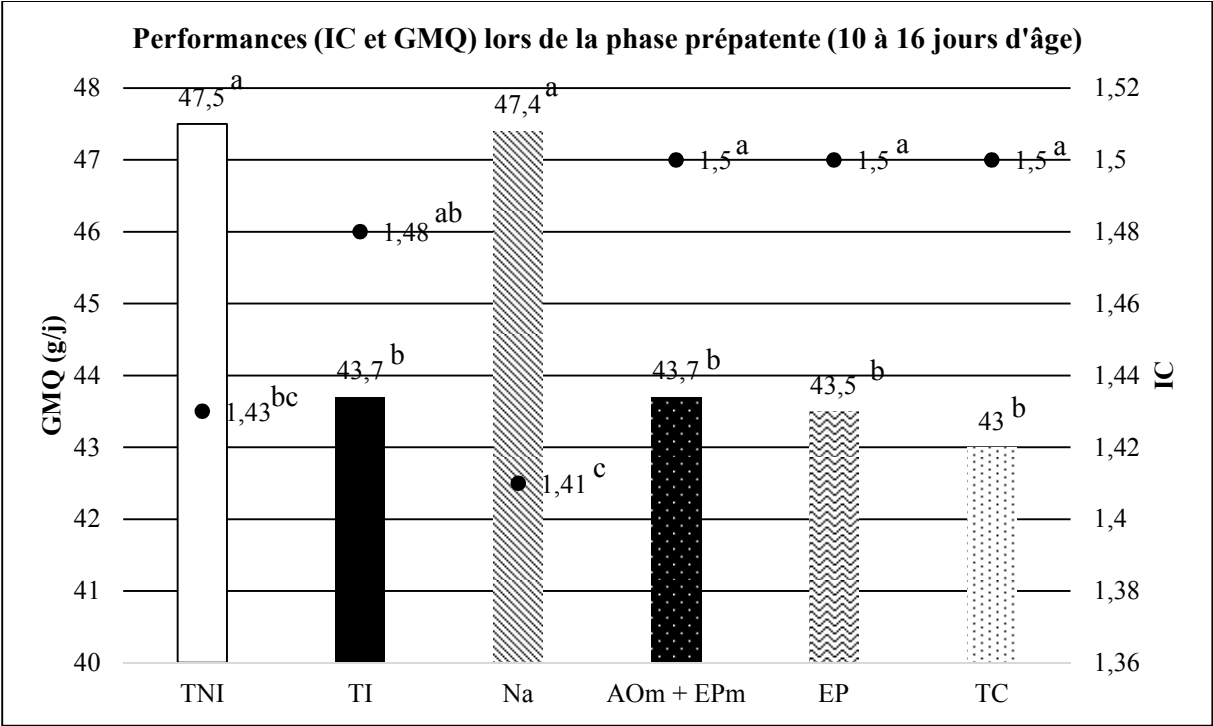


Figure 2. Performances (IC et GMQ) lors de la phase post-infection (20 à 33 jours d'âge)

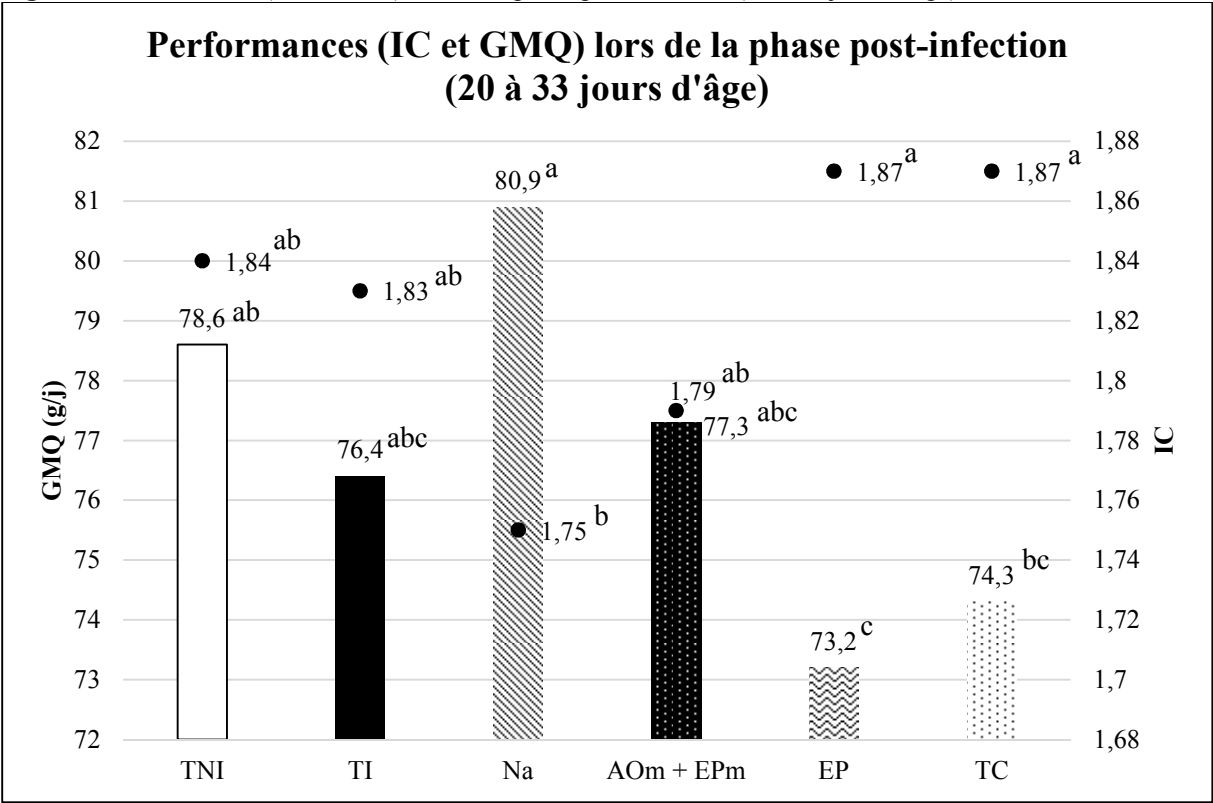
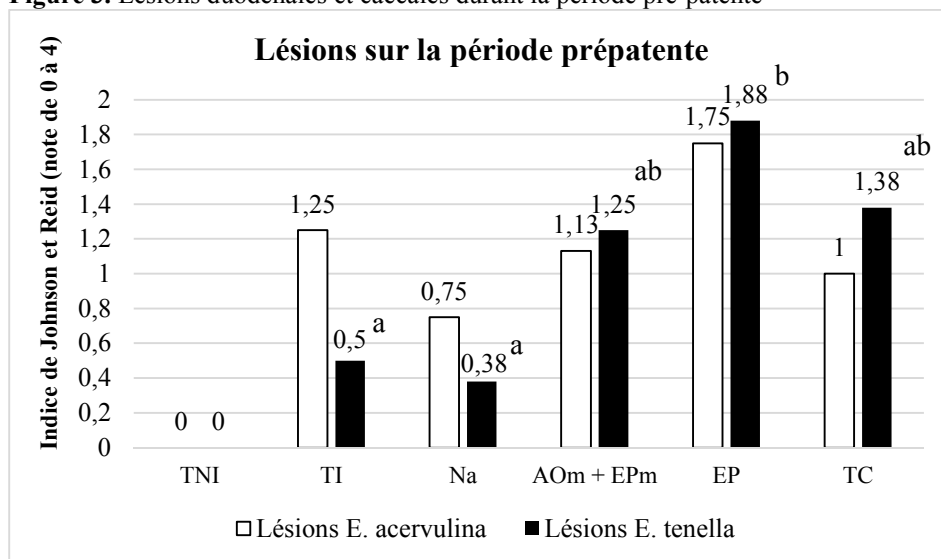


Figure 3. Lésions duodénales et caecales durant la période pré-patente



AUTOVACCIN A *ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE* EN DINDES : INTERET TECHNICO-ECONOMIQUE

Bernard Pauline¹, Castagnos Stéphanie², Thibault Eric², Planel René¹

¹FILI@VET – 7 rue des artisans – 79300 BRESSUIRE,

²CEVA BIOVAC - 4 rue Olivier de Serres – 49070 BEAUCOUZE

p.bernard@reseau cristal.fr

RÉSUMÉ

Ornithobacterium rhinotracheale participe aux syndromes respiratoires et locomoteurs nécessitant l'usage d'antibiotiques dans l'espèce dinde, or il n'existe aucun vaccin commercial utilisable aujourd'hui dans cette espèce. L'étude présentée vise à déterminer si l'utilisation d'un autovaccin à *Ornithobacterium rhinotracheale* permet d'améliorer les performances technico-économiques des lots de dindes et contribue à réduire le recours aux antibiotiques à visée respiratoire. L'échantillon d'étude est constitué de 50 lots de dinde mis en place entre 2013 et 2017 dont 27 lots vaccinés avec un autovaccin contenant *a minima* une souche d'*Ornithobacterium rhinotracheale* et 23 lots non autovaccinés. Les critères analysés sont les résultats technico-économiques et le coût des traitements antibiotiques par m² en séparant les antibiotiques à visée respiratoire des autres familles. Les résultats des critères technico-économiques entre les lots vaccinés et non vaccinés ne sont pas statistiquement différents mais une tendance à l'amélioration des poids moyens à l'abattoir et des GMQ sur les mâles est observée sur les lots autovaccinés, ainsi les marges poussin aliment par m² paraissent supérieures. Le coût antibiotique par m² et le coût antibiotique à visée respiratoire par m² sont statistiquement différents entre les deux groupes avec un gain moyen de 1,90€/m² en coût antibiotique total sur les lots autovaccinés. Dans cette étude, le gain sur le coût de l'antibiothérapie ainsi que le gain sur les poids et les retraits ont permis de compenser le coût de l'autovaccin et de la main d'œuvre pour le chantier de vaccination avec un gain moyen de 0,28€/m² sur les lots analysés. L'utilisation d'autovaccins à *Ornithobacterium rhinotracheale* s'inscrit pleinement dans la démarche de réduction des antibiotiques.

ABSTRACT

Ornithobacterium rhinotracheale autogenous vaccine in turkeys: technical and economic interest

Ornithobacterium rhinotracheale is one of the agents responsible for respiratory and locomotor syndromes. This bacteria requires the use of antibiotics in turkeys, and there is no commercial vaccine that can be used on this species.

The present study aims to determine whether the use of an *Ornithobacterium rhinotracheale* autogenous vaccine improves the performance of turkey flocks and helps reduce antibiotic use overall. This study is based on 50 flocks of turkeys bred between 2013 and 2017, among which 27 flocks were vaccinated with an autogenous vaccine containing at least one strain of *Ornithobacterium rhinotracheale* and 23 were unvaccinated.

The purpose of this analysis is to highlight the technical and economic results as well as the cost of antibiotic treatments per square meter.

The technical and economic results between the two groups are not statistically different. But we can observe an improvement of average weight and average daily weight gain at the slaughterhouse on the males.

Thus the breeder's margin per square meter appears to be improved on the vaccinated flocks.

The overall cost of antibiotherapy and respiratory antibiotics per square meter are statistically different between the two groups with an average gain of 1,90 € per square meter for the vaccinated flocks.

In this study, the profits described above are able to compensate the cost of autogenous vaccine as well as the related extra labour cost with an average gain of 0,28 € per square meter.

The use of *Ornithobacterium rhinotracheale* autogenous vaccines is fully in line with global expectations as regard as antibiotic reduction.

INTRODUCTION

Ornithobacterium rhinotracheale fait partie des germes d'intérêt dans l'espèce dinde. Il est le deuxième germe isolé après *Escherichia coli* tout organe confondu et représente 59,4% des germes respiratoires et 26% des germes articulaires isolés en production de dindes dans les laboratoires du réseau cristal en 2017, majoritairement entre 7 et 14 semaines d'âge.

Les lésions respiratoires observées à l'autopsie sont des pneumonies marquées associées à un œdème pulmonaire gélatineux caractéristique ainsi que des aérosacculites et trachéites. Les lésions de l'appareil locomoteur sont caractérisées par des ténosynovites et/ou arthrites uni ou bilatérales au niveau de l'articulation tibio-métatarsienne essentiellement (De Rosa 1996, Van Beek 1998, Van Empel 1999).

La mortalité engendrée par ce germe ainsi que les retards de croissance et les retraits à l'abattoir ont une incidence forte sur les résultats technico-économiques des lots et nécessitent régulièrement l'utilisation d'une antibiothérapie ciblée sur la base d'un antibiogramme. La vaccination avec un autovaccin contenant *a minima* une souche d'*Ornithobacterium rhinotracheale* a été mise en place pour 10 % des lots de dindes suivis par les vétérinaires du réseau cristal.

L'étude présentée vise à déterminer si l'utilisation d'un autovaccin à *Ornithobacterium rhinotracheale* permet d'améliorer les performances technico-économiques des lots de dindes et participe à réduire le recours aux antibiotiques.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Population d'étude

L'échantillon d'étude est constitué de 50 lots de dinde standard, mis en place entre 2013 et 2017 chez 7 éleveurs.

Les élevages ont été recrutés parmi les utilisateurs d'autovaccin à *Ornithobacterium rhinotracheale* CEVA BIOVAC. Parmi eux ont été sélectionnés ceux qui ont accepté de fournir les résultats technico-économiques des lots.

Dans chaque élevage, les lots ont été sélectionnés à partir de la date de début d'utilisation d'un autovaccin à *Ornithobacterium rhinotracheale*. Ainsi ont été analysés les trois à quatre lots précédant la mise en place de l'autovaccin dans chaque élevage et les trois à quatre premiers lots vaccinés. Ce qui représente 27 lots vaccinés avec un autovaccin à *Ornithobacterium rhinotracheale* et 23 lots non vaccinés. Cette méthode de sélection des lots permet de limiter les biais existants de par les différences de plan de prophylaxie ou de type de ventilation, par exemple, qui n'ont pas été renseignés dans cette étude.

Un seul lot a été exclu de l'étude avec un contexte sanitaire différent d'*Ornithobacterium rhinotracheale* et très impactant sur les critères analysés.

Deux organisations de productions distinctes sont représentées parmi ces éleveurs. Les souches de dindes n'ont pas été renseignées ni prises en compte dans cette étude.

1.2. Description de l'autovaccin

Dans tous les élevages, les dindes ont été vaccinées par voie sous-cutanée en une seule injection entre 3 et 5 semaines d'âge avec un autovaccin contenant *a minima* une souche d'*Ornithobacterium rhinotracheale*.

Ce sont des autovaccins huileux injectés en sous-cutané à raison de 0,5mL/sujet.

Les souches d'*Ornithobacterium rhinotracheale* ont été isolées au laboratoire suite à une autopsie dans un contexte clinique évocateur d'ornithobactériose à partir des poumons ou des articulations. Les souches isolées à partir de la trachée ne sont pas ou très rarement utilisées pour la fabrication d'un autovaccin, le portage trachéal d'*Ornithobacterium rhinotracheale* n'étant pas toujours à l'origine de la clinique observée.

Dans certains cas un ou deux *Escherichia coli* ont été ajoutés, en fonction du contexte clinique de l'élevage et des souches isolées. La mise en place de l'autovaccin dans ces élevages a été motivée par une clinique respiratoire simple dans 2/3 des cas et une clinique respiratoire et tendineuse dans 1/3 des cas. La vaccination a été réalisée dans tous les cas par une entreprise extérieure.

1.3. Critères quantitatifs analysés

1.3.1. Critères technico-économiques

Différents critères technico-économiques ont été relevés, en séparant les résultats des femelles de ceux des mâles, à savoir :

- Le poids moyen,
- Le GMQ ou Gain moyen quotidien,
- L'ICE ou Indice de consommation économique (poids total aliment/poids après retraits),
- L'IP : Indice de performance tel que $IP = ((GMQ * Viabilité économique)/(ICE*10))$, la viabilité économique correspondant au nombre de sujet après retrait divisé par le nombre de poussins payés multiplié par 100.
- Le pourcentage de retraits
- Le pourcentage de perte

1.3.2. Utilisation d'antibiotiques

L'utilisation d'antibiotiques a été évaluée en fonction des traitements antibiotiques réalisés en euros par m² pour chaque lot en séparant les antibiotiques à visée respiratoire en fonction des familles à partir de

Tracivet ®, logiciel de traçabilité des prescriptions vétérinaires. Les familles d'antibiotiques retenues sont les macrolides, les pénicillines et notamment l'amoxicilline, les tétracyclines, les sulfamides en association avec le triméthoprim et les polymyxines, notamment la colistine.

1.4. Analyse des résultats

Les résultats ont été analysés statistiquement à l'aide du logiciel R et des boîtes de dispersion par quartiles ont été réalisées pour les résultats significatifs.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Résultats technico-économiques

Les résultats des critères technico-économiques entre les lots vaccinés et non vaccinés avec un autovaccin à *Ornithobacterium rhinotracheale* ne sont pas statistiquement significatifs. Cependant une tendance à l'amélioration des performances des dindons vaccinés avec un autovaccin à *Ornithobacterium rhinotracheale* est observée dans cette étude. Les poids moyens des mâles sont supérieurs de 700g dans la population vaccinée avec une augmentation du GMQ de 4,22g. Les performances des femelles sont identiques entre les deux groupes.

Les résultats des critères ICE et IP sont identiques entre les deux populations.

Les pourcentages de retraits paraissent aussi moins importants et surtout moins aléatoires sur les lots vaccinés avec un autovaccin à *Ornithobacterium rhinotracheale*, avec un écart-type de 1,04 contre 1,36 sur les lots non vaccinés. Les pourcentages de perte totaux paraissent à l'inverse légèrement supérieurs dans la population vaccinée.

Ce résultat peut s'expliquer par le calcul du pourcentage de perte qui comprend toutes les mortalités du lot y compris les mortalités à 10 jours qui peuvent être très variables selon les lots. Le calcul du pourcentage de perte entre 6 et 18 semaines permettrait d'approcher plus précisément les mortalités liées à l'ornithobactériose le cas échéant, voire l'innocuité du vaccin dans les semaines qui suivent la vaccination.

On observe globalement une amélioration non significative des marges poussin aliment par m² de 0,35€/m² en moyenne sur les lots autovaccinés avec un autovaccin à *Ornithobacterium rhinotracheale* dans cette étude ($p > 0,05$).

2.2 Utilisation d'antibiotiques

Le coût global des médicaments vétérinaires (antibiothérapie, vaccins, autovaccins, produits nutritionnels, hygiène, etc.) en m² a tendance à diminuer de 0,43€/m².

Le coût antibiotique par m² et le coût antibiotique à visée respiratoire par m² sont statistiquement différents ($p=1,16.10^{-4}$) entre les deux groupes avec un gain moyen de 1,90€/m² en coût antibiotique total et de 1,28 €/m² en coût antibiotique à visée respiratoire sur les lots vaccinés avec un autovaccin à *Ornithobacterium rhinotracheale* (Figures 1 et 2).

De plus, la variabilité du coût antibiotique par m² des lots non vaccinés, est plus importante, écart-type de 1,29 contre 1,17 sur les lots autovaccinés et plus marquée sur le critère coût d'antibiotique à visée respiratoire par m², écart-type de 1,29 sur les lots non vaccinés contre 0,46 sur les lots vaccinés.

Quelques lots ont été traités avec un antibiotique à visée respiratoire malgré la vaccination avec un autovaccin à *Ornithobacterium rhinotracheale*.

Six lots ont nécessité l'usage de tétracyclines ciblé sur d'autres infections respiratoires sans suspicion clinique ou lésionnelle ni isolement d'*Ornithobacterium rhinotracheale*.

Trois lots ont été traités suite à des symptômes cliniques évocateurs d'ornithobactériose et un isolement d'*Ornithobacterium rhinotracheale*. Parmi eux, deux lots issus d'un même élevage, autovaccinés avec une souche d'*Ornithobacterium rhinotracheale* articulaire uniquement ont déclaré une ornithobactériose respiratoire. L'autovaccin a pu être réadapté pour intégrer cette nouvelle souche.

11% des lots vaccinés ont déclaré une ornithobactériose clinique et reçu une antibiothérapie ciblée suite à l'isolement d'un *Ornithobacterium rhinotracheale* au laboratoire contre 82.6% des lots de dindes non vaccinés.

2.3 Innocuité

L'innocuité de l'autovaccin a été évaluée sur les quatre lots d'un seul éleveur. Aucune augmentation de mortalité n'est observée dans les 8 jours suivants la vaccination. Cette observation devrait être reconduite sur un nombre de lots plus important.

Par ailleurs nous n'avons pas relevé de plaintes ou de problèmes majeurs liés à l'administration de l'autovaccin. La seule problématique rapportée par les éleveurs est l'observation de quelques dindons présentant un torticolis après l'injection du vaccin par voie intramusculaire.

2.4 Retour sur investissement

Le coût d'un autovaccin avec au moins une souche d'*Ornithobacterium rhinotracheale* pour un éleveur est environ de 1€/m². Il dépend du nombre de souches contenues dans l'autovaccin et du nombre de dindons vaccinés, certains choisissant de ne vacciner que les mâles. Le coût moyen de l'autovaccin dans notre étude est de 0,65€/m² auquel il faut ajouter le coût de main d'œuvre pour la réalisation du chantier de vaccination soit environ 0,50€/m² soit un total de 1,50€/m².

En parallèle le coût moyen des traitements antibiotiques à visée respiratoire sur les lots non vaccinés dans notre étude est de 1,55€/m² et varie de 0,61€/m² à 4,03€/m².

En moyenne on observe sur les lots de l'étude un gain de 0,28€/m² soit par m² : + 0,35€ de marge PA + 0,43€ de frais vétérinaire en moins (en incluant les autovaccins) - 0.50€ de main d'œuvre pour le chantier de vaccination.

Ces résultats peuvent être largement supérieurs chez certains éleveurs en association avec d'autres solutions thérapeutiques ou techniques.

Ornithobacterium rhinotracheale peut être un pathogène secondaire à un défaut de maîtrise de la ventilation, de la litière, de la biosécurité ou encore d'agents respiratoires viraux. Un plan de prophylaxie complet peut participer à valoriser l'utilisation de l'auto-vaccination.

De même, le temps de l'éleveur alloué à la surveillance et la gestion de l'ornithobactériose peut être mis à profit pour améliorer la conduite du lot (repaillage, pesées, ventilations, etc.).

CONCLUSION

L'utilisation d'un autovaccin à visée *Ornithobacterium rhinotracheale* est associée dans cette étude à une diminution significative de l'utilisation d'antibiotiques à visée respiratoire et de l'utilisation d'antibiotiques en global en améliorant le sanitaire du lot. Ainsi l'utilisation d'autovaccins s'inscrit pleinement dans les démarches EcoAntibio successives pour diminuer l'exposition des volailles aux antibiotiques.

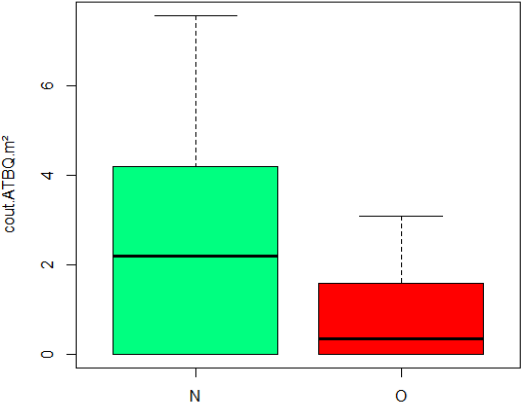
Dans cette étude, le coût de l'autovaccin et de la main d'œuvre pour la réalisation du chantier ont été rentabilisés. Cette étude chiffrée ne prend pas en compte les autres impacts positifs non négligeables sur le stress de l'éleveur et le temps disponible pour la gestion d'autres paramètres comme la litière ou la biosécurité.

L'utilisation d'un autovaccin est une démarche propre à chaque élevage et son impact économique dépend aussi de la pertinence des souches utilisées dans la composition de l'autovaccin.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

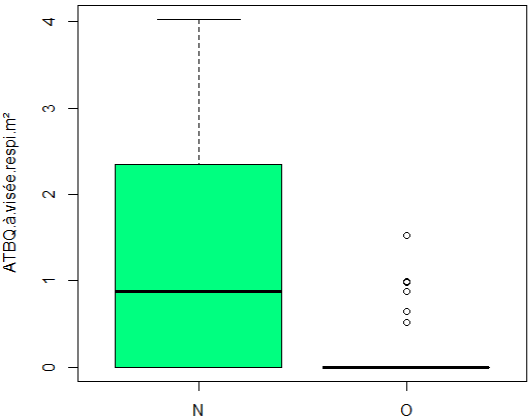
- De Rosa M, Droual R, Chin R, Shivaprasad H et Walker R, 1996. Avian Dis.,(40), 865-874
 Van Beek P, van Empel P, van den Bosch H, Storm P, Bongers J et duPreez J, 1994. Tijdschr Diergeneesk., (119), 99-101.
 Van Empel P et Hafez H M, 1999. Avian Pathol., (28), 217-227.

Figure 1. Data dispersion : Coût antibiothérapie par m²



Lots autovaccinés = Oui (O)
Lots non vaccinés = Non (N)

Figure 2. Data dispersion : Coût antibiothérapie à visée respiratoire par m²



INTERACTIONS ENTRE UNE BRUMISATION D'HUILES ESSENTIELLES ET UNE VACCINATION BRONCHITE INFECTIEUSE EN GALLUS GALLUS.

Mauvisseau Thierry ¹, Ruppin Romaric ¹, Sauvaget Samuel ¹, Galliard Nathalie ²,
Marguerie Jocelyn ³

¹RESEAU CRISTAL-LABOVET CONSEIL-28 rue des Sables, 85140 LES ESSARTS, France

²ZOETIS, Bâtiment VIVA, 10, Rue Raymond David, 92240 - Malakoff, France

³RESEAU CRISTAL - Fili@vet - 7 rue des Artisans, 79300 BRESSUIRE, France

t.mauvisseau@reseaucristal.fr

RESUME :

Le recours aux huiles essentielles est fréquent en élevage avicole afin de limiter la prescription des antibiotiques, en accord avec les plans ECOANTIBIO. Ces substances possèdent des propriétés antibactériennes et antivirales et sont souvent incorporées à l'alimentation, à l'eau de boisson ou utilisées en brumisation. Les vaccins sont également préconisés pour diminuer les surinfections bactériennes favorisées par des virus respiratoires. Du fait des propriétés antivirales des huiles essentielles, nous nous sommes intéressés à l'éventuelle incompatibilité de ces substances avec la prise vaccinale d'un vaccin vivant contre la Bronchite Infectieuse. L'essai a été conduit en élevage de poulet ayant reçu au couvoir une vaccination Mass H120 et 793-B puis un vaccin Poulvac IB Qx administré en pulvérisation à 6 jours. Les huiles essentielles ont été brumisées à partir de 5 jours. L'essai a été conduit sur un lot témoin négatif, non vacciné Qx, non éprouvé par les huiles essentielles, un lot test éprouvé avec les huiles essentielles avec une vaccination Qx et un lot témoin positif avec une vaccination Qx sans éprouve avec les huiles essentielles. 20 prises de sang ont été réalisées à J35 sur chaque lot afin de réaliser une sérologie IHA permettant de mesurer les anticorps vis-à-vis de différents variants coronavirus. Le taux d'anticorps IB Qx est significativement supérieur pour le lot vacciné, non éprouvé aux huiles essentielles par rapport à celui vacciné et éprouvé. Cet essai montre que les huiles essentielles ont de puissantes activités antivirales et qu'il n'est pas recommandé de les utiliser en brumisation en même temps qu'un vaccin vivant au risque de limiter la production d'anticorps.

ABSTRACT:

Interactions between misting of essential oils and vaccination against infectious bronchitis gallus gallus.

The use of essential oils is common in poultry farming to limit the prescription of antibiotics, in accordance with ECOANTIBIO plans. These substances possess antibacterial and antiviral properties and are often incorporated into food, drinking water or used as ambient spraying. Vaccines are also recommended to reduce bacterial superinfections. Due to the antiviral properties of the essential oils, we were interested in the possible incompatibility of these substances with the vaccination by a live vaccine infectious Bronchitis. The trial was conducted in chicken commercial farm received Mass and 793-B vaccination at the hatchery and a Poulvac IB Qx vaccine administered as a spray at 6 days. The essential oils were administered by mist. The test was conducted on a negative control batch, non-vaccinated Qx, not treated by essential oils, a test batch treated with essential oils with a Qx vaccination and a positive control lot with a Qx vaccination without treating with essential oils. 20 blood samples were taken at day 35 on each batch in order to perform a serology IHA to measure the vaccine intake regarding different variants of coronaviruses. The level of antibody IB Qx was significantly higher for the vaccinated batch, not treated with essential oils compared to the vaccinated and treated one. This test shows that essential oils have powerful antiviral activities and that it is not recommended to use them in mist together with a live vaccine with the risk of impairing vaccine intake.

INTRODUCTION :

Les huiles essentielles sont des solutions alternatives de plus en plus utilisées en médecine vétérinaire pour pallier le recours aux antibiotiques et limiter les phénomènes d'antibiorésistance. Elles répondent au plan ECOANTIBIO2, qui recommande également la phytothérapie. Les huiles essentielles se retrouvent dans des aliments complémentaires, dans des aliments complets et sont également utilisées en nébulisation pour améliorer l'ambiance des bâtiments (Shelton, 2018). Leurs propriétés ont été étudiées surtout depuis le XXème siècle et de nombreuses actions ont pu être démontrées, telles leur activité antibactérienne, anti virale, anti fongique ou anti parasitaire (Franchomme, 2001).

Parallèlement au plan ECOANTIBIO2, le recours aux vaccins est également soutenu puisqu'il permet de diminuer fortement l'utilisation d'antibiotiques en élevage. La vaccination fait appel à deux sortes de vaccins soit, des vaccins inactivés produits à partir de bactéries ou de virus tués, soit des vaccins vivants préparés à partir de souches atténuées en stimulant le système immunitaire par la multiplication de l'agent vaccinal. L'objet de cette étude est de valider la prise vaccinale d'un vaccin vivant administré en pulvérisation associé à une utilisation d'huiles essentielles par brumisation. Faut-il les proscrire en cas de vaccination avec un vaccin vivant et durant quelle période? L'étude a été réalisée en condition terrain sur *Gallus gallus* vacciné en élevage avec un vaccin contre la bronchite infectieuse à variant Qx, (Geerligns, 2011) et éprouvé conjointement avec une solution à base d'huiles essentielles ayant des propriétés antivirales reconnues. (Willem, 2015). Nous avons mesuré les titres sérologiques de 4 coronavirus au moyen de l'Inhibition de l'HémAgglutination.(IHA)

1. MATERIEL ET METHODE.

1.1 Matériel

1.1.1 Les poulets.

Nous avons sélectionné un site présentant 3 lots de 22500 poulets répartis dans 3 bâtiments de 1000 m², de 6 jours, vaccinés au couvoir par nébulisation contre la bronchite infectieuse à l'aide de vaccins vivants Massachussets (type H120) et d'un type variant 793-B.

1.1.2 Le vaccin.

Nous avons éprouvé les poulets avec le vaccin vivant Poulvac IB QX, comportant un coronavirus

variant différent du type 793-B et de la souche Massachussets (Mass) type H120) (Karimi, 2018). afin de pouvoir identifier les différents anticorps (Yun Zhang, 2018). Le vaccin a été administré par pulvérisation à l'aide d'un Birchmeier sur batterie, avec une distribution régulière de gouttelettes de 100 à 120 microns avec 2 bars de pression. L'essai a été réalisé sur les Pays de Loire où les virus sauvages QX et Italy 02 sont peu isolés, ce qui a justifié le choix du vaccin de type Qx (Blond et al., 2017). Le vaccin contenant le variant Italy 02, n'est pas disponible en France.

1.1.3 Les huiles essentielles.

Nous avons sélectionné un assainisseur d'ambiance comportant un mélange de 4 huiles essentielles chémotypées (Un certificat d'analyse chromatographique permettant de connaître les composants exacts). Ces huiles essentielles ont une activité antivirale reconnue, en raison de la présence de composés réputés pour leur activité antiseptique (Faucon, 2015). Ce mélange est composé de 3 huiles essentielles comportant des phénols : (Le clou de girofle à base de l'Eugénol, l'origan riche en Carvacrol et le thym à chémotype Thymol) et de la cannelle de Chine constituée d'un aldéhyde aromatique : le cinnamaldéhyde. Le produit se compose de 25 % d'huiles essentielles et d'un excipient permettant la solubilité des huiles essentielles dans l'eau. Les huiles essentielles étant lipophiles, un solubilisant est indispensable pour obtenir un mélange homogène dans l'eau. Le produit a été dilué à raison de 150 ml/20 litres d'eau et administré dans une brume haute pression de façon à avoir une répartition homogène des huiles essentielles pour tous les poulets dans l'ensemble du bâtiment.

1.2 Méthode

Nous avons sélectionné 3 bâtiments représentant 3 lots, de poulets de chair. Un lot A, témoin négatif, comportant des sujets, vaccinés au couvoir contre la bronchite infectieuse avec une souche classique Massachussets (H120) et une souche variante 793-B, n'ayant pas reçu de vaccination en élevage contre la bronchite, et n'ayant pas reçu d'administration d'huiles essentielles ni par nébulisation ni par voie orale.

Un lot B, lot test, ayant reçu les mêmes vaccins que le lot A au couvoir par nébulisation, ne présentant pas de mortalité anormale sur la période 0-5 jours. A J5 les poulets ont reçu le mélange d'huiles durant 5 mn le matin et 5 mn le soir par la brume. La ventilation dynamique a été reprise 10 mn après l'arrêt de la nébulisation, une fois le brouillard retombé sur les animaux et la litière. A J6, les

poulets ont reçu le matin une pulvérisation d'huiles essentielles suivant le même protocole et 3 heures plus tard, les poulets ont été vaccinés par nébulisation en élevage avec un vaccin variant de type Qx par nébulisation à l'aide d'un appareil sur batterie avec 900 ml d'eau minérale dépourvue de trace de chlore ou autre oxydant pouvant altérer le vaccin. La vaccination s'est effectuée, sur le côté droit, le côté gauche puis un retour par le centre du bâtiment; ce circuit de passage ayant été renouvelé 3 fois. Durant la vaccination, la ventilation dynamique a été arrêtée.

Le soir du J6, les poulets ont reçu une pulvérisation d'huiles essentielles suivant les mêmes doses. De J7 à J9, les poulets ont également reçu matin et soir une pulvérisation de l'assainisseur d'ambiance.

Un lot C, témoin positif ayant reçu les mêmes vaccins au couvoir que les lots A et B, ne présentant pas de mortalité anormale de J0 à J5, a été vacciné par le variant Qx par nébulisation suivant le même protocole que le lot B.

A J35, 20 prises de sang ont été effectuées sur chaque lot. Les tubes ont été réfrigérés puis centrifugés afin de récupérer le sérum. Un test d'inhibition de l'hémagglutination a ensuite été réalisé sur chaque sérum permettant ainsi de quantifier les titres en anticorps en coronavirus de 4 types : Mass (Massachusetts), 793-B, Qx et Italy 02. Les sérums sont considérés comme positifs pour un titre au moins supérieur à 4. Pour chaque coronavirus, les titres moyens, l'écart type et le coefficient de variation ont été calculés.

1.2 Analyse statistique

Un test ANOVA de l'analyse de la variance a été réalisé sur les titres entre le lot B (vacciné IBQx éprouvé huiles essentielles) et le lot C (vacciné IBQx non éprouvé avec les huiles essentielles).

2. RESULTATS ET DISCUSSION :

L'analyse des titres (Tableau 1) pour le variant Italy 02 dans les 3 lots, révèle des titres très bas (Tableau 1) entre 3 et 3,2, et des coefficients de variation de 0 à 12 %, (tableau 2) indiquant une relative homogénéité des populations. Les titres très bas correspondent à une absence d'immunité vis-à-vis de ce variant, les poulets n'ont donc pas été en contact avec ce variant.

Pour le variant 793-B, l'immunité est assez élevée entre 6,8 et 7,1, avec seulement 1 sérum limite négatif. (titre de 4 pour le lot témoin positif). La vaccination au couvoir réalisée avec le 793-B indique une bonne prise vaccinale à 35 jours mais avec un coefficient de variation de 26 % plus élevé

sur le lot témoin positif. 16 % sur le lot test et 14 % sur le lot témoin négatif.

Pour la souche Mass, les titres s'étalent entre 4,5 et 5,4, ce qui indique une bonne immunité pour les 3 lots. En revanche, dans chaque lot, un tiers des sérums a un titre inférieur à 4, et sont donc qualifiés de négatif. Certains sujets n'ont donc pas ou plus d'immunité protectrice vis-à-vis de la souche Mass. Le coefficient de variation du lot témoin négatif de 20%, indique une relative homogénéité dans les titres. En revanche, pour le lot témoin positif et le lot test, les coefficients sont plus élevés (36 à 38 %) ce qui indique une plus grande variation dans les titres avec plus de sujets ayant un titre négatif et d'autres très positifs (titre de 7 à 9).

Pour le type Qx, les titres moyens sont moins élevés que pour le type Mass ou 793-B et plus élevés que ceux de l'Italy 02. Il n'y a donc pas eu de concurrence avec un virus sauvage, sinon les titres auraient été plus élevés. Pour le lot A et B, 16 titres sur 20 sont inférieurs à 4, et sont considérés comme négatifs. Les titres moyens ne dépassent pas 6.

Pour le lot C : 11/16 sont négatifs et 2 sérums ont des titres à 7, donc supérieurs.

L'application d'une troisième souche de virus bronchique (Qx) (Lot B et C) pourrait expliquer les coefficients de variation plus élevés que le lot témoin négatif non vacciné en Qx.

L'analyse statistique avec le test d'ANOVA (Tableau 3) n'a pas été réalisée sur le lot A et B, ni sur le lot A et C, en raison d'une vaccination supplémentaire pour les lots B et C par rapport au A. Pour le lot B (éprouvé) et le lot C (témoin positif), le test met en évidence une différence significative (p-value= 0,05) qui confirme bien que les titres issus d'un lot vacciné non éprouvé aux huiles essentielles sont plus élevés que ceux issus du lot vacciné et éprouvé aux Huiles essentielles.

La prise vaccinale vis-à-vis du Qx n'est pas très élevée, et il n'y a pratiquement pas de différence entre les titres issus d'un lot non vaccinés et ceux issus d'un lot vacciné et éprouvé.

Le lot vacciné non éprouvé par les huiles essentielles a un titre en anticorps plus élevé que pour un lot vacciné et éprouvé. Les huiles essentielles neutralisent le virus vaccinal en inhibant la réplication du virus vaccinal et donc diminuent la production d'anticorps. Les huiles essentielles, administrées durant les 4 jours suivant la vaccination ont donc bien une activité antivirale et il convient de ne pas les utiliser durant la prise vaccinale. L'essai pourrait être renouvelé avec des applications d'huiles essentielles plus courtes (un ou 2 jours) afin de réduire peut être la période de contre-indication des huiles essentielles, par rapport à la prise vaccinale. L'essai pourrait aussi, être

complété avec une recherche du virus vaccinal Qx, cependant les dernières analyses sur écouvillons cloacaux ou trachéaux réalisées en France sur des lots éprouvés H120 et 793-B au couvoir n'ont pas permis le ré isolement du virus vaccinal Qx lors d'une vaccination en élevage. La protection contre le virus Qx n'étant pas affectée, l'essai aurait pu être conduit avec une vaccination H120 uniquement en couvoir et non 793-B. Cela aurait peut-être permis de retrouver les virus Qx. Le 793-B semblerait plus immunogène que le Mass H120. (titres plus élevés). Dans d'autres pays européens où la vaccination avec le 793-B n'est pas faite à un jour, le Qx vaccinal est plus souvent ré isolé. (Bru et al. 2016)

CONCLUSION :

L'étude a donc permis de conclure sur l'objectif initial qui était de savoir si les huiles essentielles pouvaient inhiber la prise d'un vaccin vivant. Il est donc déconseillé d'avoir recours à des huiles essentielles par nébulisation le jour qui précède la vaccination et dans les 4 jours suivant la vaccination.

L'essai a été réalisé avec des huiles essentielles administrées en pulvérisation, donc assez

concentrées et suivant le même mode d'application que le vaccin à savoir la nébulisation. Les huiles essentielles sont aussi souvent utilisées par voie orale soit par l'aliment à des doses très faibles soit en intervention dans des aliments complémentaires, à des doses parfois plus élevées. Du fait de leur nature lipophile, elles sont très bien absorbées par voie orale et donc diffusent très rapidement dans tout l'organisme. Il serait donc très intéressant de renouveler l'étude avec une application d'huiles essentielles dans l'eau de boisson et de vérifier si une telle administration peut aussi inhiber un vaccin vivant administré par voie aérienne. Dans le cadre d'un vaccin antibactérien vivant, les antibiotiques sont proscrits sur une période de 6 jours post vaccination, il semblerait donc qu'il en soit de même avec les huiles essentielles. Enfin cette étude permet de soulever la problématique des huiles essentielles utilisées souvent dans l'alimentation sans contrôle et ce dès le plus jeune âge afin d'améliorer la digestibilité ou de prévenir d'éventuels troubles infectieux: une telle administration ne limite-t-elle pas l'efficacité des vaccins vivants de plus en plus prescrit pour limiter les antibiotiques en élevages ?

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ECOANTIBIO2 2017-2021: Réduire l'utilisation des antibiotiques vétérinaires

Blond F, Boelm G.J, Galliard N, Vancraeynest D, Ledoux A-L et Geerligs H, 2017. JRA-JRPFG2017.279-283.

Bru T, Vila R, Cabana M et Geerlings H.J, 2016. Avian Pathology. 46:1, 52-58

Faucon M, 2015 Traité d'aromathérapie scientifique et médicale. Ed Sang de la Terre.

Franchomme P., et al., 2001. L'aromathérapie exactement. Ed Jollos.

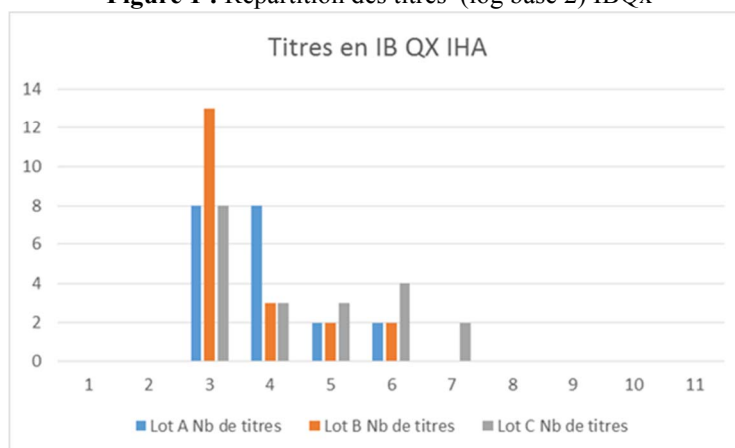
Geerligs H. J., Boelm G.-J., Meinders C. A. M., et al., 2011. Avian Pathology, 40:1, 93-102,

Karimi, V., Ghalyanchilangeroudi, A., Hashemzadeh, M. et al., 2018. Virus Diseases, (29), 123-126.

Shelton M, 2018. ADR II The Animal Desk Reference, Essential Oils for Animals II nd Edition

Willem J.P., 2015. Huiles essentielles antivirales. La solution naturelle pour lutter contre les infections. Ed Tredaniel.

Yun Zhang, Songjian Huang, Yuyao Zeng et al, 2018. Vaccine, (36), Issue 29, 4245-4254.

Figure 1 : Répartition des titres (log base 2) IBQx**Tableau 1. Titres obtenus par IHA BI (Filiavet RESALAB)* Titres exprimés en log base 2**

Titres en Ac IHA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 et +
Lot A témoin négatif											
IBQx			8	8	2	2					
BI793B					1	4	6	6	1		
BI MASS			2	5	7	4					
BI It02			16	3							
Lot B test éprouvé HE + IBQx											
IBQx			13	3	2	2					
BI793B					2	7	6	4	1		
BI MASS			9		4	2	2	1			
BI It02			20								
Lot C Témoin positif IBQx											
IBQx			8	3	3	4	2				
BI793B				1	1	9	3	3	1		2
BI MASS			6	1	2	5	4	1	1		
BI It02			19	1							

Tableau 2. Moyenne, écart type et coefficient de variation par IHA BI (Filiavet RESALAB)

Lot A témoin négatif			
	Titre moyen	Ecart type	%CV
Qx	3,9	1,0	25%
793 B	7,1	1,0	14%
MASS	4,7	1,0	20%
It 02	3,2	0,4	12%
Lot B test			
	Titre moyen	Ecart type	%CV
Qx	3,7	1,0	28%
793 B	6,8	1,1	16%
MASS	4,5	1,7	38%
It 02	3	0,0	0%
Lot C Témoin positif			
	Titre moyen	Ecart type	%CV
Qx	4,5	1,5	33%
793 B	7	1,8	26%
MASS	5,4	1,9	36%
It 02	3,1	0,2	7%

Tableau 3. Résultats du test ANOVA
Différence non significative si p-value>0,05

Test ANOVA	Lot B et C
p value	0,05

PROTECTION VACCINALE INDUITE CONTRE L'ANEMIE INFECTIEUSE SUR DES TROUPEAUX REPRODUCTEURS DE POULETS DE CHAIR :

COMPARAISON DE DEUX VACCINS COMMERCIAUX (EAU DE BOISSON VERSUS INJECTION)

Christèle Goudeau¹, Sophie Vigneron²

¹ELANCO FRANCE -24, bd Vital Bouhot, CS 50004, 92521 NEUILLY SUR SEINE CEDEX

²HENDRIX GENETICS RECHERCHE, TECHNOLOGIE ET SERVICES SAS - La

Bohardière, BP 1, St-Laurent de la Plaine 49290 MAUGES SUR LOIRE

goudeau_christele@elanco.com

RÉSUMÉ

L'anémie infectieuse est responsable d'immunosuppression chez les poulets de chair et peut entraîner des pertes économiques considérables. Elle est causée par un virus très résistant, omniprésent dans l'environnement ce qui compromet son éradication. Seule une protection vaccinale efficiente des troupeaux reproducteurs permet le contrôle de la maladie en évitant la transmission du virus aux poussins destinés à l'élevage de chair.

La voie d'administration et le niveau d'atténuation de la souche vaccinale contenue dans le vaccin peuvent induire une protection variable. Cette étude a pour objectif de comparer la protection générée par les deux seuls vaccins commercialisés en France pour lutter contre l'anémie infectieuse : l'un contient la souche Cux-1 administrée en eau de boisson et l'autre, la souche 26P4 administrée en injection. Pour évaluer leur efficacité de protection, un suivi sérologique a été réalisé à 10, 18, 26/27, 42 et 50/55 semaines à l'aide du kit sérologique CAV Ab d'Idexx. A chaque date de prélèvement, 20 prises de sang individuelles ont été effectuées sur les troupeaux. La moyenne des titres d'anticorps ainsi que le calcul des coefficients de variation de ces titres ont permis d'apprécier le niveau de protection moyen des troupeaux ainsi que l'homogénéité de celle-ci. L'utilisation de la souche vaccinale Cux-1 génère entre 26/27 semaines ainsi qu'en fin de production (entre 50 et 55 semaines) une uniformité de protection supérieure à celle générée par la souche 26P4.

ABSTRACT

Vaccine protection against infectious anemia in broiler breeder flocks: comparison of two commercial vaccines (drinking water versus injectable)

Infectious anemia causes immunosuppression in broilers and can lead to considerable economic losses. The disease is caused by a very resistant virus, which is ubiquitous in the environment compromising its eradication. The disease can be controlled by preventing the transmission of the virus to chicks for meat production by a vaccination of breeding flocks. The administration route and the level of attenuation of the vaccine strain contained in vaccines may affect the level of protection. The objective of this study was to compare the efficacy provided by the two vaccines currently commercialized in France: one containing the Cux-1 strain administered via the drinking water and the other one containing the 26P4 strain administered by injection. Efficacy was assessed by serology. To this purpose, 20 individual blood samples were taken at 10, 18, 26/27, 42 and 50/55 weeks (end of production) of age and tested for antibodies using Idexx serological kits. The average level of protection of the flocks and their homogeneity were assessed by the average of the antibody titers and the calculation of the coefficients of variation of these titers. The Cux-1 vaccine strain, administered via the drinking water, induced between 26/27 and 50/55 weeks of age higher protective uniformity than those induced by the 26P4 strain, administered by injection.

INTRODUCTION

L'anémie infectieuse (AI) est une maladie virale immunosuppressive que l'on rencontre spécifiquement chez l'espèce *Gallus gallus*. Le virus à l'origine de celle-ci s'attaque à certaines cellules de la moelle osseuse et impacte la production de cellules sanguines comme les globules rouges, les thrombocytes et les hétérophiles mais également les cellules immunitaires (précurseurs de lymphocytes T). Il est à l'origine d'anémie, de dermatites gangreneuses observées plus particulièrement sur les ailes (l'anémie infectieuse est aussi appelée « maladie des ailes bleues ») et de mortalités sur les poulets de moins de trois semaines. Les infections tardives, engendrent des formes sub-cliniques avec des signes d'immunodépression pouvant favoriser les affections secondaires (Chansiripornchai, 2016). Une enquête réalisée par McNulty and al (1991) à partir d'un échantillonnage de 10 sérums prélevés à l'abattage (45 jours) sur 25 élevages de poulets, a permis de montrer l'impact de passage d'AI sauvage sur les performances. Selon cette étude, les élevages présentant des anticorps anti AI sur plus de 6 sérums/10, dus à une infection de virus AI sauvage, voient leurs performances dégradées : + 2 points d'indice de consommation, -2,5% de poids d'abattage, -13% de marge nette en moins en moyenne. La transmission verticale du virus AI joue un rôle important dans l'infection de jeunes poulets (Karel. and al, 2013) même si l'on sait qu'une diffusion horizontale peut aussi exister. Pour pouvoir protéger correctement les poussins de 1 jour, il est nécessaire de vacciner les reproducteurs en période de pré-ponte afin qu'ils puissent dès la production des premiers poussins transmettre à ces derniers les anticorps protecteurs contre l'AI. Il est important que les titres moyens d'anticorps protecteurs contre l'AI soient très élevés (supérieurs à 8660 si possible) et homogènes dès le début de ponte pour l'ensemble des parentaux (On considère que l'homogénéité est excellente quand le coefficient de variation est < à 40% et acceptable quand il se situe entre 40 et 60%- voir tableau 1). La voie d'administration et le niveau d'atténuation du vaccin peuvent induire une protection vaccinale variable. Il faut garder à l'esprit qu'une bonne stratégie vaccinale contre l'AI doit permettre l'obtention de titres anticorps élevés et homogènes, durables jusqu'à la réforme des troupeaux reproducteurs. Cela permet de garantir une protection efficiente des poussins à la fois contre le risque de transmission virale verticale et également horizontale. L'objet de cette étude est de pouvoir évaluer l'impact du choix du type de vaccin sur la qualité de l'immunité vaccinale mise en place sur les troupeaux reproducteurs du début jusqu'à la fin de la production.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Les élevages

L'étude a porté sur 4 sites d'élevages différents de poulets futurs reproducteurs de la même société d'accoupage. Les élevages étaient situés dans des zones géographiques différentes (2 élevages en Pays de Loire/ Normandie et 2 élevages dans le Sud-Ouest). Pour chaque zone, un élevage vacciné en eau de boisson et un élevage vacciné en injectable ont été définis afin d'évaluer la protection conférée par chaque vaccin dans un contexte épidémiologique d'AI propre à chacune des zones.

1.2. Le choix des vaccins

Deux vaccins contre l'anémie infectieuse sont disponibles en France. L'un contient une souche vaccinale faiblement atténuée, Cux-1 et s'administre en eau de boisson. L'autre, contient une souche plus fortement atténuée, 26P4 et s'administre par injection (Chansiripornchai, 2016). Deux élevages ont été vaccinés avec un vaccin contenant la souche Cux-1. Ce vaccin a été administré en eau de boisson à 13 semaines d'âge avec un système d'abreuvement de type Plasson. Les deux autres élevages ont été vaccinés avec un vaccin contenant la souche 26P4 fortement atténuée. L'administration s'est faite en injection à l'âge de 18 semaines. Les méthodes d'administration des deux vaccins ont respecté les recommandations des fournisseurs.

1.3. Le suivi sérologique sur les troupeaux

Les prélèvements sérologiques individuels réalisés sur 20 sujets par troupeau et à chaque âge de contrôle ont été réalisés de la manière suivante : prélèvements à 10 semaines d'âge pour évaluer le statut sérologique vis à vis de passage sauvage d'AI puis prélèvements à 18 semaines (5 semaines post vaccination pour le vaccin en eau de boisson et juste avant vaccination pour le vaccin injectable), à 26/27 semaines et à 42 semaines. Une dernière série de prélèvements a été réalisée entre 50 et 55 semaines selon l'âge de réforme des troupeaux pour estimer la persistance de la protection vaccinale en fin de lot. Les âges de prélèvements ont été choisis afin de correspondre aux âges de prélèvements des contrôles officiels de manière à faciliter les opérations.

Chaque série de prélèvements par élevage contenaient une vingtaine de prises de sang réalisées selon les bonnes pratiques définies pour ce type de prélèvement.

Schéma 1. Planning des dates de prélèvements de l'essai

Essai eau de boisson	T0: 10 semaines d'âge	13 sem: vaccin eau de boisson	T1: 18 semaines	T2: ponte 26/27 semaines	T3: ponte 42 semaines
Essai injection	T0: 10 semaines d'âge	T1: 18 semaines	18 semaines: vaccin en injection	T2: ponte 26/27 semaines	T3: ponte 42 semaines

1.4. Analyses

Les analyses sérologiques ont été réalisées selon une méthode de type ELISA en utilisant le kit IDXX (CAV Ab test). L'interprétation des titres sérologiques s'est faite à partir du référentiel du fournisseur du kit (voir tableau 1).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus au cours du suivi sérologique des différents troupeaux sont présentés dans le tableau 1.

Les titres sérologiques mesurés à 10 semaines sur l'ensemble des 4 sites d'élevages démontrent une absence totale de protection des troupeaux contre AI. A 18 semaines, les deux lots vaccinés en eau de boisson (élevages 1 et 2) montrent une bonne protection, 5 semaines après l'administration du vaccin (titres moyens de 6060 et 7722 pour l'élevage 1 et 2). Les lots destinés à être vaccinés en injection (élevages 3 et 4) n'ont pas reçu le vaccin à cet âge (vaccination à 18 semaines après le prélèvement). Néanmoins, on observe que l'un d'entre eux (élevage 3) a subi un passage viral sauvage avant vaccination (titre moyen de 7113). De ce fait, ce lot a été tout de même vacciné mais exclu du reste de l'étude, les interférences entre passage sauvage et vaccination étant difficiles à analyser. A 26/27 semaines et 42 semaines, les trois lots restant dans l'étude, sont protégés comme en témoignent les moyens des titres d'anticorps situés en classe 2 ou 3/4. L'étude du coefficient de variation (CV en %) permet de compléter l'analyse de la qualité de la protection. Les deux lots vaccinés en eau de boisson (élevage 1 et 2)

présentent des CV très inférieurs ou proche des 40% à 26/27 et 42 semaines tandis que celui vacciné en injection (élevage 4) présentent des CV > 60% marquant une forte hétérogénéité des niveaux de protection au sein du troupeau. Le risque est alors que certains parentaux présentent des titres anticorps trop faibles pour pouvoir assurer la protection de leur descendance. L'analyse de la dernière période de production permet également d'évaluer la persistance de la protection des troupeaux contre l'AI. En fin de production (entre 50 et 55 semaines), la protection reste durable avec le vaccin en eau de boisson, avec des moyennes de titres d'anticorps protecteurs en classe 2 et 3/4, (respectivement 7792 pour l'élevage 1 et 10526 pour l'élevage 2) et des coefficients de variation témoignant d'une bonne uniformité de protection pour l'ensemble des animaux (respectivement 17,4% pour l'élevage 1 et 53% pour l'élevage 2). On note toujours pour le lot vacciné en injection, une forte hétérogénéité de la protection vaccinale (65%) même si la moyenne des titres d'anticorps protecteurs se situe en classe 2.

CONCLUSION

Cette étude tend à démontrer que l'utilisation d'un vaccin contenant une souche vaccinale faiblement atténuée, administrée en eau de boisson, permet d'obtenir une meilleure uniformité de protection des parentaux, du début jusqu'à la fin de production des poussins. Cette observation rejoint celle réalisée par Schwefer and al (2012) au cours d'une étude similaire menée en conditions de terrain en Allemagne. Il est probable que l'excrétion de la souche vaccinale dans l'environnement après son administration par voie orale ainsi que la faible atténuation de la souche, permettent des sollicitations immunitaires post vaccinales des individus favorisant une meilleure uniformité de protection. Il serait toutefois intéressant de pouvoir poursuivre le suivi comparatif sur un nombre plus important de lots et de voir l'impact sur la protection des poussins.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chansiripornchai N. (2016). "Field study of seroconversion of three different commercial vaccines of chicken infectious anemia virus in Thailand". The Thai Journal of Veterinary Medicine, 46(4), 699-704.
- McNulty M. S. and al (1991). "Economic effects of subclinical chicken anemia agent infection in broiler chickens". Avian Diseases 35, n° 2, 263-268.
- Karel A. and al (2013). "Chicken infectious anemia virus and other circovirus infections". Diseases of Poultry, chapter 8, 247-264.
- Idexx laboratoires (2002). "Technical bulletin chicken anemia virus". 1-4.
- Schwefer S. and al (2012). "Determination of the immunological response after vaccination with chicken anemia vaccines of different attenuation levels". World's Poultry Science Journal, supplement 1, expanded abstract-poster presentation WPC 2012 congress Brazil, 5-9 august 2012.

Tableau 1. Evolution des titres moyens sérologiques AI et des coefficients de variation (CV%) pour les lots vaccinés eau de boisson (*) vs les lots vaccinés en injection (**).

* : Souche virale faiblement atténuée ; ** : Souche virale fortement atténuée

Type de vaccin	N° Elevage	10 sem		18 sem		26/27 sem		42 sem		50/55 sem	
		Titres moyens	CV%	Titres moyens	CV%	Titres moyens	CV%	Titres moyens	CV%	Titres moyens	CV%
Eau de boisson	Elevage 1	636	28,4	6060	60,4	5488	42,45	7516	23,7	7792	17,4
Eau de boisson	Elevage 2	430	17	7722	71	8182	23	13517	13	10526	53
Injection	Elevage 3	845	45,5	7113	52,3						
Injection	Elevage 4	801	13	680	22	5737	79	6863	77	8216	65

Seuils d'interprétation des titres sérologiques (laboratoire Idexx, dilution 1 :100)

	Titres	S/N	Résultats	Protection
CLASSE 0 à 1	<1000	>0,8	Neg	Non protégé
CLASSE 2	1000-8660	0,8-0,2	Pos	Modérément protégé
CLASSE 3-4	> 8660	< 0,2	Pos	Fortement protégé

Coefficient de variation:

< 40	Excellent
>40-<60	Acceptable
>60	hétérogène

SUIVI DE L'AMÉLIORATION DES PERFORMANCES DE PRODUCTION EN DINDE DE CHAIR PAR L'UTILISATION AU COUVOIR D'UN VACCIN RECOMBINANT CONTRE LA MALADIE DE NEWCASTLE EN COMPARAISON AVEC UN PROGRAMME DE VACCINATION AVEC DES VACCINS VIVANTS ATTÉNUÉS EN FRANCE.

Dr Eric Chataigner¹, Dr Stéphanie Castagnos², Dr Simon Mouchel²

¹*Selvet Poultry Vet Practice, Chêne Vert Conseil Veterinary Group, ZI Bellevue 2, 35220
Châteaubourg, France*

²*Ceva Santé Animale Avenue de la Ballastière 33500 Libourne, France*

e.chataigner@chenevertconseil.com

RÉSUMÉ

En production de dinde, les infections à Paramyxovirus (PMV), responsable de la maladie de Newcastle (ND) provoquent des troubles digestifs et respiratoires, ainsi que des pertes économiques et des sous-performances. Dans certains cas, des infections bactériennes peuvent en plus affecter ces performances par une augmentation de la mortalité et de la consommation d'antibiotiques. Une vaccination vivante contre le PMV est couramment pratiquée, mais elle nécessite plusieurs rappels pour maintenir un niveau de protection suffisant jusqu'à l'abattage. L'objectif de cette étude était de mesurer l'impact d'une vaccination avec un vaccin vivant recombinant contre la maladie de Newcastle sur les performances ainsi que sur les consommations d'antibiotiques.

262 lots de dindes ont été suivis : 152 vaccinés en élevage (groupe témoin) avec trois administrations de vaccin vivant atténué, et 110 vaccinés par injection au couvoir avec vaccin vivant recombinant contre la maladie de Newcastle (groupe test). Les performances des deux groupes ont été comparées au moyen d'une analyse statistique (test t Student).

En comparaison avec le groupe témoin, on a pu mesurer une amélioration significative ($p_{\text{value}}=7,74.10^{-5}$) du poids moyen à l'abattage, une amélioration du GMQ moyen entre 0 et 120 jours (107,31 g vs. 106,44 g) ($p_{\text{value}} = 2,6.10^{-3}$) et surtout une diminution très significative du nombre de traitements antibiotiques de 40% ($p_{\text{value}} = 1,31.10^{-5}$).

Le vaccin rHVT-ND n'est pas autorisé pour l'espèce dinde (hors AMM), mais il peut contribuer à améliorer considérablement la lutte contre les infections à *Paramyxovirus* ainsi que la lutte contre les utilisations d'antibiotiques.

ABSTRACT

Field study on production performances improvement in commercial meat turkeys by using a vector vaccine against Newcastle disease rHVT-ND compared with live vaccines program in France

In turkey meat production, *Paramyxovirus* infections induce respiratory and digestive troubles, resulting on economical losses and poor production performances. In few cases, secondary infections as colibacillosis or *Ornithobacterium rhinotracheale* can occur and can affect flock performances as increase of mortality and antibiotic consumption.

Vaccination with live vaccines is widely used but boost vaccinations are needed to have a consistent protection until slaughter.

The aim of this study was to investigate the effects on performances.

262 flocks have been followed: 152 flocks vaccinated at farms (control group) with 1 to 3 live vaccines and 110 flocks (test group) vaccinated at day 1 in the hatchery with a vaccine. Performances of both groups have been compared with a statistical analyzed (t Student test).

As compared to the control group, an improvement on different criteria was observed in the test group as a mean body weight 312g heavier at slaughter ($p_{\text{value}} = 7,74.10^{-5}$), a better mean ADWG between 0 and 120 days (107,31g vs. 106,44g) ($p_{\text{value}} = 2,6.10^{-3}$) and a decrease of antibiotic consumption of 40% ($p_{\text{value}} = 1,31.10^{-5}$).

rHVT-ND vaccine is off label in turkeys but can contribute to improve prophylaxis against *Paramyxovirus* infection.

INTRODUCTION

Depuis la prise en considération de l'antibiorésistance et l'arrivée du plan ECOANTIBIO dans les productions animales, de nombreuses études se sont développées pour déterminer tous les facteurs influençant les déclenchements d'antibiothérapie. Afin de satisfaire aux objectifs de réduction des antibiotiques, il a fallu d'une part retourner à l'application stricte des normes zootechniques, mais aussi mettre en place des programmes vaccinaux plus efficaces. Des auto-vaccins ont été élaborés et prescrits avec un certain succès, mais leur mise en œuvre demeure lourde, et peu adaptée aux espèces à durée de vie courte (espèce *Gallus*). En France, cette solution n'est autorisée en routine que pour la prévention de maladies bactériennes. Des retours d'expérience terrain ont permis de constater l'implication forte des infections virales dans les mécanismes de déclenchement des infections bactériennes, toutes espèces confondues (maladie de Gumboro, Bronchite infectieuse, Rhinotrachéite Infectieuse (RTI), Infections à paramyxovirus de type 1 (PMV1). Ces diverses infections génèrent un syndrome d'immunodépression qui permettra à des bactéries de s'implanter et de développer des infections diverses. C'est précisément ce point qui a retenu notre attention pour mesurer l'impact d'une vaccination virale parfaitement maîtrisée sur les quantités d'antibiotiques utilisées en curatif dans des élevages de dindes.

LES PRINCIPES DE LA VACCINATION EN ÉLEVAGE

Pour chaque maladie courante d'origine virale, il existe différents vaccins (vivants pour la plupart) utilisables selon différents protocoles. L'objectif de cette vaccination est de procurer aux animaux une immunité active le plus précocement possible et pendant toute la période de sensibilité des animaux à la maladie correspondante. En général l'administration d'un vaccin vivant procure une protection d'environ 6 semaines, selon les spécifications des fabricants (dossiers d'AMM). Quel que soit le protocole d'administration il convient de le respecter scrupuleusement afin de garantir une protection précoce, suffisante et adaptée à la durée de vie des animaux. Dans le cas de la vaccination PMV1 en production de dinde de chair, un protocole avait été retenu en raison des résultats de sérologies montrant des séroconversion maximales et relativement homogènes ainsi que l'absence de tout signe clinique évoquant une infection à PMV1 : 3 pulvérisations d'une souche vivante atténuée de clone 30 à J10, J56 et uniquement sur les mâles à J84. Une étude sérologique (1) en dinde réalisée en 2016 en partenariat avec la société MG2 MIX a permis de mettre en évidence des carences énormes en matière de respect des protocoles vaccinaux, avec pour conséquences des fortes

augmentations de mortalité en fin de lot. Sur un panel d'élevage de dindons répartis dans tout le grand ouest (une soixantaine), seulement 7% de ces élevages pratiquaient une vaccination PMV1 que nous avons pu considérer comme complète et protégeant les animaux jusqu'à l'abattage. Un screening sérologique réalisé en fin de lot a permis de mettre en évidence des problèmes sanitaires en relation avec une infection virale à PMV1 dans 68% des cas ! (2). Le même type de constatation a été également observé avec la RTI dans ces mêmes élevages.

Une étude chiffrée a été réalisée pour évaluer l'intérêt de la vaccination PMV1 faite au couvoir quant à son impact sur l'antibiothérapie en élevage comparée au protocole ci-dessus ayant recours à des pulvérisations de vaccins vivants atténués. Cette étude a été menée en raison de la mise en évidence de nombreux échecs de vaccination PMV1 par la méthode classique (pulvérisation du vaccin vivant atténué difficile à réaliser efficacement) et surtout de la forte implication du virus PMV1 dans des épisodes de surinfections colibacillaires ou respiratoires à *Ornithobacterium rhinotracheale* survenant pendant les dernières périodes d'élevage. Par contre, il est important de noter que le vaccin vecteur utilisé en couvoir ne possède aucune AMM sur l'espèce Dinde et que donc cette étude s'effectue dans un cadre de prescription hors AMM.

MATERIEL ET METHODES

Sur une période allant d'octobre 2014 à juin 2017, on a étudié et comparé deux modes de vaccination sur 262 lots de dindons (plus de 3,1 millions de dindes et dindons) élevés dans une cinquantaine d'élevages. 152 lots choisis au hasard du planning ont été vaccinés selon les protocoles classiques réalisés en élevage et 110 lots restants l'ont été au moyen d'un vaccin vecteur vivant recombinant (VECTORMUNE ND) utilisant le gène de la protéine de surface F inséré dans le génome de virus HVT, réalisé par injection sous-cutanée au couvoir. Des sérologies en fin de lot (entre 100 et 110 jours) ont également été réalisées pour vérifier la persistance des anticorps jusqu'à la fin des lots par méthode ELISA (kit ID Screen Newcastle Disease Indirect, ID VET).

RESULTATS

Les résultats se sont avérés très encourageants : observation d'une augmentation du poids moyen de 3% (p-value = $7,74.10^{-5}$) et surtout une forte baisse du nombre de traitements antibiotiques de près de 40% (p-value = $1,31.10^{-5}$).

Tableau 1 : GMQ indicé à 100

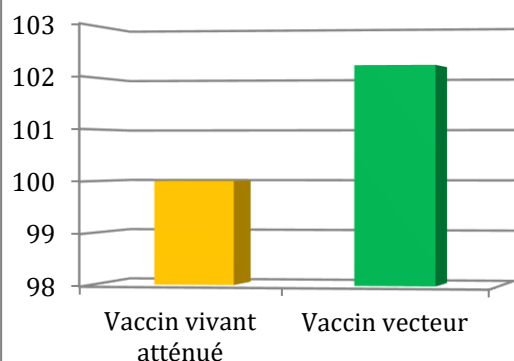


Tableau 2 : Poids moyens à l'abattage indicé à 100

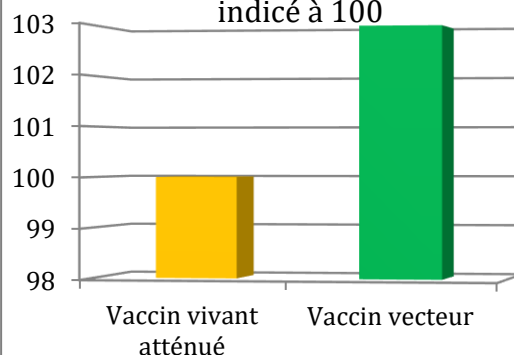
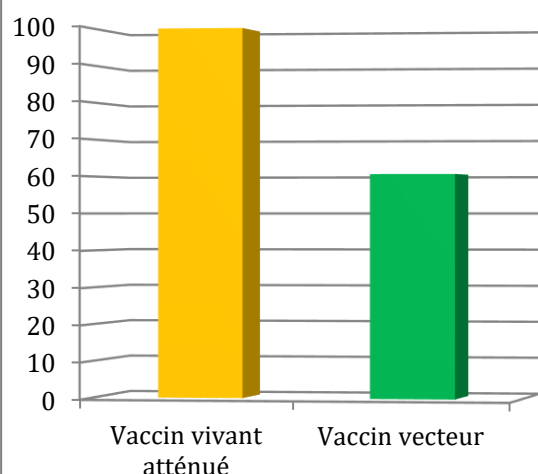
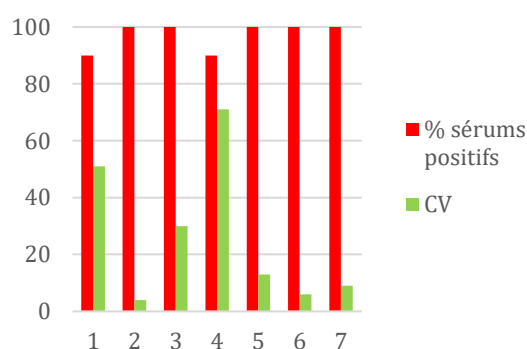


Tableau 3 : Nombre de traitements antibiotiques indicé à 100



De même les résultats sérologiques montrent une nette amélioration des séroconversions : avec les techniques de vaccination par pulvérisation, il était fréquent d'obtenir jusqu'à 60% de titres négatifs sur des séries de 15 prises de sang réalisées en fin de lot, et en l'absence de tout signe de passage viral sauvage. Dans le cadre de notre étude, 7 élevages ont été testés. Les résultats montrent des séroconversions très régulières. 2 élevages ont présenté un seul titre négatif sur 10, alors que les autres étaient positifs à 100% avec des CV compris entre 4 et 30% (cf. tableau de résultat n°4) :

Tableau 4 : % séroconversion PMV1 - CV Elisa Kit IDVET



CONCLUSION

Cette étude terrain a permis de mesurer l'intérêt d'une vaccination parfaitement maîtrisée, utilisant un vaccin vecteur recombinant quant à la sécurisation des lots de dindes vis-à-vis des infections à PMV1, mais aussi l'impact positif en terme de diminution de l'antibiothérapie (-40% de traitements antibiotiques) dans ces mêmes troupeaux. Il n'a pas été possible de comparer les deux protocoles au sein d'un même élevage, mais ce biais a été compensé par le choix aléatoire des lots de dindes et par leur grand nombre. La technique de la vaccination au couvoir permet d'obtenir une homogénéité de vaccination bien supérieure aux vaccinations pratiquées en élevage.

- (1) *Les mortalités en fin de lot en dinde médium : Enquête en élevage*, mémoire de fin d'études d'ingénieur par Amélie MALABOUS encadrée par M. Florian Bastit, MG2MIX et Dr Eric Chataigner, Chêne Vert Conseil.
- (2) Plume verte n°43 de septembre 2017 : « Attention aux dérives dans les élevages de dinde de chair » par Eric Chataigner, Chêne Vert Conseil.

AMELIORATION DU SUCCES DE VACCINATION CHEZ LE POULET DE CHAIR : EFFET D'UNE SUPPLEMENTATION EN EXTRAIT SEC DE RAISIN EN CONDITION D'INCONFORT THERMIQUE

Engler Paul¹, Alleno Christophe²

¹NOR-FEED SAS - 3 rue Amedeo Avogadro – 49070 BEAUCOUZE, ²ZOOTESTS SAS - Parc Technologique du Zoopôle - 22440 PLOUFRAGAN

paul.engler@norfeed.net

RÉSUMÉ

La vaccination représente un pilier majeur de la biosécurité en élevage. Plusieurs études ont montré l'impact négatif que pouvait avoir un stress thermique sur l'immunité chez *Gallus gallus domesticus*. L'utilisation d'antioxydants naturels est de plus en plus répandue en élevage pour aider les animaux à lutter contre le stress oxydatif engendré par le stress thermique. L'objectif de cette expérimentation était d'étudier l'impact d'une supplémentation du poulet de chair à l'aide d'un extrait sec de raisin (Nor-Grape®) sur le succès de vaccination. 360 poussins mâles de 1 jour étaient séparés aléatoirement en 2 groupes, contrôle (CTL, aliment standard) et supplémenté (NG, aliment CTL + 30ppm d'extrait sec de raisin, Nor-Grape®). Les poulets étaient soumis au programme de vaccination suivant : Gumboro et Bronchite infectieuse (BI). L'ensemble des oiseaux étaient exposés à un épisode d'inconfort thermique par une élévation de la température ambiante à 30°C de J14 à J19 inclus. Le jour de l'abattage, à J35, les animaux étaient tous pesés individuellement et des prélèvements sanguins étaient réalisés pour effectuer des titrages sériques d'anticorps circulant, spécifiques des vaccins utilisés. Les analyses ont montré que la supplémentation tendait à améliorer le succès de vaccination Gumboro ($p < 0,10$) et la proportion d'oiseaux immunisés par au moins un des deux vaccins était significativement plus élevée dans le groupe NG ($p < 0,05$). Ces résultats montrent qu'une telle supplémentation peut potentiellement jouer un rôle dans l'accompagnement de la vaccination, notamment lors de périodes d'inconfort thermique, afin d'améliorer le succès de la vaccination et de participer à la biosécurité des élevages.

ABSTRACT

Improvement of the vaccination success in broilers: Effect of a dietary supplementation with a dry grape extract in thermic discomfort conditions

Vaccination is a key aspect of biosecurity in farms. Several studies have shown the negative impact that heat stress can have on immunity in *Gallus gallus domesticus*. The use of natural antioxidants is more and more common to help livestock cope with oxidative stress caused by heat stress. The aim of this study was to assess the impact of supplementing broilers with a Dry Grape Extract (Nor-Grape® 80) on the success of vaccination. 360 day-old male chicks were randomly divided in two groups, control (CTL, standard diet) and supplemented (NG, diet CTL + 30ppm of Nor-Grape®). Broilers were vaccinated against Gumboro and Infectious Bronchitis (BI). All birds were exposed to a period of thermic discomfort by raising the building temperature to 30°C from D14 to D19 included. On slaughter day (D35), all birds were individually weighed and blood samples were drawn to measure specific antibody titers. Results showed that the supplementation tended to increase the success of vaccination against Gumboro ($p < 0,10$) and the proportion of birds immunized against at least one of the two vaccines was significantly higher in supplemented chickens ($p < 0,05$). These results evidence the potential interest of such a supplementation to support animals in periods of thermic discomfort, to improve the success of vaccination and therefore participate improving biosecurity in farms.

INTRODUCTION

Une situation de stress thermique correspond à un couple température/humidité situé hors de la plage de confort d'un animal. Les conséquences néfastes de ce phénomène ont été largement étudiées chez la volaille, notamment son impact sur les performances zootechniques des animaux.

En comparaison, peu d'études se sont penchées sur l'impact d'un tel phénomène sur l'immunité des volailles. Quelques auteurs ont cependant démontré qu'une situation de stress thermique est susceptible de conduire à une perturbation du fonctionnement normal du système immunitaire (Calefi *et al.* 2017). Ainsi, les travaux de Honda *et al.* (2014) ont montré que des conditions de stress thermique autour de la vaccination (Newcastle) entraînent une augmentation des niveaux sériques de corticostérone, lesquels induisent une diminution significative des immunoglobulines G (IgG) et des lymphocytes B et T circulants.

Afin de protéger au mieux les animaux, la maîtrise du stress thermique lors des protocoles de vaccination représente un pilier majeur de la biosécurité en élevage.

La lutte contre ce phénomène peut être menée à travers la maîtrise des conditions d'ambiance dans le bâtiment, mais lors d'épisodes particulièrement difficiles, le recours à des solutions nutritionnelles telles que des extraits de plantes riches en antioxydants permet d'aider l'animal à lutter contre les effets néfastes du stress thermique (Akbarian *et al.* 2016.).

Parmi ces solutions naturelles, plusieurs travaux ont montré l'intérêt d'une utilisation d'extrait sec de raisin en condition de stress thermique chez la volaille (Engler *et al.* 2016, Engler *et al.* 2017)

L'objectif de cette expérimentation était d'étudier l'impact d'une supplémentation du poulet de chair à l'aide d'un extrait sec de raisin (Nor-Grape®) sur le succès de vaccination en conditions thermiques défavorables.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Design expérimental

360 poussins mâles de 1 jour (46 ± 0.7 g) étaient séparés aléatoirement en 2 groupes, contrôle (« CTL », aliment standard) et supplémenté (« NG », aliment CTL + 30ppm d'extrait sec de raisin, Nor-Grape® 80), chacun composés de 12 cages de 15 animaux chacun, réparties de manière aléatoires et homogènes dans la station expérimentale. Les poulets

étaient soumis au programme de vaccination suivant : Gumboro (Gallivac® IBD, dans l'eau de boisson à J17), Bronchite infectieuse (BI, aérosol à J0 et J12, Gallivac® IB88). L'ensemble des oiseaux étaient exposés à un épisode thermique défavorable par une élévation de la température ambiante à 30°C de manière continue, de J14 à J19 inclus.

L'ensemble des poulets étaient pesés individuellement à J35. La consommation alimentaire de chaque case était mesurée sur toute la période. La mortalité était mesurée quotidiennement. L'indice de conversion (IC) ainsi que l'indice de production européen (IPE, Kryeziu *et al.* 2018) ont également été calculés.

$$\text{IPE} = (\text{gain moyen quotidien} \times \text{viabilité}) / (10 \times \text{IC})$$

1.2. Analyses biologiques

Le jour de l'abattage, à J35, des prélèvements sanguins étaient réalisés sur 2 poulets par cage, dans 9 cages par groupe (veine alaire), pour effectuer des titrages sériques d'anticorps circulants, spécifiques des vaccins utilisés (méthodes ELISA, LABOCEA, Ploufragan). Pour chaque méthode de titrage, une valeur seuil était renseignée par le laboratoire d'analyse (seuil de positivité, Gumboro : 1583, BI : 396). Les poulets ayant un titre en anticorps supérieur à cette valeur étaient considérés comme immunisés.

L'ensemble des mesures étaient réalisés en aveugle.

1.3. Analyses statistiques

La comparaison statistique des données zootechniques était réalisée à l'aide du t-test (logiciel R) et l'étude du succès de la vaccination (proportion de poulets considérés comme immunisés) à l'aide du Khi².

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Données zootechniques

Dans les conditions de réalisation de l'essai en station expérimentale, la supplémentation en extrait sec de raisin n'a pas montré de différence significative sur la croissance des poulets (2504g vs. 2517g pour CTL et NG respectivement, non significatif, Tableau 1). De la même manière, les différences numériques des paramètres globaux (GMQ, IC, IPE) n'ont pas montré de significativité statistique (Tableau 1).

2.2. Résultats sériques

La proportion de poulets immunisés était relativement faible dans les deux groupes pour le vaccin BI, mais numériquement plus élevée dans le groupe NG (44% vs. 33% pour CTL, ns, figure 1). De plus, la proportion d'oiseaux immunisés contre Gumboro tendait à être plus élevée dans le groupe NG que dans

le groupe CTL (67% vs. 39%, $p < 0,10$, χ^2 , Figure 1).

En outre, la proportion d'animaux étant immunisés par au moins un des deux vaccins était significativement plus élevée dans le groupe NG que dans le groupe CTL (83% vs. 50% respectivement, $p < 0,05$, χ^2 , Figure 2).

DISCUSSION

Différents travaux ont démontré l'effet négatif que peut avoir un stress thermique sur la réponse vaccinale chez l'espèce *Gallus gallus domesticus*, aussi bien en poulet de chair qu'en poule pondeuse. Ainsi, Mashaly *et al.* (2004) ont démontré qu'une exposition de poules pondeuses à un stress thermique élevé (35°C, 50% RH) pendant plusieurs semaines entraînait une diminution significative du titre en anticorps sériques et une augmentation du ratio hétérophiles/lymphocytes, démontrant ainsi une perturbation du système immunitaire. De la même manière, Honda *et al.* (2015), ont mis en avant le même phénomène chez le poulet de chair, chez lequel une exposition à un stress thermique (38°C pendant 12h/jour) induisait une diminution significative des IgG anti-Newcastle après 3 semaines d'exposition.

Quinteiro-Filho *et al.* (2010) rapportent également qu'une exposition des poulets de chair à un stress thermique intense (36°C) pendant leur dernière semaine d'élevage perturbe leur système immunitaire. Les auteurs ont ainsi montré une diminution des masses relatives de la rate, du thymus ou encore de la bourse de Fabricius chez les poulets exposés à un stress intense.

Calefi *et al.* (2017) indique notamment que les interactions entre stress thermique, stress oxydatif et

immunomodulation sont encore peu connues et nécessitent des travaux plus approfondis.

Des premiers résultats sur l'utilisation d'antioxydants tels que la vitamine C ont en effet montré un effet bénéfique sur la réduction de l'effet d'un stress thermique répété chez le poulet de chair, induisant une augmentation de la taille de la bourse de Fabricius et une réduction du taux de corticostéroïdes plasmatiques (Kolb & Seehawer, 2001).

Les résultats de cette étude vont en effet dans ce sens, car malgré une exposition plus courte, et moins intense à un inconfort thermique (30°C pendant une semaine), les proportions d'animaux immunisés dans le groupe CTL étaient relativement faibles (<50%). En outre, la supplémentation en extrait sec de raisin semble jouer un rôle dans le succès vaccinal en tendant à améliorer la proportion de poulets présentant un succès de vaccination Gumboro. De plus l'observation du succès global de vaccination montre un effet plus marqué de la supplémentation sur le succès vaccinal, notamment à travers une proportion plus élevée de poulets considérés comme immunisés contre au moins un des deux antigènes.

CONCLUSION

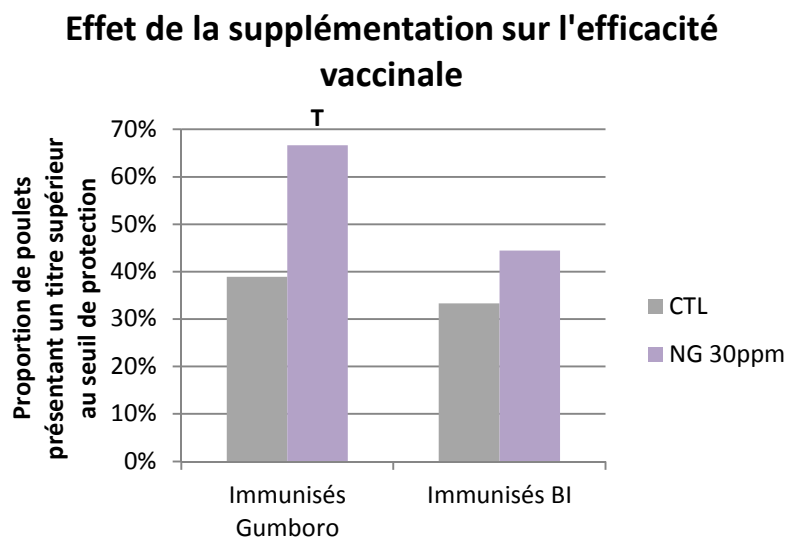
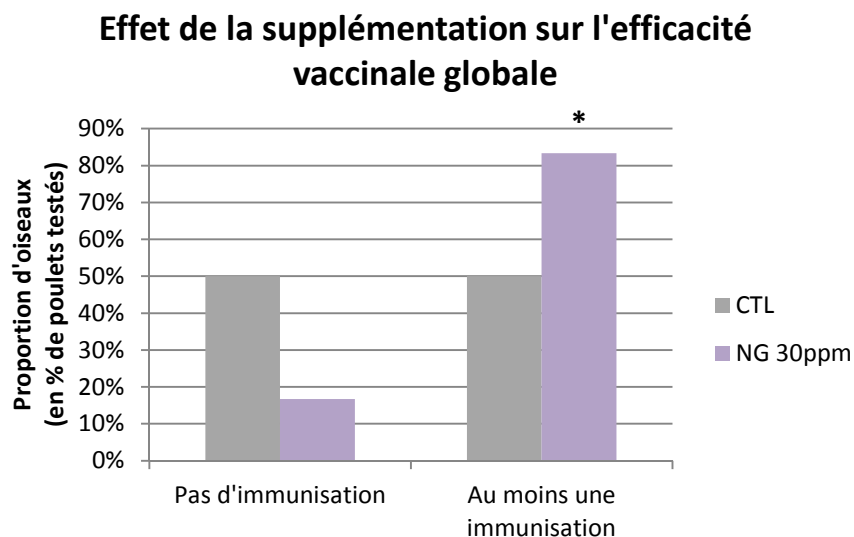
La plus grande proportion de poulets immunisés dans le groupe supplémenté tend à montrer que l'extrait sec de raisin testé peut potentiellement jouer un rôle dans l'accompagnement de la vaccination, notamment lors de période d'inconfort thermique, afin d'améliorer le succès de la vaccination et de participer à la biosécurité des élevages. Davantage de recherches sont nécessaires pour mieux comprendre les interactions des polyphénols qui composent le produit avec le système immunitaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akbarian, A., Michiels, J., Degroote, J., Majdeddin, M., Golian, A., De Smet, S., 2016, J. Anim. Sci. Biotech. (7).
- Calefi, A., Quinteiro-Filho, W., Ferreira, A., Palermo-Neto, J., 2017. World Poultry Sci J, (73), 3, 493-504
- Engler P., Fleury R., Marcelot N., Chicoteau P., 2017, Douzièmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Tours, les 5 et 6 avril, Tours, France
- Engler P., Takács A., Tessier N., P. Chicoteau, 2016, 20th Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition, 15-17 sept. Berlin, Germany
- Honda, B.T.B., Calefi, A.S., Costola-de-Souza, C., Quinteiro-Filho, W.M., Fonseca, da S., Garcia, J., Paula, D., Ferraz, V., Palermo-Neto, J., 2015. Poult Sci (94), 10, 2375-2381
- Kryeziu A.J., Mestani N., Berisha Sh., Kamberi M.A., 2018, Agronomy Research, 16 (2), 483-491
- Kolb E., Seehawer J., 2001, Arch. Geflügelk. 65 (3), 106- 113
- Mashaly, M.M., Hendricks, G.L., Kalama, M.A., Gehad, A.E., Abbas, A.O., Patterson, P.H., 2004. Poult Sci 83, 889-89
- Quinteiro-Filho, W.M., Ribeiro, A., Ferraz-de-Paula, V., Pinheiro, M.L., Sakai, M., Sa, L.R.M., Ferreira, A.J.P., Palermo-Neto, J., 2010. Poult. Sci. 89, 1905-1914.

Tableau 1. Performances zootechniques des deux groupes.

	PV J0 (g)	PV J35 (g)	GMQ J0-J35	Conso J0-J35	IC J0-J35	Viabilité J0-J35	IPE J0-J35
CTL	46	2504	70.1	113.1	1.61	92.8%	405
NG	46	2517	70.6	112.8	1.60	92.2%	407
p-value	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Figure 1. Effet de la supplémentation sur l'efficacité vaccinale spécifique ($T=p<0,10$, Khi²)**Figure 2.** Effet de la supplémentation sur l'efficacité vaccinale globale (*= $p<0,05$, Khi²)

SYNDROME DES ŒUFS A EXTREMITÉ DE VERRE : COMPARAISON DE LOTS DE POULES PONDEUSES VACCINÉES OU NON AVEC UN AUTOVACCIN.

Gautier-Bouchardon A.V.^{1,2}, Ferré S.^{1,2}, Balan O.^{1,2}, Kempf I.^{1,2}

¹Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (Anses), Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Mycoplasmaologie-Bactériologie et Antibiorésistance, Ploufragan, France.

²Université Bretagne Loire, Rennes, France.
anne.bouchardon@anses.fr

RÉSUMÉ

Mycoplasma synoviae (MS) provoque des infections sub-cliniques des voies respiratoires supérieures et des synovites infectieuses chez la poule et la dinde, et le syndrome des œufs à extrémité de verre chez la poule pondeuse. L'injection d'un autovaccin (souche autogène tuée) a été réalisée dans un élevage touché par le syndrome, sur 6000 poules de 39 semaines (lot A) et de 50 semaines (lot B). Des écouvillonnages (trachéaux (ET) et cloacaux (EC)) et des prises de sang ont été réalisés tous les 15 jours pendant 2,5 mois chez les poules vaccinées et non. Le pourcentage d'œufs déclassés a été calculé chaque mois. Les cultures ont été effectuées en milieu FM4 liquide et analysées avec une PCR spécifique de MS. Les sérums ont été testés par agglutination rapide sur lame (ARL) et ELISA. De grandes variations ont été observées au cours du suivi au niveau du pourcentage d'ET ou d'EC positifs, sans différence significative entre les lots A et B et les poules vaccinées et non vaccinées dans chacun de ces deux lots. Une diminution globale significative du nombre d'œufs déclassés a été observée dans les groupes vaccinés. Une différence significative a été observée entre l'ARL et l'ELISA, avec respectivement 16,7 à 93,3% et 73,3 à 100% des poules séropositives par ARL et ELISA. Une dilution systématique au 1/5 et une décomplémentation des sérums avant le test ARL ont éliminé cette différence. Ces résultats suggèrent que la vaccination avec une souche autogène tuée ne permet pas de réduire l'infection par MS chez les poules mais peut permettre de réduire le pourcentage d'œufs déclassés. Les différences observées entre les tests ARL classiques et modifiés montrent l'importance du choix des techniques de diagnostic utilisées pour détecter les infections par MS.

ABSTRACT

Eggshell apex abnormality syndrome: comparison between groups of laying hens vaccinated or not with an autogenous killed strain.

Mycoplasma synoviae (MS) causes subclinical upper respiratory infection and infectious synovitis in broilers and turkeys, and is responsible for eggshell apex abnormalities in layer flocks. Inoculation with an autogenous vaccine was performed in a laying-hen farm after an increase in eggshell breakage was noted in two flocks. Vaccination was performed on 6000 39 week-old hens (flock A) and 50 week-old hens (flock B). Tracheal (TS) and cloacal (CS) swabs and blood samples were collected every two weeks for 2.5 months from vaccinated and unvaccinated hens. The percentage of downgraded eggs was also calculated every month for each group. Cultures were performed in FM4 broth medium. TS, CS and cultures were also analysed by a MS-specific PCR. Blood samples for MS serology were tested by rapid plate agglutination (RPA) and ELISA. MS was isolated from TS and CS, but large variations were observed in the percentage of MS-positive TS and CS at different times during the follow-up, without an overall significant difference between groups. Detection of MS was significantly higher in TS than in CS swabs in the two flocks. However, a marked increase in the number of MS-positive CS was observed in all groups of hens between one and two months after the start of the monitoring. The percentage of downgraded eggs varied over time, but the results showed an overall significant decrease in the number of downgraded eggs in groups of vaccinated hens. A significant difference was observed between results of the two serological tests, with 16.7 to 93.3% and 73.3 to 100% of MS-positive hens by RPA and ELISA, respectively. A systematic 1/5 dilution and decomplexation of all sera before the RPA test eliminated this difference. These results suggest that vaccination with an autogenous killed strain does not reduce MS infection in hens but may reduce the percentage of downgraded eggs. These results show the importance of the diagnostic techniques used to detect MS infections in laying hens.

INTRODUCTION

Mycoplasma synoviae (MS) provoque des infections subcliniques des voies respiratoires supérieures (entraînant des diminutions des performances zootechniques dans les troupeaux) et des synovites infectieuses (arthrites, boiteries) chez la poule et la dinde (Fergusson-Noel et Noormohammadi, 2013). MS est également responsable du syndrome des œufs à extrémité de verre (EAA, pour eggshell apex abnormalities) dans les troupeaux de poules pondeuses. Ce syndrome est à l'origine d'anomalies de l'apex de la coquille de l'œuf (Feberwee *et al.*, 2009a). Les pertes économiques sont principalement dues à la casse, à la dégradation des œufs et à l'augmentation des coûts de main-d'œuvre engendrés par les temps accrus de tri et de nettoyage des installations dans les élevages et les centres de conditionnement (Gautier-Bouchardon, 2012). L'EAA a été signalé dans plusieurs pays (Feberwee et Landman, 2008).

Les traitements antibiotiques (tétracycline ou tylosine) réalisés dans les élevages atteints par l'EAA permettent de faire diminuer significativement le taux d'œufs déclassés de façon transitoire, mais les signes cliniques réapparaissent quelques jours après l'arrêt des traitements. Des autovaccins et des vaccins commerciaux sont également utilisés pour lutter contre l'EAA mais peu d'études sont disponibles. La vaccination avec le vaccin vivant atténué MS-H permet de réduire d'environ 50% le taux d'œufs déclassé (Feberwee *et al.*, 2009b).

Une étude sur le terrain a été menée dans un élevage français de poules pondeuses pour suivre la réponse à un vaccin autogène après des problèmes croissants de fragilité de coquilles avec observation d'œufs à extrémité de verre dans deux lots de cet élevage.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Vaccination et prélèvements effectués dans les différents lots

L'autovaccin a été préparé à partir d'une souche de *M. synoviae* isolée dans un élevage à partir d'un écouvillonnage cloacal d'une poule dans un lot atteint par le syndrome EAA.

Une injection unique de l'autovaccin dans le même élevage a été réalisée sur 6000 poules de 39 semaines (lot A) et 6000 poules de 50 semaines (lot B). Toutes les autres poules des deux lots n'ont pas été vaccinées (46000 poules par lot).

Différents prélèvements ont été effectués tous les 15 jours pendant 2,5 mois chez les poules vaccinées et non vaccinées des deux lots. Des écouvillonnages trachéaux et cloacaux ont été réalisés pour effectuer des isollements bactériologiques ou des PCR. Des prises de sang au niveau de la veine alaire ont

également été réalisées pour la recherche d'anticorps anti-*M. synoviae* dans les sérums. Les prélèvements ont été réalisés sur 30 poules prises au hasard dans les différents lots, vaccinés ou non vaccinés.

Le pourcentage d'œufs déclassés a également été calculé chaque mois.

Aucun traitement antibiotique n'a été mis en place durant toute la durée de ce suivi.

1.2. Traitement des prélèvements au laboratoire

Les écouvillonnages trachéaux et cloacaux ont été placés dans 2 mL d'eau peptonée tamponnée et vortexés. Ces suspensions initiales ont ensuite été utilisées pour effectuer en parallèle :

- des mises en culture : quatre dilutions de raison 10 en milieu de culture liquide FM4 (Frey *et al.*, 1968) supplémenté avec des antibiotiques, pour limiter la croissance de contaminants ;

- des tests PCR spécifiques de *M. synoviae* (PCR-MS, Lauerma *et al.*, 1993) après une étape de lyse (Kellog et Kwok, 1990).

La croissance des mycoplasmes en milieu de culture a été détectée par virage du milieu de culture (dû à leur activité métabolique). La présence de *M. synoviae* dans les cultures virées a été confirmée ou infirmée par mise en culture sur milieu FM4 gélosé et par PCR-MS.

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

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

- une technique ARL modifiée (ARL dilution) : dilution et décomplémentation systématique de tous les sérums avant la mise en présence des sérums et de l'antigène ;

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

2. RESULTATS ET DISCUSSION

M. synoviae a été isolé à partir d'écouvillonnages trachéaux et cloacaux dans tous les lots de poules pondeuses, vaccinées ou non. Cependant, de grandes variations ont été observées au cours du suivi au

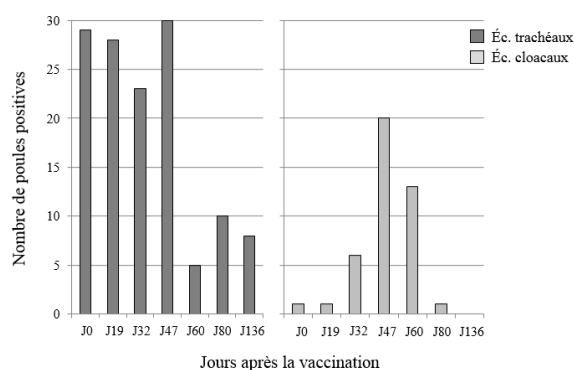
niveau du pourcentage d'écouvillonnages trachéaux ou cloacaux positifs (Figure 1), sans différence significative entre les lots A et B et les poules vaccinées et non vaccinées dans chacun de ces deux lots. *M. synoviae* a été détecté de façon significativement plus élevée dans les écouvillons trachéaux que dans les écouvillonnages cloacaux pour la plupart des dates d'échantillonnage.

Une diminution du nombre d'écouvillonnages trachéaux positifs a été mise en évidence en fin de suivi (à partir de J60, Figure 1), sans relation avec la vaccination (résultats similaires chez les poules vaccinées ou non vaccinées) un traitement antibiotique (pas de traitement administré pendant toute la durée du suivi).

Une augmentation marquée du nombre d'écouvillonnages cloacaux positifs vis-à-vis de *M. synoviae* a été temporairement observée, entre J32 et J60, dans les deux lots, à partir de poules vaccinées ou non (Figure 1).

Ces différents résultats suggèrent que la vaccination avec une souche autogène tuée n'a pas d'effet sur l'infection des poules pondeuses au niveau trachéal ou cloacal par *M. synoviae*. Ils sont en accord avec ceux de Feberwee et collaborateurs (2017) qui ont montré que la quantité de *M. synoviae* excrétée par des poules vaccinées avec le vaccin vivant atténué commercial MS-H et celle excrétée par des poules non vaccinées étaient identiques.

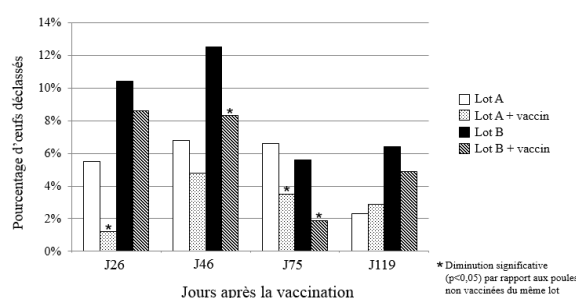
Figure 1. Détection de *M. synoviae* par une PCR spécifique à partir des écouvillonnages trachéaux et cloacaux des poules pondeuses non vaccinées du lot A. Des résultats similaires ont été obtenus pour les poules vaccinées du lot A et pour les poules vaccinées ou non vaccinées du lot B.



Le pourcentage d'œufs déclassés (œufs cassés ou souillés) a varié au cours du temps : entre 1,5 et 12,5 % en fonction des lots, avec un taux de déclasserment plus élevé dans le lot B (pour trois des quatre dates de calcul de ce pourcentage au cours du suivi) (Figure 2). Cette différence pourrait être dû au fait que les poules du lot B étaient plus âgées de 11 semaines par rapport au lot A, avec des signes cliniques plus marqués et présents dans ce lot depuis plus longtemps.

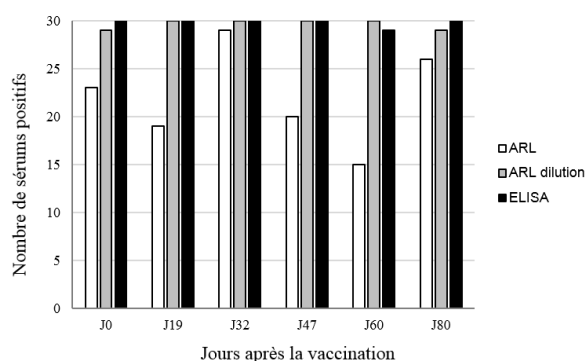
Les résultats ont cependant montré une diminution globale (et significative pour certaines dates du suivi) du nombre d'œufs déclassés chez les poules vaccinées par rapport aux poules non vaccinées dans les deux lots (Figure 2), suggérant un effet de la vaccination. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Feberwee *et al.* (2009b) qui ont montré une diminution d'environ 50 % du pourcentage d'œufs déclassés dans des lots de poules exemptes d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) vaccinées par le vaccin MS-H puis infectées expérimentalement par *M. synoviae* comparées à des poules non vaccinées.

Figure 2. Pourcentage d'œufs déclassés dans les deux lots de poules pondeuses, vaccinées ou non.



La comparaison des différents tests sérologiques a mis en évidence une différence significative, dans tous les lots, chez les poules vaccinées ou non vaccinées, entre les résultats de l'ARL et de l'ELISA, avec respectivement 16,7 à 93,3 % et 73,3 à 100 % des poules séropositives par ARL et ELISA (Figure 3). Une dilution systématique au 1/5 suivie d'une décomplémentation des sérums avant de mettre en œuvre le test ARL ont éliminé cette différence, avec 66,7 à 100 % des poules positives avec ce test ARL modifié (Figure 3).

Figure 3. Comparaison de trois méthodes sérologiques pour détecter des anticorps spécifiques de *M. synoviae* dans les sérums des poules non vaccinées du lot A. Des résultats similaires ont été obtenus dans les deux lots de poules, vaccinées ou non, et avec les deux antigènes disponibles dans le commerce (Soleil SARL et Biovac).



Cette différence entre tests sérologiques a déjà été mise en évidence au sein de notre laboratoire dans d'autres élevages de poules/poulets infectés par *M. synoviae* ou *M. gallisepticum* (Gautier *et al.*, 2017) et pourrait être à l'origine de la non détection d'animaux positifs (faux négatifs) par la méthode ARL sur le terrain. Cette différence pourrait être due à un effet prozone, décrit lorsque des concentrations élevées d'immunoglobulines sont présentes dans le sérum, et qui disparaît en effectuant une dilution des sérums à tester (Butch, 2000).

CONCLUSION

Ces résultats suggèrent que la vaccination avec une souche autogène tuée ne permet pas de réduire l'infection par *M. synoviae* dans des lots de poules pondeuses atteintes par le syndrome EAA, mais peut permettre de réduire le pourcentage d'œufs déclassés. Les différences observées entre les tests ARL classiques et modifiés montrent l'importance du choix des techniques de diagnostic utilisées pour détecter les infections par *M. synoviae*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Butch A.W., 2000. Clin Chem., 46 : 1719–1721.
- Feberwee A., Landman, 2008. World Poultry, 24, 22-23.
- Feberwee A., de Wit J.J., Landman W.J., 2009a. Avian Pathol., 38 (1), 77-85.
- Feberwee A., Morrow C.J., Ghorashi S.A., Noormohammadi A.H., Landman W.J., 2009b. Avian Pathol., 38 (5), 333-340.
- Feberwee A., Dijkman R., Klinkenberg D., Landman W.J., 2017. Avian Pathol., 46 (4) :346-358.
- Fergusson-Noel N., Noormohammadi A., 2013. In Diseases of poultry (Swayne D.E. *et al.*, Eds.), Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA. p. 877-893.
- Frey M.L., Hanson R.P., Anderson D.P., 1968. Am. J. Vet. Res., 29, 2163-2171.
- Gautier-Bouchardon A.V., 2012. Le Nouveau Praticien Vétérinaire, 5 (20), 40-43.
- Kellog, D.E., Kwok, S., 1990. In PCR Protocols (Innis M.A. *et al.*, Eds.). Academic Press, San Diego, USA, pp. 337-347.
- Lauerman L.H., Hoerr F.J., Sharpton A.R., Shah S.M., Van Santen V.L., 1993. Avian Dis., 37, 829-834.
- Manuel terrestre de l'OIE, 2008. pp 525-541.
- Norme NF U47-012, 2009. AFNOR.

L'HUILE ESSENTIELLE D'ORIGAN DANS L'ALIMENT EST-ELLE COMPATIBLE AVEC LA VACCINATION ANTI-COCCIDIENNE DES POULETS DE CHAIR ?

Harrington David¹; Wakeman Wendy¹; Mathis Greg²

¹ Anpario plc, UK, Manton Wood, Worksop, Nottinghamshire, S802RS, UK,

² Southern Poultry Research Inc, 96 Roquemore Rd, Athens, GA 30607, USA

wendy.wakeman@anpario.com

RESUME

L'objectif de cette étude était de déterminer l'effet d'un produit contenant de l'huile essentielle d'origan (OEO) ajouté dans l'alimentation sur l'efficacité d'un vaccin *Eimeria* chez les poulets de chair. Au total, 1050 poulets Cobb ont été répartis aléatoirement en 3 groupes de traitement (50 oiseaux/répétition, 7 répétitions/traitement): VACC - Vaccin; OEO (300g/t); SAL/OEO - Salinomycine (66g/t), OEO (150g/t). Les oiseaux ont été vaccinés par pulvérisation en couvoir avec une dose unique du vaccin *Eimeria* (HatchPac Cocci III (Merial, USA)) au jour 0. L'essai a duré 42 jours. Les oiseaux ont été élevés dans des enclos au sol sur une litière propre. Des échantillons de litière ont été collectés chaque semaine pour le dénombrement des oocystes (OPG). A J 21, 5 oiseaux/enclos ont été transférés dans des cages (35 oiseaux/traitement) et soumis à une épreuve orale avec une infection mixte à *Eimeria*. Des oiseaux sans coccidie ont été utilisés comme contrôle positif (POS). A J 27, les oiseaux ont été euthanasiés et leur lésion coccidienne notée (LS). Les données ont été analysées via ANOVA. Le gain de poids corporel dans le lot VACC (2,373 kg) était significativement inférieur à celui du lot SAL/OEO (2,523 kg); OEO (2,394kg) n'était pas différent des deux autres traitements. L'indice de consommation était significativement plus élevé dans les lots VACC (1,758) et OEO (1,731) par rapport au lot SAL/OEO (1,674). Le score lésionnel était significativement plus bas dans tous les traitements par rapport au POS (2,595). LS des lots VACC et OEO ne différait pas significativement (1,288 et 1,475, respectivement) tandis que SAL/OEO (1,646) était significativement plus élevé que VACC. L'OPG de VACC (7421) a culminé au jour 21, sensiblement supérieur à SAL/OEO (267). OEO n'a eu d'écart significatif avec aucun des groupes (3118). En conclusion, l'inclusion de l'OEO dans les aliments pour volailles peut accroître les performances des oiseaux vaccinés par *Eimeria* sans aucun effet indésirable sur le développement de l'immunité contre les coccidies. L'utilisation d'OEO en association avec un vaccin *Eimeria* ou un ionophore offre un outil alternatif potentiel dans la gestion de la coccidiose.

ABSTRACT

Oregano essential oil in-feed is compatible with anti-coccidial vaccination in broilers

The objective of this study was to determine the effect of an oregano essential oil (OEO) product in feed on the efficacy of an *Eimeria* vaccine in broilers. A total of 1050 Cobb broilers were randomly allocated to one of 3 treatment groups (50 birds/replicate, 7 replicates/treatment): VACC – Vaccine; OEO – OEO (300g/t); SAL/OEO – Salinomycin (66g/t), OEO (150g/t). Birds were vaccinated via hatchery spray with a single dose of *Eimeria* vaccine (HatchPac Cocci III (Merial, USA)) on day 0. The trial lasted from 0-42 days. Birds were reared in floor pens on clean litter. Litter samples were collected weekly for oocyst enumeration (OPG). On day 21, 5 birds/pen were moved to cages (35 birds/treatment) and challenged orally with a mixed *Eimeria* infection. Coccidia-free birds were used as a Positive Control (POS). On Day 27 birds were euthanized and coccidial lesion scored (LS). Data were analyzed via ANOVA. Body weight gain in VACC (2.373kg) was significantly lower than SAL/OEO (2.523kg); OEO (2.394kg) did not differ from either treatment. FCR was significantly higher in both VACC (1.758) and OEO (1.731) versus SAL/OEO (1.674). LS was significantly lower in all treatments versus POS (2.595). LS in VACC and OEO did not differ significantly (1.288 and 1.475, respectively) while SAL/OEO (1.646) was significantly higher than VACC. OPG showed a peak count in VACC (7421) on Day 21 which was significantly greater than in SAL/OEO (267). OEO was not different to either treatment (3118). In conclusion, the inclusion of OEO in poultry feed can improve the performance of *Eimeria* vaccinated birds with no adverse effect on the development of coccidial immunity. The use of OEO in combination with an *Eimeria* vaccine or an ionophore offers another potential tool in the management of coccidiosis.

INTRODUCTION

La coccidiose aviaire est une pathologie majeure chez les poulets de chair causée par sept espèces d'*Eimeria*. L'utilisation des vaccins vivants et/ou des ionophores, soit seul soit combinés, permet de lutter contre ces parasites et de réduire leur impact. Annuellement, cette maladie coûte à la filière entre 2 et 3 milliards de dollars (Park et Chapman, 2011), et représente 95% des pertes de la filière chair au niveau mondial (Williams, 1999). Cette étude a été menée afin d'évaluer l'effet d'un phytonutriments (l'huile essentielle d'origan), en combinaison soit avec un vaccin atténué contre l'*Eimeria* soit un ionophore, sur la performance des poulets de chair et leur susceptibilité à la coccidiose. L'huile d'origan (*Origanum vulgare*) est composée de trois phénols actifs principaux : carvacrol, thymol, γ -terpinène et *p*-cymène. Ces trois composés, possédant à la fois des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes, ont aussi démontré avoir un effet anti-inflammatoire chez les volailles (Lu *et al.* 2014, Mohiti-Asli et Ghanaatparast-Rashti, 2015).

MATERIELS ET METHODES

1050 poulets Cobb ont été répartis aléatoirement en 3 groupes de traitement, avec 50 oiseaux/répétition et 7 répétitions/traitement. Les trois traitements ont été les suivants: VACC – Vaccin, régime standard de démarrage, croissance et finition ; OEO – régime standard de démarrage, croissance et finition avec l'inclusion de 300g/tonne d'une huile essentielle d'origan (Orego-Stim®, Anpario plc, UK - OEO); SAL / OEO – régime standard avec l'inclusion de Salinomycine (Sacox® Huvepharma NV, Belgique) (66g/t) et l'huile essentielle d'origan (150g/t). Les oiseaux ont été vaccinés par pulvérisation au couvoir avec une dose du vaccin *Eimeria* (HatchPac Cocci III (Merial, USA)) au jour 0.

L'essai a duré 42 jours. L'aliment de démarrage a été donné de 0 à 21 jours. Au jour 21, l'aliment de démarrage non-consommé a été pesé et jeté. L'aliment de croissance était ensuite fourni jusqu'à J35, où l'aliment non-consommé était pesé et jeté. L'aliment de finition a été donné jusqu'à J42, puis il a subi le même traitement que les aliments de démarrage et de croissance.

Les poulets ont été pesés quatre fois : jours 0, 21, 28 et 42. Au jour 21, 5 oiseaux/enclos ont été transférés dans des cages (35 oiseaux/traitement) et soumis à une épreuve orale avec une infection mixte de *E. acervulina* (100 000), *E. maxima* (75 000) et *E. tenella* (50 000). Six jours plus tard, ces sujets ont été euthanasiés et leur lésion coccidienne notée (LS) pour le degré d'infection de *E. acervulina*, *E. maxima* et *E.*

tenella, selon l'échelle de Johnson et Reid (1970), où 0 est normal et 4 représente une infection sévère. Un groupe d'oiseaux sans coccidia a été utilisé comme contrôle positif (POS).

Les données ont été analysées via ANOVA (JMP v13.2.1 SAS Institute Inc. USA), utilisant la moyenne par lot et $p < 0,05$ comme niveau de significativité.

RESULTATS ET DISCUSSION

Croissance/Prise de poids

Au jour 42, la prise de poids était significativement plus basse chez les VACC (2,373kg) et OEO (2,394kg) comparée à SAL/OEO (2,523kg) (Tableau 1) ; il n'y a pas eu d'écart significatif entre OEO et les deux autres groupes. Aucune autre différence de poids n'a été notée pendant l'essai.

Indice de consommation

Au jour 42, l'indice de consommation (IC) significativement plus élevée dans VACC (1,758) et OEO (1,731) comparés à SAL/OEO (1,674). Aucune autre différence d'IC n'a été relevée pendant l'essai, et il n'y a pas eu de différence de consommation entre les groupes.

Lésions coccidiennes

La moyenne des notes LS dans le POS (2,595) était significativement plus élevée comparée aux autres traitements ; VACC (1,288) avait moins de lésions que SAL/OEO (1,646). Il n'y a pas eu d'écart significatif entre OEO et les deux autres groupes (1,475). (Tableau 1).

Dénombrement des oocystes

Le nombre d'oocystes par gramme (OPG) en litière humide pour le groupe SAL/OEO était faible pendant toute la période d'essai. L'OPG de VACC (7421) a culminé au jour 21, sensiblement supérieur à SAL/OEO (267). OEO n'a eu d'écart significatif avec aucun des groupes. (Tableau 2). Le pic d'OPG pour OEO était au jour 14 (2275) et au jour 42 pour SAL/OEO (357).

Il y a eu un effet du temps sur la prévalence des trois espèces d'*Eimeria* utilisés dans le challenge. A J14, *E. acervulina* était la plus prédominante, tandis qu'à J21, les prévalences d'*E. acervulina* et *E. maxima* étaient équivalentes. Aux jours 28 et 35, *E. maxima* était la souche prédominante d'oocystes trouvée dans les matières fécales.

Mortalité

Il n'y a pas eu de différence entre la mortalité des trois groupes (10,36%, 13,21% et 12,50% pour VACC, OEO et SAL/OEO respectivement).

CONCLUSIONS

L'utilisation de l'huile essentielle d'origan en combinaison avec un ionophore (SAL/OEO) a amélioré la croissance et l'indice de consommation des poulets de chair, comparé à la vaccination seule (VACC) ou en combinaison avec l'huile essentielle d'origan (OEO).

Inversement, les lésions coccidiennes (LS) étaient sensiblement supérieur pour SAL/OEO comparés à VACC, d'ailleurs l'OEO n'a eu d'écart significatif avec aucun des groupes, indiquant que l'utilisation d'un ionophore pourrait augmenter le nombre de lésions dans l'intestin.

L'excrétion des oocystes dans des matières fécales suivant un challenge *Eimeria* s'est vu le plus élevé au jour 21, et VACC était sensiblement supérieur à SAL/OEO. Les poulets de chair dans le groupe OEO

ne présentaient pas de différence significative au VACC ou SAL/OEO, indiquant que OEO en combinaison avec un vaccin pourrait réduire le nombre d'oocystes dans la litière.

L'utilisation de l'huile essentielle d'origan chez des poulets de chair pourrait être un outil naturel à utiliser en parallèle avec un vaccin ou un ionophore dans la lutte contre la coccidiose; ce dernier mérite des recherches plus approfondies.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Johnson J., Reid W.M., 1970. Exp. Parasitol. 28(1):30-36
 Lu H., Adedokun S.A., Adeola L., Ajuwon K.M., 2014. Poult. Sci. 51:14-21
 Mohiti-Asli M., Ghanaatparast-Rashti M., 2015. Prev. Vet. Med. 120(2):195-20.
 Peek H.W., Landman W.J.M., 2011. Vet. Q. 31:143-161
 Williams R.B., 1999. Int. J. Parasitol. 29:1209-1229

Tableau 1. Prise de poids moyenne, IC et LS des poulets de chair traités avec un vaccin atténué *Eimeria* seul (VACC) ou avec de l'huile essentielle d'origan (OEO) incluse dans l'aliment, ou avec un ionophore plus l'huile essentielle d'origan (SAL/OEO). Des poulets sans *Eimeria* étaient utilisés comme contrôle positif (POS) pour la notation des lésions (POS). Un exposant dans la même ligne dénote une différence statistiquement significative.

	VACC	OEO	SAL/OEO	POS	SEM	P-value
Gain de poids (kg)	2.373 ^a	2.394 ^a	2.523 ^b	-	0.0338	0.012
IC	1.758 ^a	1.731 ^a	1.674 ^b	-	0.0103	<0.001
LS (0-4)	1.288 ^c	1.475 ^{bc}	1.646 ^b	2.595 ^a	0.0738	<0.001

Tableau 2. L'effet du temps sur l'excrétion des oocystes par gramme dans les matières fécales des poulets de chair ayant reçu un vaccin atténué *Eimeria* seul (VACC), ou avec de l'huile essentielle d'origan dans l'aliment (OEO), ou avec un ionophore plus l'huile essentielle d'origan dans l'aliment (SAL/OEO). Un exposant dans la même ligne dénote une différence statistiquement significative.

JOUR	VACC	OEO	SAL/OEO	SEM	P-value
7	64 ^a	0 ^b	12 ^{ab}	17.6	0.043
14	5220 ^a	2275 ^{ab}	74 ^b	1204.1	0.024
21	7421 ^a	3118 ^{ab}	267 ^b	1556.4	0.015
28	2611	1720	384	1072.3	0.357
35	641	624	500	182.3	0.838
42	119	205	357	124.0	0.405

DETERMINATION DES VALEURS DE REFERENCE DE 14 CONSTITUANTS BIOCHIMIQUES SANGUINS CHEZ DES POULETS DE CHAIR DE LA SOUCHE ARBOR ACRES

Arzour- Lakehal. Nedjoua¹, Boudebza. Assia¹, Jaillardon. Laititia²*

¹ *laboratoire PADESCA. ISV El khroub. Université des frères Mentouri. Constantine. Algérie.*

² *LDH vet. ONIRIS. Nantes. France.*

* Auteur Correspondant: arzourne@gmail.com

RÉSUMÉ

Le but de cette étude est de proposer une démarche pratique afin de déterminer des valeurs de référence pour les variables biochimiques sanguines dosées chez des poulets de chair de la souche Arbor Acres jeunes (moins de 1 mois) et adultes (plus d'un mois). À 14, 21, 28, 35, 42, 57 jours, vingt oiseaux ont été sacrifiés par décapitation. Le sang pour analyse a été prélevé au niveau de la veine jugulaire, séparé par centrifugation, puis analysé immédiatement. L'influence de l'âge a été significative pour la majorité des analytes étudiés. Une diminution significative de la glycémie, cholestérolémie, triglycéridémie, phosphatémie, magnésiémie, sidérémie et kaliémie liée à l'âge a été observée. En revanche, une augmentation significative des protéines totales, du calcium et de l'ASAT a été obtenue. Les autres variables n'ont pas différé entre les deux âges. Afin de proposer des valeurs de référence, nous avons utilisé le logiciel Reference Value Advisor qui permet de calculer des limites de référence en utilisant différentes méthodes: non paramétrique, paramétrique et robuste, avec ou sans transformation Box-Cox des valeurs. Le calcul séparé des intervalles de référence pour les animaux jeunes et adultes a été nécessaire pour la plupart des variables estimées car elles n'ont pas suivi une distribution Gaussienne. Les intervalles de référence sont donc présentés pour les deux âges en utilisant la méthode non paramétrique pour l'acide urique, la créatinine, le sodium et les chlorures. La méthode robuste a été utilisée pour toutes les autres variables. Les intervalles de référence proposés seront un guide utile pour interpréter les variations biochimiques chez le poulet de chair et ainsi permettre de détecter des processus pathologiques.

ABSTRACT

Establishment of reference values of 14 biochemical blood constituents in Arbor Acres chickens

The purpose of this study is to propose a practical approach to determine reference values for blood biochemical variables assayed in young Arbor Acres chickens (less than 1 month) and adult Arbor Acres chickens (more than 1 month old). At 14, 21, 28, 35, 42, 57 days, twenty birds were sacrificed by decapitation. Blood for analysis was taken from the jugular vein, separated by centrifugation, and immediately analyzed. The influence of age was significant for most of the studied variables. A significant decrease in blood glucose, cholesterol, triglycerides, phosphorus, magnesium, potassium was observed. In contrast, a significant increase in total protein, calcium and ASAT was obtained. The other variables did not differ between the two ages. In order to propose reference values, we used Reference Value Advisor software that allows the calculation of reference limits using different methods: non-parametric, parametric and robust, with or without Box-Cox transformation of the values. Separate calculation of reference intervals for young and adult animals was required for most of the estimated parameters. Not all variables followed a Gaussian distribution. Reference ranges are therefore presented for both ages using the non-parametric method for uric acid, creatinine, sodium and chloride. The robust method was used for all other variables. The proposed reference intervals will be a useful guide for interpreting biochemical variations in broiler chickens and thus to detect pathological processes.

INTRODUCTION

Les intervalles de référence sont utilisés pour interpréter les mesures biologiques. Ces valeurs représentent les mesures que l'on est susceptible de trouver chez des animaux sains en fonction de leur état physiologique ; elles doivent permettre de détecter les processus pathologiques. Reference Value Advisor est un logiciel à utiliser avec Microsoft Excel pour calculer les limites de référence à l'aide de différentes méthodes ; non paramétrique, paramétrique et robuste, avec ou sans transformation Box-Cox des valeurs (Geffré et al., 2011). Le profil biochimique sanguin du poulet de chair a été examiné dans plusieurs études, mais les valeurs obtenues sont extrêmement variables, les souches utilisées étant différentes, les conditions d'élevage ainsi que les méthodes biochimiques utilisées n'étant pas obligatoirement mentionnées (Bowes et al., 1989; Arslan et al., 2001 ; Silva et al., 2007). Par conséquent, l'objectif de ce travail est d'établir des intervalles de référence pour des indices biochimiques chez 2 groupes d'âge de poulets de chair (jeunes et adultes) de la souche lourde Arbor Acres à l'aide du logiciel Reference Value Advisor version 2.1.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Matériel

1.1.1 Milieu d'étude

L'étude a été réalisée au niveau de l'Unité de Poulet de Chair (UPC) de Benboulaid (Complexe Avicole de Batna) située à la périphérie de Constantine.

1.1.2 Constitution de l'échantillon de référence

L'étude a porté sur des poulets de chair de la souche Arbor Acres. Les poussins ont été élevés à une température ambiante de 32°C durant les trois premiers jours, réduite de 2°C chaque semaine jusqu'à arriver à une température constante de 24°C. Un éclaircissement de 24H/24H a été respecté les 3 premiers jours, cette durée a été dans un premier temps réduite à 14 heures d'éclaircissement entre 16 et 21 jours d'âge, puis augmentée de 2 heures par semaine jusqu'à arriver à 22 heures d'éclaircissement de 42 jours jusqu'à l'abattage. L'eau et 2 types d'aliment (démarrage et croissance) ont été distribués *Ad libitum* pendant la durée de l'élevage.

1.1.3 Les critères d'inclusion et d'exclusion

Ont été inclus dans notre étude, des animaux en bonne santé, ne présentant aucun signe de pathologie visible. Afin de limiter le risque de variabilité inter-individuelle, chaque groupe d'individus sélectionnés présentaient des poids avoisinants. Ont été exclus les sujets présentant des retards de croissance, des boiteries, ou tout autre signe de pathologie (diarrhée, jetage, prostration). 15 sujets ont été exclus pour retard de croissance.

1.1.4 Les critères de partition

Des méthodes statistiques permettent de partager une population de référence en sous-ensembles plus homogènes, mais il ne faut retenir que ceux susceptibles d'avoir une influence sur l'interprétation clinique. Dans notre étude, c'est l'âge qui a été retenu comme critère de partition. Les poulets ont été repartis en 6 lots de 20 individus. Chaque lot représentant un âge différent. Au total 120 poulets ont fait partie de cette étude, 60 poulets jeunes de moins d'un mois et 60 poulets adultes de plus d'un mois d'âge. Le sexe n'a pas été retenu comme critère de partition dans cette étude.

1.2. Méthodes

1.2.1 Les prélèvements

A J14, J21, J28, J35, J42, et J57 vingt poulets ont été sacrifiés par décapitation. Du sang pour analyse a été prélevé au niveau de la veine jugulaire, puis récolté dans des tubes héparinés. Le plasma sanguin a été séparé par centrifugation à 3,000 tours/min pendant 10 minutes, puis analysé immédiatement.

1.2.2 Analyses biochimiques

Un choix a été entrepris concernant les variables recherchées. Les analytes sélectionnés pour cette étude l'ont été en fonction de la disponibilité des réactifs de laboratoire, ainsi que de la faisabilité des techniques de dosages.

Tous les paramètres ont été dosés sur un automate de biochimie-immunologie ; l'Architect ci 8200 (Abbott Diagnostics, Illinois, USA) utilisant des kits commerciaux. Les méthodes analytiques utilisées sont rapportées dans le tableau 1.

1.2.3 Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide de la version 2.1 de Reference Value Advisor (Geffré et al., 2011). Le test de Shapiro-wilk a été utilisé pour évaluer la distribution des données. Les valeurs aberrantes ont été testées à l'aide des tests de Dixon-Reed et de Tukey. Une analyse de variance a été utilisée pour évaluer les différences significatives attribuables à l'âge pour tous les analytes mesurés. Les intervalles de référence ont été déterminés à l'aide de la méthode non paramétrique lorsqu'au moins 120 valeurs de référence étaient disponibles, les percentiles 2,5 et 97,5 servant de limites de référence inférieure et supérieure. Lorsque le nombre d'individus de référence était inférieur à 120, les intervalles de référence ont été calculés par la méthode robuste ou la méthode paramétrique si la normalité a pu être établie (Friedrich et al., 2012). Pour les paramètres présentant une variation statistique attribuable à l'âge, des intervalles de référence distincts ont été calculés. Les valeurs de p calculées $\leq 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Résultats

Les résultats sont présentés dans les tableaux 2 et 3. Toutes les données sont rapportées en (moyenne \pm DS). Une diminution significative liée à l'âge de la glycémie, du cholestérol, des triglycérides, des phosphates, du magnésium, du fer et du potassium a été observée. En outre, une augmentation significative liée à l'âge des protéines totales, du calcium et de l'ASAT a été obtenue. Les autres variables ne différaient pas significativement entre les âges. Le calcul des intervalles de référence distincts pour les animaux jeunes et adultes était nécessaire pour la plupart des analytes estimés. Toutes les variables ne suivaient pas une distribution normale. Les intervalles de référence sont présentés en utilisant la méthode non paramétrique pour l'acide urique, la créatinine, le sodium et les chlorures. La méthode Robuste a été utilisée pour toutes les autres variables.

2.2 Discussion

2.2.1 Métabolisme protéique

Des concentrations plus élevées de protéines sont retrouvées chez les poulets adultes. Ceci est décrit par plusieurs auteurs (Szabo et al., 2005 ; Filipovic et al., 2007), et est dû à un développement somatique intense pendant la phase de démarrage et probablement à une augmentation du nombre de nombreuses immunoglobulines. Arslan et al. (2001) n'ont pas retrouvé de différence significative entre poulets jeunes et adultes et des valeurs inférieures à celles rapportées dans la présente étude.

Chez les oiseaux, l'acide urique est la principale molécule du catabolisme azoté (Donsbough et al., 2010) et joue un rôle essentiel en tant que puissant régulateur du stress oxydatif (Rajman et al., 2006). Szabo et al. (2005) ont montré une relation directe entre la quantité de protéines ingérées et les taux d'acide urique dans le sang. La concentration élevée en protéines typique du régime alimentaire de démarrage entraîne une augmentation des taux d'acide urique dans le sang.

La concentration de la créatinine est directement proportionnelle à la masse musculaire (Szabo et al., 2005; Rajman et al., 2006). Il a été rapporté que les valeurs de la créatinine augmentent avec l'âge et la masse musculaire. Cela n'a pas été documenté dans la présente étude. En effet, aucune différence significative n'a été retrouvée entre les poulets jeunes et adultes. Semblables à nos résultats, Reçeci et col. (2011) n'ont pas signalé de différence significative pour la créatinémie entre volailles jeunes et adultes mais des valeurs supérieures à celles mentionnées dans notre étude.

2.2.2 Métabolisme lipidique

Les lipides sont fortement associés au métabolisme énergétique (Piotrowska et al., 2011) et reflètent des différences marquées entre le métabolisme immédiat après l'éclosion et le métabolisme en croissance (Szabo et al., 2005). Dans la présente étude, des valeurs plus

élevées de cholestérol et de triglycérides plasmatiques ont été observées chez les jeunes, par rapport aux adultes. La concentration plasmatique en triglycérides a atteint un pic chez les jeunes, reflétant un métabolisme et un transport des lipides précoces, ainsi qu'une mobilisation importante des réserves énergétiques. Semblable à nos résultats, Peebles et al. (1997), Reçeci et Col. (2001), ont observé une diminution générale des triglycérides et du cholestérol dans le sang avec l'âge des oiseaux.

2.2.3 Métabolisme glucidique

Les oiseaux ont des concentrations de glucose plasmatique supérieures de 150 à 300% à celles des mammifères de masse corporelle similaire. Le glucose est utilisé par les oiseaux pour diverses fonctions. Le taux de glucose sanguin dépend de l'équilibre entre l'apport en glucides, la synthèse du glucose endogène et sa libération par le foie, le stockage, l'utilisation et l'excrétion, d'autre part (Nwaoguikpe, 2010). Les valeurs de glycémie plus élevées chez l'adulte par rapport aux jeunes sont rapportées par plusieurs auteurs (Reçeci et Col, 2001 ; Hernandez et Margalida, 2010).

2.2.4 Métabolisme minéral

La présente étude a révélé des taux de calcium plus bas et des taux de phosphates, de magnésium, de potassium et de fer plus élevés chez les jeunes poulets par rapport aux poulets adultes. Aucune différence significative n'a été observée pour le sodium et les chlorures entre les poulets jeunes et les poulets adultes. Les résultats des enquêtes précédentes sont diversifiés. Certaines d'entre elles ont clairement montré une tendance à la hausse au cours des premières semaines et d'autres études n'ont révélé que des fluctuations des concentrations de calcium et des phosphates (Bowes et al., 1989). Szabo et al. (2005) ont signalé que la faible concentration de la calcémie dans la période qui a immédiatement suivi l'éclosion peut provenir de l'épuisement précoce et progressif de la source de calcium qui était jusque là représenté par la coquille de l'œuf, compensé par la suite par le régime alimentaire. Stockham et Scott (2008) ont indiqué que les niveaux élevés de phosphore chez les jeunes animaux sont probablement dus à une activité ostéoblastique accrue lors d'une croissance osseuse rapide. Une diminution progressive liée à l'âge du contenu en magnésium dans le sang (Bowes et al., 1989) et en potassium (Hochleithner, 2013) en relation avec l'apport alimentaire a été rapportée.

Les niveaux les plus élevés de fer chez les jeunes poulets sont en accord avec les études précédentes qui ont révélé une diminution progressive du fer plasmatique avec l'âge. L'activité érythropoïétique diminue avec l'âge, ce qui explique les besoins moins élevés en fer des poulets plus âgés par rapport aux poulets plus jeunes (Piotrowska et al., 2011). Mohanna et Nys (1989) ont rapporté que l'utilisation de fer chez les poulets diminuait rapidement avant le 21^{ème} jour et

qu'après, seules des fluctuations étaient observées jusqu'à la fin de la période d'engraissement.

2.2.5 Activités enzymatiques

L'activité de l'ASAT se produit dans de nombreux tissus chez les oiseaux, comme le foie ou les muscles. Dans le présent document, ces concentrations sont plus élevées chez les poulets adultes par rapport aux jeunes. Hochleithner (2013) a également révélé une augmentation de l'activité de l'ASAT liée à l'âge. Les concentrations plus élevées par rapport à celles rapportées dans la littérature (Arslan et al., 2001) sont certainement dues à la méthode de prélèvement utilisée qui aurait pu biaiser le résultat ; cette enzyme étant

présente dans les cellules musculaires peut être libérée à la faveur de la décapitation.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude fournissent des données sur les changements des variables biochimiques chez les poulets de chair jeunes et adultes de la souche Arbor Acres, conformément aux recommandations approuvées par la Société américaine de pathologie clinique (ASVP). Ils peuvent constituer un guide utile pour l'interprétation des variables biochimiques plasmatiques et la surveillance de l'état de santé des poulets de chair.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arslan, M ; Ozcan, M ; Matur, E ; Cotelioglu, U and Ergul, E (2001). The effects of vit E on some blood parameters in broilers. Turk.J.Vet.Anim.sd. 25 :711-716.
- Bowes, V.A., R.J. Julian, and T. Stirtzinger (1989). Comparison of serum biochemical profiles of male broilers with female broilers and White Leghorn chickens. Can. J. Vet. Res. 53: 7-11.
- Donsbough, A.L., S. Powell, A. Waguespack, and T.D. Binder (2010). Southern LL. Uric acid, urea and ammonia concentrations in serum and uric acid concentration in excreta as indicators of amino acid utilization in diets for broilers. Poult. Sci. 89: 287- 294.
- Filipovic, N., Stojevic, S., Milinkovic-Tur, S., Ljubic, B. and Zdelar-Tuk, M., 2007. Changes in concentration and fractions of blood serum proteins of chickens during fattening. Veterinarski arhiv, 77(4):319-326.
- Friedrichs, K.R., Harr, K.E., Freeman, K.P., Szladovits, B., Walton, R.M., Barnhart, K.F. and Blanco-Chavez, J., 2012. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. Vet Clin Pathol 41/4 : 441-453.
- Geffré, A., Concordet, D., Braun, J.P. and Trumel, C., 2011. Reference Value Advisor : a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with microsoft excel. Vet Clin Pathol. 2011 Mar; 40(1):107-12.
- Harr, K (2006). Diagnostic value of biochemistry. In: HaCrrison G.J and Lightfoot T.L. Clinical avian medicine. 1: 611-629.
- Hernandez, M. and A. Margalida (2010). Haematology and blood chemistry reference values and age- related changes in wild Bearded Vultures (Gy- paetus Barbatus). Journal of Wildlife disease. 46: 390-340.
- Hochleithner, M (2013). Chapter 11: Biochemistries. In: Avian medicine online, by Harrison's bird foods: 223-245.
- www.avianmedicine.net/publication/chapter11
- Mohanna, C. and Y. Nys (1998). Influence of age, sex and cross on body concentrations of trace elements (zinc, iron, copper and manganese) in chickens. Br. Poult. Sci. 39: 536-543.
- Nwaoguikpe, R.N (2010). Plasma glucose, protein and cholesterol levels of chicks or birds maintained on pawpaw (Carica papaya) seed containing diet. Pak. J. Nutr. 9: 654-658.^{[1][SEP]}
- Peebles, E.D., J.D. Cheaney, J.D. Brake, C.R. Boyle, and M.A. Latour (1997). Effects of added dietary lard on body weight and serum glucose and low density lipoprotein cholesterol in random bred broiler chickens. Poult. Sci. 76: 29-36.
- Piotrowska, A., K. Burlikowska, and R. Szymeczko (2011). Changes in blood chemistry in broiler chickens during the fattening period. Folia biologica (Krakow). 59: 183-187.
- Rajman, M., M. Jurani, D. Lamosova, M. Macajova, M. Sedlackova, L. Kostal, D. Jesova, and P. Vyboh (2006). The effects of feed restriction on plasma biochemistry in growing meat type chickens (Gallus gallus). Comp. Biochem. Physiol. A. 145: 363-371.
- Reçeci, T. and R. Col (2001). Haematological and biochemical values of the blood of pheasants (Phasianus colchicus) of different ages. Turk. J. Anim. Sci 35(3) :149-156.
- Silva, P.R.L., O.C. Freitas Neto, A.C. Laurentiz, O.M. Junqueira, and J.J. Fagliari (2007). Blood serum components and serum protein test of hybro-PG broilers of different ages. Brazilian J. Poult. Sci. 9: 229-232.
- Stockham, S.L. and M.A. Scott (2008). Fundamentals of veterinary clinical pathology. 2nd ed. Blackwell Pub. Ames, Iowa, 908.

Tableau 1. Méthodes analytiques utilisées sur ARCHITECT ci 8200 pour les analyses biochimiques sur plasma de poulet de chair.

Analytes	Méthodes	Kits commerciaux
Protéines totales	Méthode de Biuret. Colorimétrique.	Architect/aeroset Clinical chemistry Abbott laboratories. USA
Créatinine	Méthode de Jaffé. Colorimétrique.	
Acide urique	Uricase/ POD. Méthode enzymatique.	
Glucose	Hexokinase/G-6-PDH. Méthode enzymatique colorimétrique.	
Cholestérol total	CHOL OX- HBA. Méthode enzymatique colorimétrique.	
Triglycérides	GPO-POD. Méthode enzymatique colorimétrique.	
Calcium	Arsenazo III. Méthode colorimétrique.	
Magnésium	Bleu de Xylidyle. Méthode colorimétrique	
Phosphates	Phosphomolybdate. Méthode colorimétrique.	
Fer	FerroZine. Méthode colorimétrique.	
Sodium	Electrodes sélectives	
Potassium		
Chlorures		
Aspartate aminotransferase	NADH. Cinétique.	

Tableau 2. Variables biochimiques (moyenne±DS) chez des poulets jeunes (moins d'un mois) et des poulets adultes (plus d'un mois) chez la souche Arbor Acres

Variable	Unité	Moins d'un mois n=60	Plus d'un mois n=60
		Moyenne±DS	Moyenne±DS
Protéines totales	g/L	25.96±10.41	31.12±5.36**
Créatinine	mg/L	2.58±0.52	2.44±0.50
Acide urique	mg/L	67.22±20.20	66.04±29.30
Glucose	g/L	2.33±0.56	1.72±0.70**
Cholestérol	g/L	1.33±0.23	0.80±0.37**
Triglycérides	g/L	0.88±0.27	0.53±0.22**
Calcium	mg/L	83.63±26.67	110.69±16.11**
Magnésium	mg/L	20.43±3.60	17.68±6.27**
Phosphates	mg/L	61.90±10.59	52.37±17.51**
Fer	µg/dL	97.25±23.55	81.43±31.03**
Sodium	mEq/L	148.50±7.65	147.95±10.54
Potassium	mEq/L	5.40±0.68	4.55±0.64**
Chlorures	mEq/L	112.17±5.01	112.01±7.44
ASAT	U/L	198.45±65.70	231.53±27.22**

* : significatif (p<0.05), ** : très significatif (p<0.01)

Tableau 3. Valeurs de référence pour quelques variables biochimiques chez la souche Arbor Acres¹.

Variable	Unité	n	Groupes d'âges ²	Intervalle 2.5-97.5	Méthode robuste	Méthode paramétrique	90% pour lim inf	IC pour lim sup	90% pour lim sup	IC lim
Protéines totales	g/L	60	J		9-44		8- 11		39-45	
		60	A		21.6-47.5					
Créatinine	mg/L	120	T	2-3.7			2-2		3.3-4.9	
Acide urique	mg/L	120	T	23-112			22-32		99-140	
Glucose	g/L	60	J		1.2-3.5		1-1.5		3.3-3.7	
		60	A		0.7-3.2					
Cholestérol total	g/L	60	J		0.8-1.8		0.8-0.9		1.7-1.9	
		60	A		0.2-1.5					
Triglycérides	g/L	60	J		0.3-1.4		0.2-0.4		1.3-1.6	
		60	A		0.2-1.3					
Calcium	mg/L	60	J		31-141		19-46		135-165	
		60	A		77- 142					
Magnésium	mg/L	60	J		12-27		10-14		25-29	
		60	A		7-31					
Phosphates	mg/L	60	J		40-82		35-45		77-87	
		60	A		15-76					
Fer	µg/dL	60	J		52-147		42-62		138-156	
		60	A		23-152					
Sodium	mEq/L	120	T	125-163			122-134		161-189	
Potassium	mEq/L	60	J		3.9-6.7		3.5-4.2		6.5-7	
		60	A		3.2-6.7					
Chlorures	mEq/L	120	T	95-123			90-101		122-141	
ASAT	U/L	60	J		58-295		51-72		277-296	
		60	A		175-286					

¹:Valeurs présentées par groupe d'âges ou pour les deux âges selon qu'il y ait différence ou non. ²: T: tous les âges ; J: jeunes; A: adultes.

ÉVALUATION DE L'INNOCUITE ET DES EFFETS IMMUNOSTIMULANTS D'EXTRAITS VEGETAUX SUR LIGNEES CELLULAIRES DE POULET

Laurine Allimonnier¹, Denis Bellenot², Benjamin Lemaire², Laurence A. Guilloteau³,
Angelique Travel⁴, Rodrigo Guabiraba¹

¹ INRA, UMR ISP, Université de Tours, Nouzilly, France. ² ITEIPMAI, Chemillé-en-Anjou, France. ³ INRA, UMR BOA, Université de Tours, Nouzilly, France. ⁴ ITAVI, INRA, Nouzilly, France

rodrigo.guabiraba-brito@inra.fr

RÉSUMÉ

Le maintien de conditions optimales de bien-être et de santé des animaux est une préoccupation quotidienne en élevage. L'utilisation d'extraits végétaux dans l'aliment des volailles semble un allié intéressant pour y contribuer, en renforçant les défenses naturelles des animaux. Néanmoins, cette voie de valorisation reste limitée par l'absence de références robustes et de bases méthodologiques solides. Notre objectif a été de mettre au point et d'éprouver une méthode *in vitro* simple, fiable et répétable qui permettrait d'évaluer l'innocuité cellulaire et la capacité immunostimulante d'extraits végétaux. Une étude bibliographique a permis d'identifier 4 extraits végétaux d'intérêt: Astragale, Echinacée, Ginseng et Mélisse. Un test d'activité métabolique (MTT) a été réalisé sur trois lignées cellulaires de poulets, représentatives des fonctions respiratoire (CLEC213), hépatique (LMH) et de la réponse immunitaire (macrophages HD11). L'immunostimulation induite chez les macrophages a été étudiée en évaluant la production de l'oxyde nitrique (NO), une molécule pro-oxydante et antimicrobienne, et l'activation de la voie pro-inflammatoire NFκB. Nous avons montré que les extraits d'Astragale, d'Echinacée, de Ginseng et de Mélisse sont peu ou pas toxiques pour les cellules. Les extraits de Mélisse et de Ginseng ont la capacité d'activer le métabolisme cellulaire de façon importante (50-100%) et induisent la production de NO (10 à 20 fois) ou l'activation de la voie NFκB (5 à 18 fois) de façon très marquée, suggérant des activités immunostimulantes. En conclusion, les différentes étapes de préparation des extraits, de choix des types cellulaires et des conditions de culture ont permis de définir une méthode pertinente pour évaluer l'innocuité et la capacité immunostimulante des extraits. Les extraits de Mélisse et de Ginseng semblent être des candidats non cytotoxiques, capables de stimuler les défenses naturelles des volailles.

ABSTRACT

Assessment of the innocuity and immunostimulant properties of plant extracts in chicken cell lines

Maintaining optimal conditions of welfare and animal health is a daily concern in livestock breeding. The use of plant extracts in poultry feed seems an interesting approach to reinforce the animals' natural defenses. However, this approach is limited by the lack of robust references and solid methodological bases. Our objective was to develop and test a simple, reliable and repeatable *in vitro* method to determine cytotoxic and immunostimulant capacities of plant extracts. A bibliographic study helped identifying 4 plant extracts: Astragalus, Echinacea, Ginseng and Melissa. A metabolic activity test (MTT) was carried out on three chicken cell lines, representative of the respiratory (CLEC213), hepatic (LMH) and immune (HD11 macrophages) functions. Immunostimulation was studied in macrophages by assessing the production of the pro-oxidant and antimicrobial molecule nitric oxide (NO) and the activation of the pro-inflammatory NFκB pathway. We have shown that Astragalus, Echinacea, Ginseng and Melissa had little or no cytotoxic effects. Melissa and Ginseng have the ability to significantly activate cell metabolism (50-100%), to induce the production of NO (10 to 20-fold) or the activation of the NFκB pathway (5 to 18-fold), thus suggesting immunostimulatory activities. In conclusion, extracts' preparation steps, cell type's choice and cell culture conditions allowed us to define a relevant methodology to assess cytotoxic and immunostimulant properties of the extracts. The Melissa and Ginseng extracts appear to be non-cytotoxic candidates, capable of stimulating the natural defenses of poultry.

INTRODUCTION

La sélection génétique a conduit à la production de poulets à très fort potentiel de croissance, avec des effets induits sur l'expression des comportements et sur les capacités d'adaptation. Les stratégies de sélection génétique, précédemment axées sur l'optimisation des critères de performances, ont permis ces gains de productivité avec néanmoins différentes conséquences sur la sensibilité et l'adaptabilité des animaux à des environnements changeants ou sub-optimaux (Koch et al., 2015). Il est aujourd'hui primordial de travailler à améliorer la robustesse des animaux au stress d'origine biotique ou abiotique, notamment sanitaire, et ainsi permettre de limiter le recours aux antibiotiques. L'utilisation d'extraits végétaux en tant qu'additifs dans l'aliment des volailles ouvre de nouveaux débouchés pour la filière des plantes à parfum, aromatiques et médicinales (PPAM). Elle constitue une solution intéressante pour soutenir le bon fonctionnement de l'organisme, notamment des systèmes de défense, prévenir l'usage des antibiotiques et pour améliorer l'image de l'élevage de volailles par des pratiques plus naturelles (Diaz-Sanchez et al. 2015). Néanmoins, cette voie de valorisation reste limitée par l'absence de références robustes et de bases méthodologiques solides permettant leur évaluation, aboutissant le plus souvent à des résultats peu reproductibles et parfois contradictoires. L'objectif du présent travail a été de mettre au point et d'éprouver une méthode *in vitro* simple, fiable et répétable qui permettrait d'évaluer l'innocuité cellulaire et la capacité immunostimulante d'extraits végétaux d'intérêt. Ce travail se place dans le développement d'une méthodologie globale d'évaluation de l'effet des extraits végétaux en filière avicole. Une étude bibliographique préalable a permis d'identifier 4 extraits végétaux d'intérêt pour stimuler les défenses naturelles des volailles (immunité, stress oxydatif et inflammatoire): Astragale (*Astragalus membranaceus*), Echinacée (*Echinacea purpurea*), Ginseng (*Ginseng panax*) et Mélisse (*Melissa officinalis*) (Travel et al., 2019).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Extraits végétaux

Les extraits d'Astragale, d'Echinacée, de Ginseng panax et de Mélisse ont été fournis et caractérisés (Tableau 1) par l'ITEIPMAI (Institut Technique Interprofessionnel des plantes à Parfum, Médicinales et Aromatiques). Ces extraits ont été produits à partir de l'appareil racinaire ou de l'appareil aérien des plantes. Un contrôle préalable de la qualité microbiologique des extraits a été réalisé avant mise en contact avec les lignées cellulaires. Pour ce faire, les extraits (dilués à 1 mg/ml d'eau) incubés dans un milieu de culture microbiologique riche du type BHI

(bouillon cœur-cerveau) pendant 5 jours n'ont présenté aucune contamination.

1.2. Lignées cellulaires

Afin d'évaluer l'innocuité et les effets immunostimulants des extraits végétaux, trois lignées cellulaires immortalisées de poulet (*Gallus gallus*) ont été utilisées. Les cellules épithéliales pulmonaires CLEC 213 ont été immortalisées à partir de cellules de poumon (Esnault et al., 2011). Les hépatocytes LMH ont été immortalisés à partir de cellules d'un carcinome hépatocellulaire (Kawaguchi et al., 1987). Ces deux lignées ont été maintenues dans du milieu DMEM-F12 contenant 2 mM de L-glutamine, 15 mM d'HEPES, 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, 100 U/ml de streptomycine et 100 µg/ml pénicilline. La lignée de macrophages aviaires HD11, immortalisée à partir de cellules mononucléaires de la moelle osseuse d'un poulet infecté par le virus de la myélocytomatose aviaire (MC29) (Beug et al., 1979), a été maintenue dans du milieu RPMI 1640 contenant 2 mM de L-glutamine, 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, 100 U/ml de streptomycine et 100 µg/ml pénicilline.

1.3. Test de Métabolisme

Afin d'évaluer l'activité métabolique de la cellule, un test MTT a été réalisé comme un indicateur de la viabilité cellulaire après stimulation par les extraits végétaux. Lorsque la cellule est viable, le sel de tétrazolium (MTT) est métabolisé par les mitochondries et réduit en cristaux de formazan. Une forte présence de ces cristaux indique une activité métabolique importante des cellules ou, le cas contraire, une potentielle cytotoxicité. Les cellules ont été cultivées en plaque de 96 puits à raison de 7×10^4 cellules par puits. Ensuite, les cellules ont été mises en présence de différentes concentrations d'extraits (de 10^{-1} à 10^{-6} mg/ml de milieu de culture) et incubées à 41°C durant 6 h, 24 h ou 48 h. Après ces temps d'incubation, le surnageant des cultures cellulaires ont été récupérés. Le dosage de l'oxyde nitrique a été effectué seulement sur les surnageants des cellules HD11. Pour toutes les cellules, le milieu de culture a été remplacé par un volume équivalent de milieu contenant 10 % de MTT à 5 mg/ml. Après une heure d'incubation à 41°C, le solvant organique diméthyl sulfoxyde (DMSO) a été ajouté afin de dissoudre les cristaux. Cent microlitres de la solution formée dans chaque puits ont été transférés dans une nouvelle plaque afin de mesurer le produit coloré formé au colorimètre (absorbance à 550 nm). La viabilité cellulaire de chaque lignée a été établie en fonction de l'absorbance des puits témoins, composés de cellules en présence de milieu de culture uniquement, dont la viabilité est considérée égale à 100 %.

1.4. Dosage de l'oxyde nitrique (NO)

La production de la molécule pro-oxydante et antimicrobienne oxyde nitrique (NO) est un marqueur d'intérêt pour évaluer l'immunostimulation. Afin de doser le NO dans le surnageant de culture des cellules HD11, le kit *Griess Reagent System* (Promega) a été utilisé. Le surnageant a été déposé en plaque 96 puits et une solution contenant de la sulfanilamide et du N-(1-naphthyl)ethylenediamine (NED) a été ajoutée. Un produit coloré est formé, proportionnel à la quantité de NO présent, et l'absorbance est lue à 550 nm au colorimètre. En parallèle, une gamme étalon de nitrite a été effectuée afin de calculer la concentration de nitrite dans le surnageant comme indicateur de la présence du NO.

1.5. Dosage de l'activité NFκB sur cellules rapporteuses

La lignée cellulaire HD11-NFκB exprime de façon constitutive un gène rapporteur, la luciférase, sous le contrôle d'un promoteur sensible à NFκB. Si une molécule active le facteur de transcription NFκB, fortement impliqué dans l'inflammation, les cellules vont produire de la luciférase. Les cellules ont été cultivées en plaque de 96 puits à raison de 7×10^4 cellules par puits. Ensuite, elles ont reçu deux concentrations d'extraits végétaux (10^{-1} à 10^{-2} mg/ml de milieu de culture) et incubées durant 6 h. Ensuite, les cellules ont été soumises à une lyse cellulaire en présence du substrat de la luciférase, la luciférine, afin d'obtenir une réaction luminométrique. La lecture de la plaque a été réalisée dans un luminomètre et les données exprimées en taux d'augmentation par rapport au contrôle (milieu de culture).

1.5. Analyses statistiques

Un test One-way ANOVA non paramétrique, suivi d'un test de comparaisons multiples de Tukey a été utilisé afin de réaliser une étude statistique (logiciel GraphPad Prism 6.0). Une valeur de P inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative. Les différences entre le contrôle et les concentrations des extraits sont représentées par des astérisques : *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$ et ****: $p \leq 0,0001$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Ici il est fait le choix de présenter les résultats chiffrés uniquement pour les extraits de Mélisse et de Ginseng, qui ont montré des résultats intéressants au regard de nos objectifs. Sur la lignée pulmonaire CLEC213, nous observons pour la Mélisse et pour le Ginseng une augmentation du métabolisme cellulaire à une forte concentration à 6 h (aux alentours de 20%). A 24 h et à 48 h, cette augmentation est toujours présente pour le Ginseng (Figure 1A), et pour la Mélisse (Figure 1B), même si à des concentrations inférieures une perte d'activité métabolique, considérée non-cytotoxique est observée, pouvant

aller de 4% à 20% (à 48 h). Sur la lignée cellulaire LMH, nous observons une forte augmentation de l'activité métabolique pour les deux extraits entre 6 h et 48 h (Figure 1A et B), plus notable pour le Ginseng (Figure 1A), qui induit une augmentation de l'activité métabolique de l'ordre de 30 à 40% même à 24 h. Aucun effet cytotoxique a été observé sur cette lignée cellulaire pour les deux extraits. Sur la lignée cellulaire HD11, le Ginseng (Figure 1A) et la Mélisse (Figure 1B) ont induit une augmentation du métabolisme cellulaire dès 6 h, avec un pouvoir d'induction relativement important, de l'ordre de 40-60%, à 24 h. Une perte d'activité métabolique est observée à 48 h pour les deux extraits à toutes les concentrations étudiées, un phénomène probablement lié à l'activation abondante et précoce observée dès 6 h. Néanmoins, sauf pour la concentration la plus élevée, aucune cytotoxicité significative est observée. En résumé, nos extraits présentent peu ou pas d'effets cytotoxiques sur les lignées cellulaires étudiées. D'ailleurs, les seuils de cytotoxicité vis-à-vis du test MTT sont bien discutés dans la littérature, où un taux d'environ 50% de perte d'activité métabolique peut être réellement lié à un phénomène de cytotoxicité (ISO 10993-5:2009). D'ailleurs, le fait que tous les extraits mènent à une augmentation de l'activité métabolique dès 6 h peut expliquer pourquoi nous observons une chute de cette activité à 24 ou 48 h. Cela peut être expliqué par une perte de capacité métabolique intrinsèque due à un épuisement de la machinerie cellulaire. Les conséquences d'une augmentation de l'activité métabolique des lignées pulmonaires et hépatiques par les extraits végétaux ne sont pas clairement caractérisées, mais cela peut être lié à une augmentation de la synthèse de protéines pro-inflammatoires (cytokines, chimiokines), parmi d'autres facteurs, suggèrent un effet immunostimulant. Afin de vérifier cette hypothèse, la production du NO et l'activation du facteur NFκB, deux biomarqueurs fortement liés à l'immunostimulation (Aktan, 2004), ont été évalués sur la lignée de macrophages HD11, représentative du système immunitaire. Pour le NO, l'extrait de Ginseng induit une production discrète, de l'ordre de 10 μ M, à la concentration la plus élevée d'extrait (10^{-1} mg/ml). Néanmoins, l'extrait de Mélisse induit une forte production du NO à cette même concentration, de l'ordre de 50 μ M. Par comparaison, notre témoin positif, le lipopolysaccharide (LPS d'*E. coli* O55:B5, 10 ng/ml) de paroi bactérienne, connu pour être un fort stimulateur de la production du NO par les macrophages, a induit à une production de l'ordre de 70 μ M (Figure 2A). De même, le profil d'activation du facteur de transcription pro-inflammatoire NFκB, a été similaire à celui du NO: activation de l'ordre de 6 (Ginseng à 10^{-1} mg/ml) à 18 fois (Mélisse à 10^{-1} mg/ml) plus que le témoin négatif (Figure 2B). Le LPS induit une augmentation 23 fois supérieure au témoin négatif, ce qui indique que la Mélisse possède un effet très proche de celui observé avec le LPS, un composé de référence pour tester les propriétés

activatrices de l'immunité innée (Lu et al., 2008). En résumé, l'extrait de Mélisse possède une forte activité immunostimulante à deux concentrations (10^{-1} et 10^{-2} mg/ml) pour la lignée de macrophages aviaire, une activité nettement supérieure à celle observée avec l'extrait de Ginseng, qui reste néanmoins une molécule immunostimulante.

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aktan, F. 2004. Life Sci. Jun 25;75(6):639-53.
- Beug H., von Kirchbach A., Döderlein G., Conscience J.F., Graf T. 1979. Cell. Oct;18(2):375-90.
- Diaz-Sanchez S., D'Souza D., Biswas D., Hanning I. 2015. Poult Sci. Jun;94(6):1419-30.
- Esnault E., Bonsergent C., Larcher T., Bed'hom B., Vautherot J.F., Delaleu B., Guigand L., Soubieux D., Marc D., Quéré P. 2011. Virus Res. Jul;159(1):32-42
- ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.
- Kawaguchi T., Nomura K., Hirayama Y., Kitagawa T. 1987. Cancer Res. Aug 15;47(16):4460-4.
- Koch A., Leterrier C., Collin A., Mercerand F., Rat C., Delaveau J., Grimaud I., Constantin P., Crochet S., Cailleau-Audouin E., Guilloteau L.A. 2015. 11èmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras.
- Lu Y.C., Yeh W.C., Ohashi P.S. Cytokine. 2008 May;42(2):145-151.
- Travel A., Alleman F., Roinsard A., Tavares O., Bellenot D., Lemaire B., 2019. 13èmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras. *In press*.

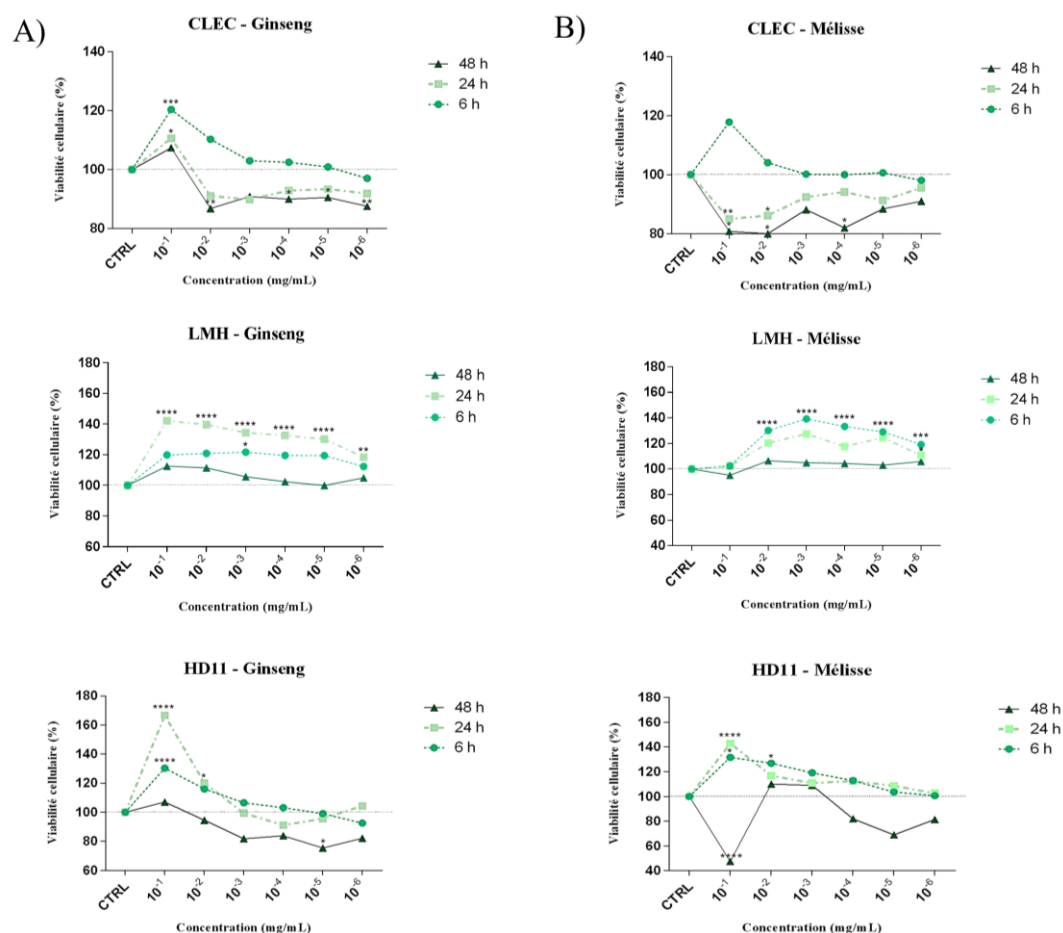


Figure 1. Test de métabolisme cellulaire pour la détermination indirecte de la viabilité cellulaire suite à l'exposition des trois types cellulaires à des différentes concentrations d'extraits à différents temps d'incubation. En (A) l'effet de l'extrait de Ginseng. En (B) l'effet de l'extrait de Mélisse. N=3 réplicats/groupe/temps.

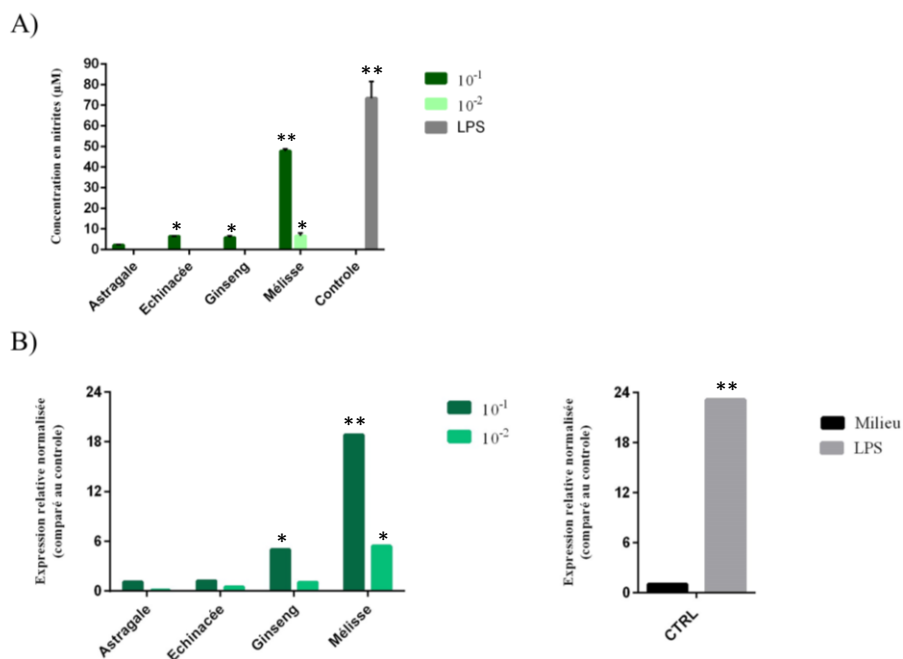


Figure 2. Effets immunostimulants des extraits végétaux sur une lignée cellulaire de macrophages de poulet (HD11). En (A) la production d'oxyde nitrique (NO) par les différents extraits végétaux 48 h après exposition. En (B) l'effet des extraits végétaux sur l'activité du facteur de transcription pro-inflammatoire NFκB, via la mesure de l'activité de la luciférase, 6 h après exposition. N=3 réplicats/groupe.

Plante	Partie utilisée	Solvant d'extraction	Substances détectées			
<i>Mélisse</i>	Parties aériennes	Eau/Ethanol (40/60 V/V)	Acide rosmarinique	Dérivés hydroxy cinnamiques	Maltodextrine	Cendres totales
<i>Echinacée</i>	Parties aériennes	Eau/Ethanol (40/60 V/V)	Acides caftarique, chlorogénique et cichorique	---	Maltodextrine	Cendres totales
<i>Ginseng</i>	Racine	Eau/Ethanol (40/60 V/V)	Ginsenosides	---	Maltodextrine	Cendres totales
<i>Astragale</i>	Racine	Eau/Ethanol (70/30 V/V)	Polysaccharides	Formononétine	Maltodextrine	Cendres totales

Tableau 1. Caractérisation physico-chimique des extraits végétaux.

UN EXTRAIT D'ALGUES DIMINUANT LA MORTALITE DU POULET DE CHAIR

LA PREMIERE SEMAINE DE VIE

Frédéric Bussy^a, Matthieu Le Goff^a, Manon Biesse^a, Olivier Mathiaud^b

^a *Olmix group, ZA du Haut du Bois, 56580 Bréhan, France*

^b *R&D Breizh, 56500 Moustoir Ac, France*

fbussy@olmix.com

RÉSUMÉ

En production avicole, la première semaine de vie (particulièrement les 36 premières heures) est très importante pour garantir la performance du lot. Les poussins sont sensibles à de nombreux stress influençant directement leur développement et l'ensemble de leurs performances (indice de consommation, poids à l'abattage, mortalité etc). Le bon développement du système digestif s'avère indispensable pour favoriser une croissance optimale des poussins et leur permettre de résister à des stress éventuels pouvant intervenir durant cette période. Dans ce contexte, Olmix a développé un produit contenant un extrait d'algue appelé le MSP_{MUCIN} (Polysaccharide Sulfaté d'origine algale). Le produit a été testé dans un élevage commercial afin d'évaluer son effet sur le taux de mortalité durant la première semaine de vie des poussins et sur la production de mucine *via* la taille des vacuoles à mucus des cellules à gobelet contenu dans la muqueuse de l'intestin grêle. L'essai a été réalisé sur 28 000 poussins (issus de jeune reproducteur de génétique ROSS) divisés en deux groupes dans une même salle afin de garantir les mêmes paramètres d'ambiance. Le lot contrôle a reçu un complexe de vitamines A, D3 et E pendant la première semaine tandis que le lot test a reçu uniquement le produit pendant les 48 premières heures de vie. A l'arrivée des poussins, les poids des poussins des deux lots était équivalente (34,62g pour le groupe contrôle contre 34,68g pour le groupe test). L'essai a montré un taux de mortalité plus faible en moyenne à 7 jours (0,80% versus 1,35%, $p<0,05$). De plus, l'administration du produit a augmenté de manière significative ($p<0,05$) la taille moyenne des vacuoles à mucus présentes dans les cellules à gobelet en comparaison avec le lot contrôle à 3 jours d'âge. Ces résultats semblent montrer que le produit utilisé pourrait être un outil d'aide intéressant pour diminuer le taux de mortalité au démarrage et préparer l'intestin à combattre les agressions futures.

ABSTRACT

Algae-based complex reduces mortality rate on broiler during the first week of life

In poultry production systems, the first week of life (particularly the first 36 hours) is very important to ensure the performance of the flock. The chicks are subjected to many stressors which directly impact their development as well as their overall performance (feed conversion ratio, final body weight, mortality, etc). The good development of the digestive system proves to be indispensable to boost optimal growth of the chicken as well as the resistance to the stress that they can face on during this period. In this context, Olmix developed a product containing an extract of algae-based complex called MSP_{MUCIN} (Sulfated polysaccharide from seaweed). The product was tested in a commercial farm to evaluate its effect on both survival rate during the first week of life and mucin production *via* determination of mucous vacuole size within the goblet cells contained in the mucosa of the small intestine. The study was performed on 28,000 day old chick (DOC, ROSS genetic) distributed in two identical groups in the same building to have the same environmental condition. The control group received a complex of vitamin A, D3 and E complex during the first week whereas the test group only received the product during the first 48 hours. The weight of the DOC, at the arrival, were similar between the 2 groups (control 34.62g versus 34.68g for the test group). This trial showed a decrease in the mortality rate during the first week of life in the test group compared to the control group (respectively 0.80% and 1.35%, $p<0.05$). Additionally, the product increased the average size of the mucous vacuoles present in the goblet cells when compared to the control group particularly at day 3, ($p<0.05$). These results seem to show that the product could be a tool to reduce the mortality at starting period and to prepare the digestive tract to fight against future aggressions.

INTRODUCTION

En production avicole, la première semaine de vie (particulièrement les 36 premières heures) est très importante pour garantir la performance du lot (Batal et al., 2002 ; Yegani et al, 2008). Les poussins sont sensibles à de nombreux stress influençant directement leur développement et l'ensemble de leurs performances tel que l'indice de consommation, poids à l'abattage, mortalité, etc (Gonzales et al, 2003 ; Saki, 2005). Le bon développement du système digestif s'avère indispensable pour favoriser une croissance optimale des poussins et leur permettre de résister à des stress éventuels pouvant intervenir durant cette période. En cas de faible consommation d'aliment, le développement de l'intestin grêle est fortement détérioré (Geyra et al., 2001) ce qui peut compromettre la fonction de barrière intestinale. Ce phénomène apparaît régulièrement lors des premières heures de vie en raison du temps passé dans l'incubateur après l'éclosion et du transport jusqu'à l'élevage (Adeleye et al, 2018).

Le mucus intestinal est principalement composé de mucine, une glycoprotéine exerçant un rôle crucial dans la protection de l'intestin contre les différentes agressions qu'il peut subir (pathogènes, ...). Produite par les cellules à gobelet, elle contribue à une meilleure intégrité de la barrière intestinale (Mackie et al., 2012). Dans ce contexte, Olmix a développé un produit contenant un polysaccharide sulfaté d'origine algale. En 2000, Barcelo et al., ont montré qu'un extrait d'algue provenant de *Ulva* sp. est capable de stimuler la production de mucine des cellules à gobelet. Un essai a été réalisé pour étudier l'impact de ce produit sur la taille des vacuoles de mucus ainsi que sur le taux de mortalité des poussins lors de leur première semaine de vie.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1 Animaux

Dans un bâtiment d'élevage commercial, 28 000 poussins de génétique ROSS ont été répartis en deux lots dans une même salle d'élevage, divisée par une barrière grillagée non étanche. L'allotement a été réalisé en s'assurant de l'homogénéité des 2 lots à travers le poids des poussins à leur arrivé à l'élevage (poids moyens du groupe contrôle 34,62g versus 34,68g pour le groupe test). Pendant la première semaine de vie, le lot contrôle a reçu un complexe de vitamines A, D3 et E (programme de prophylaxie standard de l'élevage), à un dosage de 1 L de solution pour 1000 L d'eau. Le lot test a reçu le produit contenant un extrait d'algue à un dosage de 87g pour

1000 L d'eau, pendant les 48 premières heures de vie à la place du complexe vitaminique.

1.2 Mesures

La mortalité des poussins a été mesurée quotidiennement la première semaine de vie. A J3 et J7, 3 sections de l'iléon ont été réalisées sur 10 poussins de chaque groupe afin de déterminer le nombre de cellules à gobelet et la taille des vacuoles à mucus des cellules à gobelet.

Ces observations ont été effectuées à l'aide d'une coloration sur lame des sections au PAS (Periodic Acid-Schiff) et d'un microscope optique (oculaire X10 et objectif X5).

1.3 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R via le test de Mann-Whitney, (risque $\alpha = 5\%$).

La comparaison des taux de mortalité a été réalisé sur la mortalité cumulée à J3 et J7.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2. Mortalité

La mortalité a été réduite la première semaine de vie dans le lot test notamment à J7, ($p < 0,05$ Figure 1). L'utilisation du produit contenant le MSP[®]_{MUCIN} a permis de diminuer significativement le taux de mortalité durant la première semaine de vie.

2.1 Cellules à gobelet et mucine

Aucune différence n'a été observée entre les deux groupes en termes de nombre de cellules à gobelet. Uni et al. (2001) ont montré que le nombre de cellules à gobelet variait en fonction de l'accessibilité à la nourriture les 48 premières heures, cependant, dans cet essai les deux lots ont reçu l'aliment en même temps, ce qui pourrait expliquer le nombre de cellules à gobelet identique. Néanmoins, la taille moyenne des vacuoles à mucus présentes dans les cellules à gobelet était supérieure dans le lot test par rapport au lot contrôle et particulièrement à J3, ($p < 0,05$ Figure 2). Aucune différence n'a été observée à J7. La taille des vacuoles à mucus représente une estimation indirecte de la production de mucine qui est le constituant principal de la couche de mucus intestinale. Les mucines sont des glycoprotéines exerçant plusieurs fonctions. Elles agissent comme une couche perméable pour l'échange des nutriments avec l'épithélium sous-jacent. Elles ont également un rôle de barrière contre certains pathogènes (Forstner et al., 1995). Or, cette couche de mucus subit l'érosion due à l'activité digestive des enzymes et au frottement avec les particules d'aliment. Le produit semble permettre de compenser ces besoins en

augmentant la sécrétion de mucus par rapport au groupe contrôle.

CONCLUSION

Ces résultats soulignent l'importance d'améliorer la fonction de protection de la muqueuse intestinale par l'augmentation de la sécrétion de mucus pour garantir un bon démarrage. Le produit aurait permis d'augmenter la production de mucine reflétée par la

taille des vacuoles à mucus des cellules à gobelet et de réduire le taux de mortalité pendant la première semaine de vie. L'administration du produit pourrait être un outil d'aide intéressant pour réduire les effets négatifs du démarrage par la gestion de la santé digestive. **D'autres essais sont en cours pour étudier l'impact du produit administré lors des premiers jours de vie sur les performances en fin de lot.**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adeleye O., Otakoya I., Fafiolu A., Alabi J., Egbeyale L., Idowu O., 2018. Veterinary and Animal Science 5: 20-25.
- Barcelo A., Claustre J., Moro F., Chayvialle J-A, Cuber J-C, Plaisancié P., 2000. Gut.46: 218-224.
- Batal A.B., Parsons C. M. 2002. Poult Sci. 81: 853-859.
- Forstner J.F., Oliver M.G., Sylvester F.A., 1995. Infections of the Gastrointestinal Tract ed. Raven Press, New York, 71-88.
- Geyra A., Uni Z., Sklan D., 2001. British Journal of Nutrition. 86: 53-61.
- Gonzales E., Kondo N., Saldanha S., Loddy M., Careghi C., Decurypere D., 2003. Poult Sci. 82: 1250-1256.
- Mackie A. R., Round A. N., Rigby N. M., Macierzank A., 2012. Food Digestion. 3: 8-15.
- Saki A.. 2005. Int. J. Poult. Sci. 4: 4-6.
- Uni Z., Smirnov A., Sklan D., 2003. Poultry Science. 82.
- Yeani M., Korver D. 2008. Poult. Sci. 87: 2052-2063.

Figure 1. : Taux de mortalité la première semaine de vie

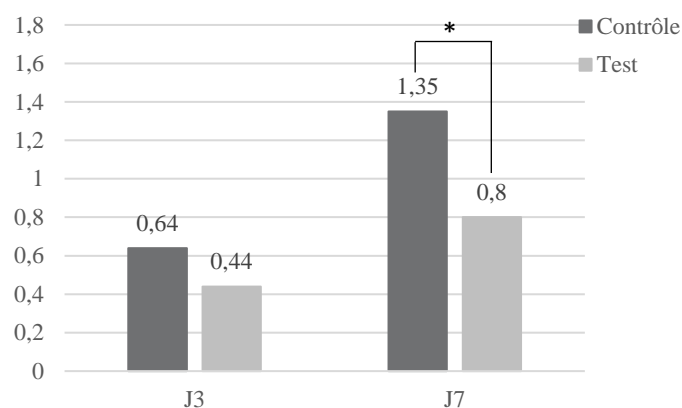
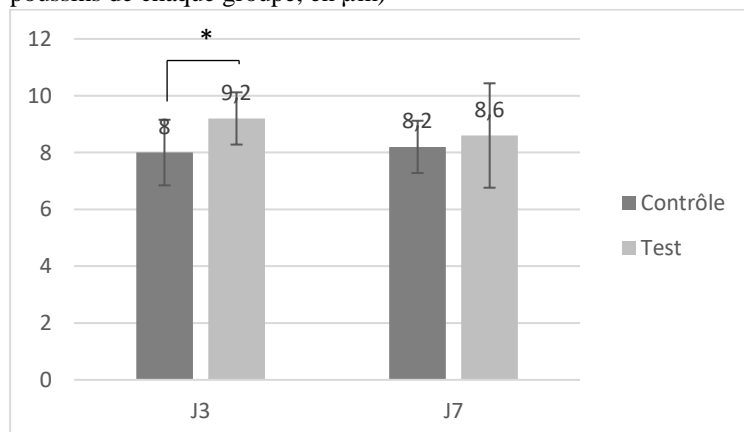


Figure 2. : Taille moyenne des vacuoles à mucus des cellules à gobelets (mesurée sur 3 sections prélevées sur 10 poussins de chaque groupe, en μm)



IMPACT D'UN EXTRAIT D'ALGUE SUR LE TRANSFERT IMMUNITAIRE DES POULES REPRODUCTRICES

Frédéric Bussy^a, Matthieu Le Goff^a, O. Mathiaud^b, B. Quero^b

^a Olmix group, ZA du Haut du Bois, 56580 Bréhan, France, ^b R&D Breizh, 56500 Moustoir Ac, France

fbussy@olmix.com

RÉSUMÉ

Pendant les premières semaines de vie, les poussins sont sensibles car leur système immunitaire est immature. Les anticorps maternels apportent une première protection spécifique. Cependant, après le pic de ponte et entre 45 à 55 semaines d'âges, la qualité du transfert immunitaire est réduite et peut être liée à une immunodépression des reproducteurs. Dans ce contexte Olmix a développé un produit appelé Searup[®], contenant le MSP[®]IMMUNITÉ (Polysaccharide Sulfaté d'origine algal ayant des activités immunomodulatrices). Pour étudier l'impact de ce produit sur les performances de pontes ainsi que sur le transfert immunitaire chez les issus, un essai a été réalisé pendant 16 semaines (de la semaine 33 à la semaine 48) sur deux bâtiments de poules reproductrices ROSS 308. Les poules ont été transférées à 20 semaines d'âges. Le lot contrôle, composé de 5 661 poules a suivi le plan de prophylaxie standard tandis que le lot test constitué de 5 559 poules a reçu du Searup[®] à raison de 0,5L pour 1000L d'eau. Le produit a été administré 2 jours par semaine, aux semaines 33 à 36 puis aux semaines 47 et 48. Les performances de pontes et la mortalité des poules ont été récoltées quotidiennement alors que les performances d'éclosion ont été récoltées hebdomadairement. Le transfert immunitaire a été évalué à partir du taux de IgY dans le jaune analysé avec un kit SRID aux semaines 31, 36, 38, 40 et 42. Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel R via le test de Mann-Whitney (p-value fixée à 5%). L'analyse des performances de ponte a mis en évidence une augmentation significative de l'éclosabilité et de l'éclosion dans le lot test (respectivement + 1% et + 2%, p<0,05). D'autre part, une réduction de la mortalité des poules a été observée dans le lot test. Concernant le transfert immunitaire, l'administration de produit a permis d'augmenter le taux d'IgY dans le jaune (+ 5%). Le renforcement du système immunitaire des poules pondeuses a permis une augmentation du transfert immunitaire ainsi qu'un meilleur taux d'éclosion. La marge économique a été améliorée, via une augmentation du nombre de poussins commercialisés (+37%).

ABSTRACT

Algae extracts impact immune transfer on broiler breeder's

During the first weeks of life, chicks are sensitive as their immune system is not fully developed. Maternal antibodies bring a first specific protection. However, after the laying peak and between 45 to 55 weeks of age, the quality of immune transfer decreased, and it can be link to an immunodepression of breeders. In this context, Olmix developed a product called Searup[®], containing the MSP[®]IMMUNITY (Sulfated Polysaccharide from seaweed with immunomodulation activities). To study the impact of this product on laying performances and on immune transfer at offspring, a study was carried out for 16 weeks (between 33 to 48 weeks of age) on two buildings of broiler breeders genetic ROSS 308. The transfer of the pullets took place on week 20. Control group composed of 5,661 broiler breeders was following the standard prophylaxis of the farm while test group of 5,559 broiler breeders received Searup[®], at 0.5 L for 1,000 L of drinking water. The product was administered 2 days by week, at weeks 33 to 36 then weeks 47 & 48. Laying performances and mortality were collected daily while hatchability rate was recorded weekly. Besides, to evaluate the immune transfer, total levels of IgY in yolk were regularly analysed using a SRID Kit at different times: week 31, 36, 38, 40 and 42. Statistical analysis were realized on R software *via* Mann-Whitney test (p-value fixed at 5%). Laying performances analysis showed a significant increase of hatchability and hatched egg in test group (respectively: + 1% and + 2%, p<0,05). On the other hand, a decrease of mortality was observed in test group. Concerning immune transfer, the product increases total level of IgY in the yolk part (+ 5%). The reinforcement of broiler breeder immune system enables an increase of immune transfer and a better hatched egg rate. The economical margin is improved *via* an increase of number of DOC (+37%).

INTRODUCTION

Pendant les premières semaines de vie, les poussins sont sensibles à de nombreux agents pathogènes car leur système immunitaire est immature. Les anticorps maternels sont transférés des poules aux poussins *via* l'œuf (Hamal et al., 2006). Au début de la période post-éclosion, la transmission verticale des anticorps apporte une première protection spécifique contre les pathogènes (Hamal et al., 2006). Cette première protection maternelle est importante car la synthèse endogène des anticorps a été détectée dans le plasma seulement à partir de 3 à 4 jours d'âge (Leslie et al, 1973). Cependant, après le pic de ponte et entre 45 à 55 semaines d'âges, la qualité du transfert immunitaire est réduite et peut être liée à une immunodépression des reproductrices (McCorkle & Glick, 1980). Dans ce contexte Olmix a développé un produit contenant un extrait d'algue spécifique (Polysaccharide Sulfaté d'origine algual). Plusieurs études (Berri et al 2016, 2017, Guriec et al 2018) ont mis en évidence l'activité immunomodulatrice de cet extrait à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ces propriétés peuvent être utilisées pour améliorer l'immunité des poussins et les performances des reproducteurs. L'objectif de l'essai était d'étudier l'impact du produit sur le transfert immunitaire et les performances de ponte.

1. MATERELS ET METHODES

1.1 Animaux

L'essai a été réalisé dans un élevage commercial de poules reproductrices de génétique ROSS 308. Les poules ont été transférées à 20 semaines d'âge et placées dans deux bâtiments identiques. Les deux groupes ont suivi le même plan alimentaire correspondant aux standards de la souche. Les 2 lots ont reçu une supplémentation en vitamine B conformément au programme de prophylaxie standard de l'élevage. Le bâtiment contrôle comportait 5 661 poules tandis que le bâtiment test comportait 5 559 poules. Seul le lot test a reçu le produit à raison de 0,5mL par litre d'eau, 2 jours par semaine, aux semaines 33 à 36 puis aux semaines 47 et 48. Le produit était composé principalement de polysaccharide sulfaté issu d'algue verte ayant des activités immunomodulatrices.

1.2 Mesures

Les performances de ponte et la mortalité des poules ont été récoltées quotidiennement alors que les performances d'éclosion ont été récoltées toutes les semaines. Ces données ont été collectées de la semaine 30 à la semaine 48. Le transfert immunitaire a été évalué à partir du poids moyen du jaune de l'œuf et

le taux d'anticorps Igy dans le jaune analysé avec un kit d'immunodiffusion radiale (Chicken Igy Test, IDBiotech®, Issoire 63500 France) aux semaines 31, 36, 38, 40 et 42 sur un échantillon de 30 œufs par groupe. Les performances économiques de l'élevage ont également été analysées *via* le nombre de poussin commercialisé en incluant le coût de l'additif. Le calcul a été réalisé pour 1000 œufs envoyés au couvoir.

1.3 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R *via* le test de Mann-Whitney, (risque $\alpha = 5\%$).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Performances techniques

Le poids et l'homogénéité des deux lots n'ont pas montré de différence significative pendant l'essai (résultats non communiqué). La production d'œuf n'a pas été modifiée significativement entre les deux lots respectivement 70,50 % pour le groupe contrôle et 70,60 % pour le groupe test). Néanmoins, une réduction non significative de la mortalité des poules a été observée, après 33 semaines d'âge, dans le lot test (3,11 % pour le lot contrôle et 2,48 % pour le groupe test). L'éclosabilité et le taux d'éclosion (Figure 1) étaient significativement plus élevés dans le lot test que dans le lot contrôle (respectivement : 83.67% versus 84,62% et 79.28% versus 80.90%, $p < 0,05$) sur toute la durée de l'essai soit pendant 15 semaines.

2.2 Transfert immunitaire

Concernant le transfert immunitaire, aucune différence significative n'a été observée entre les deux lots. Néanmoins, on constate que le poids du jaune et le taux en Igy (Figure 2) sont numériquement plus élevés dans le groupe test versus le groupe contrôle (respectivement 11.35g versus 11.63g ; 50.15 versus 52.78). L'augmentation en parallèle du jaune et du transfert d'anticorps Igy dans le groupe test sont donc cohérents.

L'additif *via* son activité d'immunomodulation, déjà démontré lors d'études précédentes (Berri et al 2016, Berri et al 2017 : Guriec et al 2018), aurait permis d'activer le système immunitaire des reproductrices et ainsi permis de réduire leur mortalité (- 0,63 point dans le groupe test). On peut supposer que ce transfert immunitaire profite à la descendance ici constaté par une augmentation significative du taux d'éclosion dans le lot test. De plus, des études ont montré que la quantité d'anticorps Igy transféré dans le jaune est

proportionnelle à la concentration en Igy dans le sérum maternel (Loeken and Roth, 1983 ; Al-Natour et al., 2004). Des dosages plasmatiques Igy sur les poules auraient permis de vérifier cette hypothèse.

2.3 Résultat économique

Les résultats économiques ont été calculé à partir des performances moyenne du couvoir sur les œufs collectés pendant l'essai avec une base de 1 000 œufs à couvrir (OAC, Tableau 1).

Le pourcentage d'œuf infertile a été diminué non significativement dans le lot test (13,27% versus 10,95%), ce qui a entraîné un nombre de poussin éclos supplémentaire pendant toute la durée de l'essai (+30 poussins sur 1 000 OAC). Le bénéfice de la vente des poussins a été améliorée dans le lot test (+7,75 euros pour 1 000 OAC) en raison d'une augmentation du nombre de poussins commercialisés (respectivement 798 poussins commercialisables dans le groupe contrôle versus

829 pour le groupe test sur 1000 OAC). Pour 1000 œufs envoyés au couvoir, 829 poussins du lot test ont été commercialisés contre, 798 dans le lot contrôle, soit 31 poussins supplémentaires (Tableau 1). Bien que l'administration du produit représente un coût, le bénéfice net de la commercialisation des poussins a été augmenté de 5,24 euros /1000 OAC dans le lot test.

CONCLUSION

Chez les poules reproductrices, il est important de soutenir le système immunitaire pour garantir la qualité et la survie des poussins. Dans cet essai, l'administration de l'additif testé, dans les conditions de l'essai a permis d'améliorer les performances de ponte (éclosion et éclosabilité) et de protéger la santé des reproducteurs. Ce renforcement immunitaire expliquerait l'augmentation du transfert en anticorps Igy de 5%. L'augmentation significative du taux d'éclosion dans le groupe test a permis d'augmenter le nombre de poussins commercialisés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Al-Natour M. Q., Ward L. A., Saif Y. M., Stewart B., Keck L. D. (2004). Avian Dis. 48: 177-182.
- Berri M., Slugocki C., Olivier M., Helloin E., Jacques I., Salmon H., Demais H., Le Goff M., Nyvall Collén P. (2016). J Appl Phycol. 28.
- Berri M., Olivier M., Holbert S., Dupont J., Demais H., Le Goff M., Nyvall Collén P. (2017). Algal Research. 28: 39-47.
- Guriec N., Bussy F., Gouin C., Mathiaud O., Quero B., Le Goff M., Nyvall Collén P. (2018). Frontiers in Immunology. 9.
- Hamal K. R., Burgess S. C., Pevzner I. Y., Erf G. F. (2006). Poultry Science. 85: 1364–1372.
- Leslie G., Martin L. (1973). J. Immunol. 110: 959-967.
- Loeken M. R., Roth T. F. (1983). Immunology. 49: 21–28.
- McCORKLE F., Glick B. (1980). Poultry Science. 59: 669–672.

Figure 1 : Taux d'éclosion moyen de la semaine 33 à 48 (%)

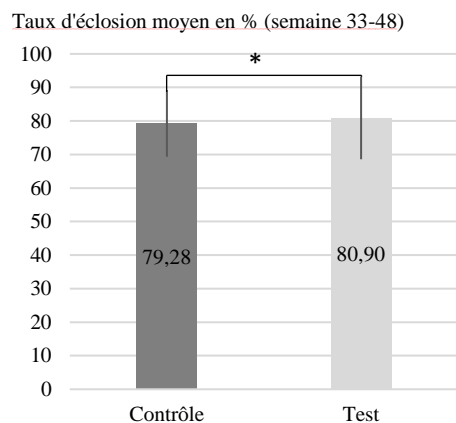


Figure 2 : Taux en anticorps Igy (mg/ml) par jaune

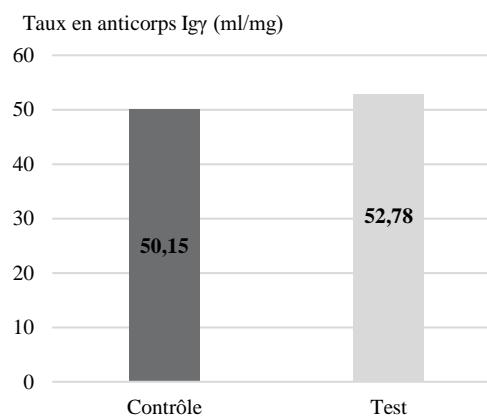


Tableau 1 : Résultats économiques calculés pour 1000 œufs à couvrir dans les conditions locales (de la semaine 33 à 48 de ponte).

Paramètres	Contrôle Pour 1000 OAC	Test Pour 1 000 OAC	Variation
Œufs Infertiles (%)	13,27	10,95	2,32
Nombre d'œufs fertiles	867	890	+23
Eclosion (%)	93,31	94,31	+1
Nombre de poussins	810	840	+30
Taux de tri (%)	1,57	1,38	-0,19
Nombre de poussins commercialisés	798	829	+31
Bénéfice des poussins commercialisés (€) sous l'hypothèse d'un prix de poussin de 0.25€	199,50	207,25	+7,75
Coût du produit (€/1000 OAC)	0	2,51	+2,51
Bénéfices net (€/1000 OAC)	199,50	204,74	+5,24

EFFET D'UN MELANGE D'ACIDES ORGANIQUES SUR LES PERFORMANCES ET LA SANTE INTESTINALE DU POULET DE CHAIR : LES ACIDES ORGANIQUES LIBRES ET TAMPONNES, UNE ALTERNATIVE AUX ANTIBIOTIQUES ?

Le Meur-Boitier Marjolaine¹, Roubos-Van Den Hil Petra², De Groot Nienke², Ding Ying³, Wu Ying³, Zhang Kai³

¹Trouw Nutrition France, 12 rue Pernelle, 75004 Paris, France, ²Trouw Nutrition R&D, PO Box 220, 5830 AE Boxmeer, Pays-Bas, ³ Université d'agriculture du Sichuan, Yaan, 625014 Sichuan, Chine
marjolaine.lemeur@trouwnutrition.com

RÉSUMÉ

La lutte contre l'antibiorésistance est reconnue comme une problématique de santé publique qui nécessite de trouver des solutions alternatives aux antibiotiques en élevage de poulet. Cette étude explore les effets d'un mélange d'acides organiques sur les performances de croissance et la santé intestinale du poulet. 900 poussins d'un jour mâles furent distribués aléatoirement en 3 traitements (n = 15, 20 oiseaux par case), comprenant : 1) Témoin négatif (TN), 2) Témoin positif (TP, 40 ppm de Bacitracine de Zinc) et 3) un additif par eau de boisson (AEB) à 0,15%. Les animaux furent élevés sur litière et reçurent un aliment commercial en deux phases. Durant les 42 jours de l'étude, le poids et l'ingéré de chaque case furent enregistrés. Aux jours 21 et 42, la sévérité des pododermatites fut évaluée. Des prélèvements de jabot et d'intestin provenant d'un poulet par case furent réalisés pour évaluer les paramètres de santé intestinale, l'expression du gène des protéines des jonction serrées, l'histologie, le décompte des bactéries et des acides gras volatiles (AGV). Les résultats indiquent que AEB augmente significativement le poids à 42 jours (3,164 kg) comparé à TN (2,972 kg) et TP (2,981 kg) (P<0,001). La prise alimentaire sur les périodes 1-21 jours, 22-28 jours et 1-42 jours est significativement améliorée pour AEB comparé à TN et TP (P<0,05). L'indice de consommation des animaux AEB est significativement amélioré sur les périodes 1-21 jours et 21-42 jours en comparaison avec TN, et significativement inférieur sur la période 1-42 jours pour AEB (1,560) par rapport à TN (1,597) et TP (1,582) (P<0,05). AEB diminue la sévérité des pododermatites aux jours 21 et 42 (P<0,05). L'expression du gène des protéines des jonctions serrées dans le jéjunum augmente significativement chez AEB par rapport à TN (P<0,05). Le nombre de cellules Goblet jéjunales des animaux AEB est significativement supérieur à celui de TN et TP (P<0,05). Le taux d'AGV est significativement supérieur dans le groupe AEB à 42 jours. Dans le groupe AEB, le nombre d'entérobactéries du jabot tend à être plus faible (p = 0.054) et est significativement inférieur dans le caecum (P<0,05) par rapport à TN et TP à 42 jours. Ces résultats indiquent que le mélange d'acides organiques tamponnés testé peut être une alternative aux antibiotiques tout en maintenant les performances et en améliorant les paramètres de santé intestinale.

ABSTRACT

Effective replacement of in-feed antibiotics with a blend of free and buffered organic acids on performance and gut health in broilers

This study explores the effect of a drinking water additive (DWA), a blend of free and buffered organic acids, on growth performance, health status and gut microbiota of broiler chickens. 900 one day-old male broiler chickens were randomly assigned to 3 treatments (n = 15, 22 birds per pen), including: 1) negative control (NC), 2) positive control (PC, 40 ppm Bacitracin zinc in feed) and 3) a drinking water additive (DWA), at 0.15%. The results indicated that DWA significantly improved body weight at day 42, feed intake day 1-42 and feed conversion ratio day 1-42 compared to NC and PC. These results indicate that using a DWA containing free and buffered organic acids could represent an alternative to in-feed antibiotics in broilers, while maintaining performance and improving different gut health parameters.

INTRODUCTION

Des niveaux de production élevés associés à une conversion alimentaire efficace sont indispensables à la bonne rentabilité de la filière avicole. L'utilisation des antibiotiques dans l'alimentation comme promoteur de croissance a longtemps été utilisé pour stabiliser le microbiote intestinal, améliorer les performances zootechniques et prévenir certaines pathologies intestinales (Hassan *et al*, 2010). Suite à l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques utilisés pour le traitement d'infections humaine et animale, la Commission Européenne a décidé, en janvier 2006, de bannir l'utilisation des antibiotiques comme facteurs promoteur de croissance. Le retrait des antibiotiques a permis de répondre à une problématique de santé publique et de se rapprocher des attentes sociétales. Cela a aussi nécessité une remise en question des pratiques d'élevage car l'arrêt des antibiotiques promoteurs de croissance a entraîné une baisse des performances des animaux, une augmentation de l'indice de consommation et une augmentation de l'incidence de certaines maladies animales comme l'entérite nécrotique (Dibner & Richards, 2005). L'objectif de cette étude est de déterminer si un mélange d'acides organiques libres et tamponnés utilisé par eau de boisson permet d'obtenir des performances zootechniques et des paramètres de santé intestinale équivalents à ceux obtenus par l'utilisation d'antibiotique comme promoteur de croissance.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et traitements

L'étude a été réalisée à l'université d'agriculture du Sichuan en Chine. Un total de 900 poussins mâles Ross 308 d'un jour d'âge ont été aléatoirement répartis dans trois groupes de 300 individus logés dans 15 cases de 20 sujets. Tous les animaux ont reçu un aliment commercial standard découpé en deux phases (tableau 1) et de l'eau *ad libitum*. Le groupe témoin négatif (TN) a reçu l'aliment sans supplémentation. Le groupe témoin positif (TP) a reçu l'aliment avec une supplémentation en antibiotique : 40 ppm de bacitracine de Zinc/ kg d'aliment. Enfin le groupe additif par eau de boisson (AEB) a reçu l'aliment blanc et une eau de boisson supplémentée durant toute la période d'élevage par du Selko pH, un mélange d'acides organiques libres et tamponnés (acide formique, acide acétique, acide propionique, acide benzoïque, formiate d'ammonium), à un dosage de 1,5L/ 1000L d'eau. Le dosage de ce produit a été déterminé en amont de l'essai par la réalisation

d'une titration de l'eau pour atteindre un pH de l'eau de boisson de 3,8. La qualité bactériologique de l'eau n'a pas été testée en début ou au cours de l'essai.

1.2. Paramètres mesurés

Durant les 42 jours de l'essai et sur les périodes d'élevage 0-21 jours et 21-42 jours, le gain moyen quotidien (GMQ), la consommation d'eau et d'aliment, l'indice de consommation (IC) ont été enregistrés. Aux jours 21 et 42, des prélèvements de la litière de chaque case ont été réalisés pour déterminer la teneur en eau et l'intégrité des pattes a été évaluée. Cette évaluation a été réalisée en se basant sur un système de note allant de 0 à 7 conformément à la procédure de Mayne *et al* (2007), 0 représentant une excellente intégrité des pattes et 7 une intégrité des pattes médiocre. L'évaluation des lésions des pattes a été réalisée sur les deux pattes et le résultat final correspondait à la moyenne des deux notes obtenues. Au jours 21 et 42, des prélèvements d'intestin et de jabot ont été réalisés sur un oiseau par case afin d'évaluer la taille des villosités, la profondeur des cryptes, l'expression des gènes des protéines des jonctions serrées et le décompte des bactéries.

1.3. Analyses statistiques

L'unité expérimentale choisie pour l'analyse statistique est la case de 20 animaux. Une différence entre les traitements est considérée comme significative si $p < 0,05$. Une comparaison par paire des moyennes des traitements (Test de Tukey) a été utilisé pour déterminer les différences significatives entre les traitements.

2. RESULTATS

2.1. Performances zootechniques

Cette étude met en évidence une amélioration significative du GMQ, de l'IC et de l'ingéré des animaux ayant consommé le traitement AEB par rapport aux témoins positif et négatif ($p < 0,01$) (tableau 2). L'utilisation des acides organiques augmente significativement le poids à 42 jours (3,164 kg) comparé à TN (2,972 kg) et TP (2,981 kg) ($P < 0,001$). La prise alimentaire sur les périodes 1-21 jours, 22-28 jours et 1-42 jours est significativement améliorée pour AEB par rapport à TN et TP ($P < 0,05$). L'indice de consommation des animaux AEB est significativement amélioré sur les périodes 1-21 jours et 21-42 jours en comparaison avec TN, et significativement inférieur sur la période 1-42 jours pour AEB (1,560) par rapport à TN (1,597) et TP (1,582) ($P < 0,05$). L'utilisation

d'acides organiques par eau de boisson a permis d'améliorer l'intégrité des pattes aux jours 21 et 42 ($p < 0,05$) (tableau 3).

2.2. Santé intestinale

Les analyses histologiques des prélèvements intestinaux du jour 42 mettent en avant une amélioration significative du ratio taille des villosités/ profondeur des cryptes dans le jéjunum et l'iléon des animaux du traitement AEB par rapport à ceux de TN ($p < 0,05$) et une amélioration numérique de ce paramètre par rapport aux animaux du TP (tableau 4). L'expression jéjunale du gène de la protéine des jonctions serrées Claudin-1 augmente significativement pour les animaux du groupe AEB par rapport à TN ($p < 0,05$) (tableau 4). A 42 jours, le nombre de cellules Goblet est significativement supérieur dans le jéjunum des animaux AEB par rapport aux deux témoins ($p < 0,05$). Au jour 42, le décompte des entérobactéries tend à être inférieur dans le jabot ($p = 0,054$) et est significativement inférieur dans les caeca ($p < 0,05$) des animaux AEB par rapport aux deux témoins. A 42 jours, les concentrations en acides gras volatiles (AGV) des caeca des animaux AEB sont significativement différentes des deux témoins pour le propionate et le butyrate ($p < 0,05$) (tableau 5).

DISCUSSION

L'amélioration des performances zootechniques et des paramètres de santé intestinale des animaux ayant consommés le mélange d'acides organiques libres et tamponnés corrobore les résultats des études réalisées précédemment. L'utilisation d'acides organiques permet une amélioration de l'utilisation des nutriments, de la croissance et de l'indice de consommation (Luchsadt & Mellor, 2009) et peut contribuer à une meilleure protection des poussins par une compétition exclusive lors de la colonisation de l'intestin (Mansoub *et al*, 2011). L'obtention de performances similaires voire

supérieures lors de l'utilisation d'acides organiques en comparaison avec des antibiotiques promoteurs de croissance permet de supposer que les acides organiques sont une alternative possible aux antibiotiques (Fascina *et al*, 2012) et ont une activité similaire (Wang *et al*, 2009). Les acides organiques administrés par l'aliment ou l'eau de boisson permettent de réduire le nombre de bactéries dans les caeca (Hamed & Hassan, 2013) ainsi que le nombre de coliforme tout au long de l'intestin (Paul *et al*, 2007). Cette réduction du nombre de bactéries s'accompagne d'une augmentation de la taille des villosités dans le duodénum, le jéjunum et l'iléon (Kum *et al*, 2010 ; Rodriguez-Lecompte *et al*, 2012). En comparaison avec les antibiotiques, les acides organiques permettent une augmentation supérieure de la taille des villosités et de la profondeur des cryptes de l'intestin (Garcia *et al*, 2007). Selon Dibner & Buttin (2002), la réduction des bactéries pathogènes de l'intestin permet de réduire l'impact des toxines produites par celles-ci sur la structure des villosités et des cryptes ce qui permet une amélioration de l'histomorphologie de l'intestin.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude suggèrent que le remplacement des antibiotiques promoteur de croissance par un mélange d'acides organiques libres et tamponnés permet d'améliorer les performances de croissance des poulets de chair. Les analyses histologiques de la muqueuse intestinale présentent une amélioration du ratio taille des villosités/ profondeur des cryptes ce qui suggère une meilleure santé intestinale ou un microbiote plus stable. Les décomptes bactériens réalisés dans le jabot et les caeca soulignent que le mélange d'acides organiques utilisé permet une meilleure gestion des entérobactéries dans le tractus digestif. Enfin, l'augmentation de l'expression du gène d'une protéine de jonctions serrées est un indicateur pourrait indiquer une amélioration de la structure de la muqueuse intestinale et de la barrière épithéliale intestinale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dibner, J.J. Buttin, R.J., 2002. J Appl Poultry Res. 11:453–463.
 Dibner, J.J., Richards, J.D., 2005. Poultry Sci. 84:634–643.
 Fascina, V.B., Sartori, J.R., Gonzales, E. Barros De Carvalho, F. Pereira De Souza, I.M.G, Polycarpo, G.V. Stradiotti, A.C. Pelicia, V.C., 2012. Revista Brasileira de Zootecnia. 41(10):2189–2197.
 García, V. Catalá-Gregori, P. Hernández, F. Megías, M.D. Madrid, J., 2007. J Appl Poultry Res. 16:555–562.
 Hamed, D.M. Hassan, A.M.A., 2013. Res Zool. 3(1):15–22.
 Hassan, H.M.A. Mohamed, M.A. Youssef, A.W. Hassan, E.R., 2010. Asian-Aus J Animal Sci. 23(10):1348–1353.
 Kum, S. Eren, U. Onol, A. Sandikci, M., 2010. Revue de Médecine Vétérinaire. 161:463–468.
 Lückstädt, C. Mellor, S., 2011. Recent Adv Animal Nutr Aus. 18:123–130.
 Mansoub, N.H., Karim, R. Leila, M. Mohammad, A.M.N. Seyede, L.Z. Mehdi, M.K., 2011. World J Zool. 6(2):179–182.
 Mayne, R.K. Else, R.W. Hocking, P.M., 2007. British Poultry Science, 48:5, 538-545

- Paul, S.K. Halder, G. Mondal, M.K. Samanta, G., 2007. J Poultry Sci. 44:389–395.
- Rodríguez-Lecompte, J.C. Yitbarek, A. Brady, J. Sharif, S. Cavanagh, M.D. Crow, G. Guenter, W. House, J.D. Camelo-Jaimes, G., 2012. J Animal Sci. 90:2246–2254.
- Wang, J.P. Yoo, J.S. Lee, J.H. Zhou, T.X. Jang, H.D. Kim, H.J. Kim, I.H., 2009. J Appl Poultry Res. 18:203–209.

Tableau 1. Composition et principales caractéristiques nutritionnelles des aliments expérimentaux.

Phase	Phase 1 (1-21d)	Phase 2 (22-42d)
Matières premières	Proportion %	Proportion %
Maïs	39.6	41.24
Huile de soja	2.82	3.53
Tourteau de soja	33.76	30.74
Blé	20.1	21
Carbonate de calcium	1.05	0.86
Phosphate dicalcique	1.4	1.33
Lys-HCl	0.24	0.27
DL- Met	0.25	0.25
Sel	0.40	0.40
Chlorure de choline	0.15	0.15
Premix	0.23	0.23
Total	100.00	100.00
Caractéristiques nutritionnelles		
ME (kcal/kg)	2950	3020
Protéine brute, %	21	20
Dig lys	1.15	1.1
Dig met	0.5	0.48
Dig cys	0.3	0.29
M+C (total disponible)	0.86	0.83

Traitement	Poids moyen à 42 jours (g)		GMQ 1-42j (g)		IC 1-42j		Consommation alimentaire 1-42j (g)	
	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET
TN	2972.3 ^a	120.1	2925.8 ^a	119.8	1.597 ^b	0.032	4669.2 ^a	129.7
TP	2981.6 ^a	61.7	2935.0 ^a	62	1.582 ^b	0.024	4642.0 ^a	90.9
AEB	3164.3 ^b	93.8	3118.0 ^b	94	1.560 ^a	0.034	4862.8 ^b	156.3
P valeur linéaire	0.00		0.00		0.063		0.00	
P valeur-quadratique	0.00		0.00		0.157		0.00	

Tableau 2. Performances zootechniques des animaux sur la période de l'essai 1-42 jours.

TN : Témoin négatif. TP : Témoin Positif. AEB : TN+ mélange acides organiques. GMQ : gain moyen quotidien. IC : indice de consommation. ET : écart type
Les moyennes affectées de lettres différentes (a,b) dans une même colonne diffèrent significativement

Tableau 3. Evaluation de la sévérité des pododermatites aux jours 21 et 42.

Traitement	Evaluation à 21 jours		Evaluation à 42 jours	
	Moyenne	ET	Moyenne	ET
TN	0.82 ^b	0.21	4.09 ^b	1.72
TP	0.84 ^b	0.29	4.13 ^b	1.62
AEB	0.39 ^a	0.19	2.41 ^a	1.25
P valeur linéaire	0		0.006	
P valeur quadratique	0		0	

TN : Témoin négatif. TP : Témoin Positif. AEB : TN+ mélange acides organiques. ET : écart type.
 Les moyennes affectées de lettres différentes (a,b) dans une même colonne diffèrent significativement (p<0,05). La notation de la sévérité des pododermatites est basée sur un système allant de 0 à 7 : 0 pour une excellente intégrité des pattes et 7 pour une intégrité médiocre des pattes

Tableau 4. Ratio longueur des villosités/ profondeur des cryptes du duodénum, jéjunum et iléon des animaux à 42 jours.

Traitement	Duodénum		Jéjunum		Iléon	
	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET
TN	8.78	2.8	4.92 ^a	1.24	5.04 ^a	1.79
TP	9.68	2.27	6.22 ^{ab}	2.16	5.80 ^{ab}	1.39
AEB	9.12	0.79	7.40 ^b	1.42	7.09 ^b	1.12
P valeur	0.238		0.002		0.032	

TN : Témoin négatif. TP : Témoin Positif. AEB : TN+ mélange acides organiques. ET : écart type.
 Les moyennes affectées de lettres différentes (a,b) dans une même colonne diffèrent significativement

Tableau 5. Concentration en acides gras volatiles dans les caeca à 42 jours

Traitement	Acétate (g/kg)		Propionate (g/kg)		Butyrate (g/kg)	
	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET
TN	2.91	0.41	0.68 ^a	0.14	0.71 ^a	0.17
TP	3.49	0.88	0.58 ^a	0.12	1.12 ^{ab}	0.45
AEB	4.5	1.35	1.02 ^b	0.18	1.42 ^b	0.57
P value	0.181		0.004		0.009	

TN : Témoin négatif. TP : Témoin Positif. AEB : TN+ mélange acides organiques. ET : écart type.
 Les moyennes affectées de lettres différentes (a,b) dans une même colonne diffèrent significativement

MISE A JOUR DE LA PREVALENCE DE LA MALADIE DE DERZSY DANS LES ELEVAGES DE CANARDS PRETS-A-GAVER DES PAYS-DE-LA-LOIRE ET DU POITOU-CHARENTES

Babin Charley¹, Perreul Guillaume², Fontaine Julie¹

¹*FILI@VET – 7 rue des artisans - 79300 BRESSUIRE,*

²*BOEHRINGER INGELHEIM – 16 rue Louis Pasteur – 44119 TREILLIERES*
c.babin@reseau cristal.fr

RÉSUMÉ

Depuis la dernière étude de la prévalence de la maladie de Derzsy, réalisée en 2009, la filière PAG a fortement évolué avec notamment le passage à la bande unique et l'augmentation de la taille des lots.

Afin d'évaluer la prévalence actuelle de ce virus, nous avons recherché par PCR l'ADN viral dans 40 élevages de canards PAG, en réalisant dans chacun d'eux 25 écouvillonnages cloacaux sur des animaux de 8 à 12 semaines. Ces résultats sont mis en relation avec la situation de l'élevage, son fonctionnement, les signes cliniques observés, l'historique de maladie de Derzsy et la vaccination afin de rechercher des facteurs de risques.

Les résultats obtenus ont montré une importante augmentation de la prévalence du virus dans ces régions, passant de 16% de positivité en 2009 à 45% en 2018. La majorité des élevages positifs en PCR sont situés dans une zone de production importante (Loire-Atlantique, nord des Deux-Sèvres et nord de la Vendée) suggérant une diffusion locale. Cependant, une diffusion par les différents flux d'élevage n'est pas à écarter, le pourcentage de positivité étant différent entre les organisations de production.

Aucun facteur de risque avéré n'a pu être mis en évidence, cependant les lots positifs ont tendance à provenir d'élevages avec plus de bâtiments et d'unités de production. Le pourcentage de positivité est aussi plus important sur les lots claustrés.

Enfin, la clinique s'est avérée très hétérogène entre les élevages, mais la présence d'au moins un des symptômes « becs courts », « ailes cassantes » ou « baisse de performances » est corrélée à une positivité en PCR. Cependant, l'ADN du parvovirus a été également présent dans 19% des élevages sans aucun signe clinique.

ABSTRACT

Update of Derzsy disease prevalence in mule duck breeding farms in the regions of 'Pays de la Loire' and 'Poitou-Charentes'

Since the last study of Derzsy disease prevalence, in mule ducks in 2009, there has been significant evolution in the sector. Notably there has been transition to single age breeding, increasing the number of ducks per batch. The causative agent for this disease is a parvovirus.

In order to estimate the current prevalence of this virus, we researched viral DNA by PCR in 40 duck farms, realizing in each of them 25 cloacal swabs on animals from 8 to 12 weeks old. We related the results to the breeding location, its functioning, the observed clinical signs, the history of Derzsy disease and the vaccination to look for risk factors.

We found an important increase of the Derzsy disease virus prevalence in these regions, from 16% positivity in 2009 to 45% in 2018. The major part of PCR positive farms were located in a big production area (Loire-Atlantique, north of Deux-Sèvres and north of Vendée) which suggests a local diffusion. However, the difference of positivity between production organizations suggests a breeding flow dissemination.

The data analysis didn't highlight statistical risk factor, but PCR positive batches tend to come from breeding with more livestock buildings and production units. The percentage of PCR positivity also seems higher in confined batches.

Finally, an important heterogeneity was found between clinical signs observed in breeding farms, but there was a statistical correlation between PCR positivity and the presence of at least one of the items : « short beak », « brittle wings » or « performance decrease ». However, the parvovirus was found in 18% of the breeding farms without clinical signs.

INTRODUCTION

La maladie de Derzsy fait partie des dominantes pathologiques dans les élevages de canards, en particulier dans les élevages de prêts-à-gaver (PAG). Elle est due à un parvovirus très résistant dans le milieu extérieur qui possède un tropisme pour les cellules en multiplication, engendrant des troubles digestifs, osseux, de croissance, ... dont l'importance augmente avec la précocité de l'infection.

Si la forme précoce de la maladie aboutit au syndrome « nanisme – bec court » bien connu sur le terrain, un passage viral plus tardif peut engendrer des baisses de performances sans symptôme spécifique (le parvovirus n'est alors pas forcément recherché). Ainsi il est difficile de déterminer la prévalence et l'importance économique de la maladie de Derzsy.

Une étude de prévalence a été réalisée par Merial en 2009, révélant la présence du parvovirus de la maladie de Derzsy dans 16% des élevages des Pays-de-la-Loire et 9% des élevages du Poitou-Charentes⁽¹⁾. Depuis, les modes de production ont fortement évolué : les lots comportent plus de canards mais ceux-ci sont élevés en bande unique. Les effets de ces changements sur un virus très résistant, capable de s'accumuler dans l'environnement, sont difficiles à prévoir. Cette étude a pour but de mettre à jour les données sur la prévalence de cette maladie dans les régions Poitou-Charentes et Pays-de-la-Loire et de rechercher des éventuels facteurs de risque.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Prélèvements et analyses

L'étude a été réalisée dans 40 élevages du Poitou-Charentes et des Pays-de-la-Loire, sélectionnés aléatoirement, travaillant avec 7 organisations de production différentes qui ont été anonymées dans l'étude (notées de A à G). La répartition des élevages selon les départements est la suivante :

- 8 élevages dans le Maine-et-Loire (49)
- 5 élevages en Loire-Atlantique (44)
- 12 élevages en Vendée (85)
- 13 élevages dans les Deux-Sèvres (79)
- 1 élevage en Vienne (86)
- 1 élevage en Charente (16)

Dans chacun de ces élevages, nous avons réalisé des écouvillons cloacaux sur 25 canards aléatoirement choisis, âgés entre 8 et 12 semaines, pour rechercher l'ADN du parvovirus de la maladie de Derzsy (GPV) par PCR. Le kit utilisé est le kit commercial PCR Anicon (kylt® MDPV/GPV).

1.3. Commémoratifs

Afin de rechercher des facteurs des risques, nous collectons auprès des éleveurs les informations suivantes :

- Identification de l'élevage, localisation, organisation de production

-Données techniques : lot prélevé, souche, âge des animaux, date de mise en place de la bande unique.

-Environnement : proximité d'autres élevages ou salles de gavage

-Caractéristiques de l'élevage : nombre d'unités de production avec fonctionnement indépendant, claustration ou accès aux parcours, densité au démarrage, âge au desserrage, nombre de bâtiments ...

-Clinique évocatrice de la maladie de Derzsy (présence de becs courts, d'ailes cassantes, baisse de performances)

-Historique de maladie de Derzsy et vaccination

1.4. Analyse statistique

Ces données sont mises en relation avec les résultats obtenus par PCR et analysées à l'aide du logiciel R. Le test de Khi-Deux est utilisé pour l'analyse des variables qualitatives (ex : analyse par région, par organisation de production) et les tests ANOVA et de Kruskal-Wallis sont utilisés pour l'analyse des variables quantitatives (ex : âge des animaux, nombre d'unités de production)

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Elevage, localisation, organisation de production (OP)

Le parvovirus a été isolé dans 18 des 40 élevages prélevés, soit une prévalence de 45%, nettement plus élevée que celle observée en 2009.

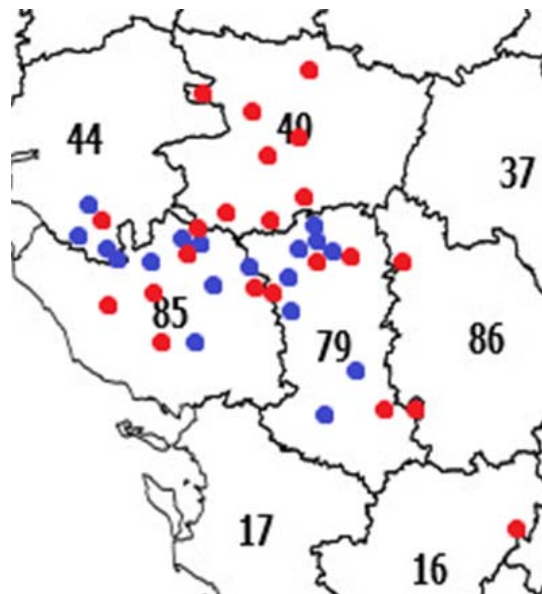


Figure 1. Cartographie des résultats PCR (positifs en bleu, négatifs en rouge).

Les élevages positifs en PCR étaient très majoritairement localisés dans une grosse zone d'élevage, comprenant le nord des Deux-Sèvres, le nord de la Vendée et le sud de la Loire-Atlantique, comme le montre la Figure 1 ci-dessus. A l'inverse, le parvovirus n'a été isolé dans aucun des élevages de Maine-et-Loire.

Si ces données suggèrent une diffusion locale du virus, une diffusion par les flux d'élevages ne peut pas être écartée. En effet, le pourcentage de positivité est différent entre les organisations de production (Figure 2). Il faudrait cependant plus de données pour confirmer cette hypothèse, certaines organisations de production n'étant représentées que par un faible nombre d'élevages.

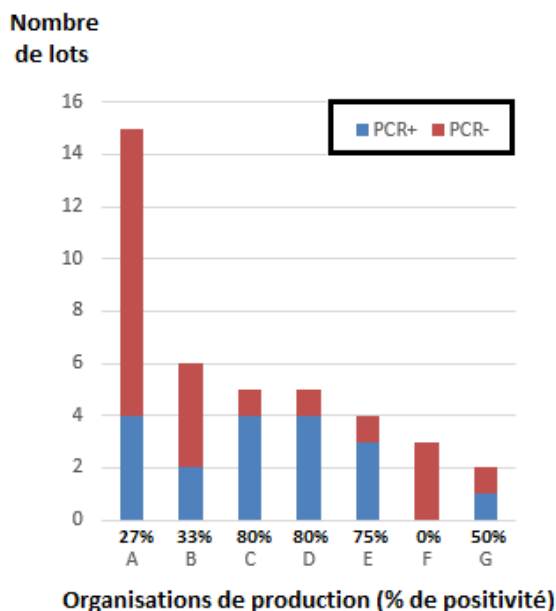


Figure 2. Résultats obtenus par OP

On remarque de plus que l'âge de prélèvement n'a pas d'incidence sur la positivité des résultats, l'âge moyen entre les lots positifs et négatifs en PCR n'étant pas significativement différent (données non publiées).

2.2. Environnement et fonctionnement de l'élevage

De la même façon, nous n'avons pas trouvé de lien entre les positivités en PCR et la proximité d'un autre atelier (PAG ou gavage).

Pour ce qui est du fonctionnement des élevages, les lots où l'ADN viral a été retrouvé semblent provenir d'ateliers plus volumineux. En effet le nombre d'unités de production moyen des élevages positifs en PCR est de 1,83 contre 1,29 pour les lots négatifs en PCR (Tableau 1, $p=0,06$). Ces lots sont aussi démarrés et desserrés dans plus de bâtiments. Enfin, on retrouve plus de positivités dans les lots claustrés que dans ceux avec accès extérieur (Tableau 2, résultats non significatifs).

2.3. Historique et symptômes

L'analyse de l'historique de maladie de Derzsy n'a pas été concluante, la présence du parvovirus n'étant recherchée que lors du syndrome nanisme-becs courts. En revanche, il existe une corrélation entre la présence d'ADN viral et la celle de symptômes de la maladie de Derzsy en élevage (Tableau 3, $p<0,01$). En effet, on

retrouve le parvovirus de la maladie de Derzsy dans 63% des élevages présentant au moins un des symptômes « becs courts », « ailes cassantes » ou « baisses de performance rapportées ». De la même façon, 81% des élevages sans aucun symptôme reviennent négatifs en PCR.

Cependant la clinique ne reflète pas exactement les résultats PCR obtenus :

- Certains élevages ont rapporté la présence de symptômes sans mise en évidence d'ADN viral, les baisses de performances et fragilités osseuses pouvant avoir d'autres origines.

- On retrouve de l'ADN viral dans 19% des élevages ne présentant aucun des trois symptômes étudiés. Ceci concorde avec l'évolution de cette maladie, pouvant évoluer à bas bruit dans des bandes successives.

- La clinique est très hétérogène en fonction des élevages. En effet, dans les 18 élevages positifs en PCR, 4 seulement avaient rapporté les trois signes cliniques « becs courts », « ailes cassantes » et « baisse de performances », 3 élevages n'avaient signalé aucun symptôme, les 12 autres présentaient un tableau clinique incomplet. Il est donc difficile, dans ces conditions, de diagnostiquer la maladie de Derzsy sans avoir recours à un examen complémentaire.

2.4. Vaccination

Dans les élevages étudiés, aucun ne pratiquait un plan de vaccination complet (double vaccination : couvoir + élevage). La seule vaccination couvoir, effectuée dans 5 élevages, ne semble pas avoir d'influence sur la présence d'ADN viral entre 8 et 12 semaines.

CONCLUSION

Cette étude nous a permis de remettre à jour les données sur la prévalence de la maladie de Derzsy dans les élevages des Pays-de-la-Loire et du Poitou-Charentes. Celle-ci a fortement augmenté en une dizaine d'années, le virus étant aujourd'hui présent dans 45% des élevages de ces régions, à analyse équivalente. Les données collectées semblent indiquer qu'une diffusion par les flux d'élevages s'ajoute à une forte diffusion locale, en touchant préférentiellement les gros ateliers où la pression virale est plus importante, le virus pouvant résister aux protocoles de nettoyage/désinfection et au vide sanitaire.

La clinique observée est très hétérogène dans les élevages positifs en PCR : certains lots ne présentent aucun symptôme alors que d'autres comportent des becs courts, des ailes cassantes et des baisses de performances. Enfin, les baisses de performances rapportées sont majoritairement des baisses de poids de carcasse mais ne résultent pas d'une analyse technico-économique. Il serait intéressant de réaliser une telle étude dans ces élevages afin de pouvoir chiffrer l'impact économique de la présence du virus de la maladie de Derzsy.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

(1) Enquête épidémiologique 2009 RC Services-Merial. Journée biosécurité PAG Bazas. Juin 2009

Résultat de la PCR	PCR-	PCR+
Nombre moyen d'unités de production	1,29	1,83
Nombre moyen de bâtiments de démarrage	1,13	1,33
Nombre moyen de bâtiments de desserrage	1.54	1.67

Tableau 1. Comparaison du fonctionnement des lots positifs et négatifs en PCR ($p>0,05$)

Claustration en place	oui	non
% de positivité	55%	38%

Tableau 2. Pourcentage de positivité et clausturation ($p>0,05$)

Résultat de la PCR	PCR-	PCR+
Au moins un symptôme « bec court » « ailes cassantes » ou « baisse de performances	9	15
Aucun des symptômes « bec court » « ailes cassantes » ou « baisse de performances	13	3

Tableau 3. Corrélation entre les résultats PCR et la clinique ($p<0,01$)

EVALUATION DE 3 MOYENS DE PREVENTION DU RISQUE COCCIDIOSE SUR LES PERFORMANCES DU POULET DE CHAIR

Canin Amandine, Mahieu Anne, Desbordes Pierre, Greuter Amaury, Domitile Renaud

IDENA – 21 rue du Moulin – 44880 Sautron

amandine.canin@idena.fr

RÉSUMÉ

La coccidiose est une maladie provoquée par le développement et la multiplication de parasites du genre *Eimeria* (coccidies) dans la muqueuse intestinale des volailles. L'ajout de molécules anticoccidiennes dans l'aliment permet de limiter l'infection et de diminuer les risques de coccidioses cliniques tout en maintenant les performances techniques des animaux. La vaccination des poussins au couvoir est une méthode alternative permettant également le contrôle de la coccidiose. Enfin, l'incorporation d'extraits végétaux dans l'aliment, actifs contre les coccidies, est une troisième solution. L'objectif de cet essai est de comparer les performances de poulets de chair recevant l'une de ces 3 solutions préventives de la coccidiose. 1 920 poulets de chair (Ross 308) d'un jour sont séparés en 3 groupes (8 parcs de 80 poulets par groupe). Les 3 groupes reçoivent le même programme alimentaire (démarrage 1-10 jours : EMA = 2 950 kcal/kg, 21 % PB – croissance 11-21 jours : EMA = 3 000 kcal/kg, 19 % PB – finition 22-35 jours : EMA = 3 000 kcal/kg, 17,5 % PB). Les poulets du groupe G1 sont supplémentés, dans l'aliment, avec l'association de deux anticoccidiens (narasin et nicarbazine, 50 g chacun / T d'aliment) sur les phases démarrage et croissance et avec un anticoccidien (narasin, 60 g / T d'aliment) sur la période de finition. Les poulets du groupe G2 sont vaccinés contre la coccidiose à J1 (5 souches vaccinales anticoccidiennes vivantes atténuées). Les poulets du groupe G3 reçoivent, sur toute la période d'élevage, un mélange d'extraits de plantes et d'huiles essentielles, incorporé à 0,25% dans l'aliment complet. Les animaux sont élevés sur litière paille, à une densité de 15 animaux / m². A chaque transition alimentaire, le poids moyen des animaux et la consommation d'aliment sont calculés par parc. Les résultats sont analysés par une ANOVA à 2 facteurs sans interaction (bloc complet aléatoire). Des scores lésionnels (Johnson et Reid, 1970) sont réalisés à 28 jours sur 2 poulets par parc. A 35 jours, aucune différence significative n'est obtenue entre les groupes pour le poids des animaux (G1 = 2 102 g, G2 = 2 065 g, G3 = 2 054 g) et l'indice de consommation (G1 = 1,604, G2 = 1,607, G3 = 1,619). Aucune lésion intestinale n'a été observée sur les poulets analysés. Ces résultats confortent ceux préalablement obtenus en station ou sur le terrain avec ces mêmes extraits végétaux. Ils montrent que la supplémentation à base d'extraits naturels végétaux dans l'aliment représentent des voies alternatives intéressantes pour le maintien des performances chez le poulet de chair.

ABSTRACT

Coccidiosis is a disease resulting from development and multiplication of protozoa genus *Eimeria* in the avian gut epithelium. Addition of anticoccidian products in the feed can reduce infection and decrease clinic coccidiosis risks as well as keep technical performances. Chickens vaccination in the hatchery is another method to control coccidiosis. Furthermore, herbs extracts added in the feed is a third solution. The assay target is to compare broilers performances receiving the 3 preventive solutions. 1 920 day-old chickens (Ross 308) are divided in 3 groups (8 parks of 80 broilers each). The 3 groups get the same feed program (Starter 1-10 days: AME = 2 950 kcal/kg, 21 % CP – Growth 11-21 days: AME = 3 000 kcal/kg, 19 % CP - Finisher : 22-35 days : AME = 3 000 kcal/kg, 17,5 % CP). G1 group broilers receive in the feed 2 anticoccidians (50 ppm narasin + 50 ppm nicarbazin) during Starter and Growth periods and narasin (60 ppm) during Finisher period. Group G2 broilers are vaccinated against coccidiosis (5 attenuated live strains) in the hatchery. G3 group broilers receive in the feed a blend of plants extracts and essential oils (incorporated at 0,25 % in the feed). Birds are reared on straw litter (density = 15 / m²). At each feed change, body weight and feed consumption are measured in each park. Results are analyzed by ANOVA with 2 factors. Lesions scores (Johnson & Reid, 1970) are measured at 28 days in 2 broilers / park. At 35 days, there is no significant difference between groups regarding body weight (G1=2 102 g, G2=2 065 g, G3=2 054 g) and feed conversion ratio (G1=1,604, G2=1,607, G3=1,619). No gut lesion is watched in necropsied broilers. These results confirm former trials in experimental station or in the field. The study allows to conclude that plants extracts in feed are good alternative solutions for maintaining zootechnical performances in broilers.

INTRODUCTION

La coccidiose du poulet (*Gallus gallus*) est une maladie provoquée par le développement et la multiplication de 7 espèces de protozoaires du genre *Eimeria* (Creveieu-Gabriel et Naciri, 2001). L'ajout, dans l'aliment, de molécules coccidiostatiques [au statut d'additifs, autorisés par le règlement (CE) n°1831/2003], permet de limiter l'infection et de diminuer les risques de coccidioses cliniques tout en maintenant les performances zootechniques. Toutefois, peu de molécules ont une efficacité similaire sur les différentes espèces d'*Eimeria* (McDougald, 2003) et on observe l'apparition de résistance des coccidies aux différents anticoccidiens (Chapman, 2005). La vaccination des poussins (par spray à 1 jour au couvoir ou sur l'aliment ou à 3 jours en élevage, par addition dans l'eau de boisson) est une méthode alternative permettant également le contrôle de la coccidiose mais qui présente encore un coût supérieur à la chimioprévention. L'incorporation d'extraits végétaux dans l'aliment est une 3^{ème} solution. Des essais menés par IDENA en collaboration avec l'INRA AIM (Apicomplexes et Immunité Mucosale) ont montré des effets protecteurs de certains produits in vitro. Ces essais ont permis d'établir que des actifs végétaux peuvent agir à deux moments clefs du développement du parasite. Ils inhibent l'invasion parasitaire (jusqu'à 60 %) des cellules épithéliales. Sur un autre modèle de viabilité des sporozoïtes (test au iodure de propidium), l'efficacité des composés résulte d'un effet direct sur le parasite (100 -50 % de mortalité). Sur les phases de développement, qui est une étape de multiplication intense des parasites dans les cellules épithéliales intestinales, certains actifs ont montré une réduction de plus de 90 % du développement des parasites intracellulaires, à des doses non létales pour les cellules épithéliales. L'objectif de cet essai est de comparer les performances de poulets de chair recevant l'une de ces 3 solutions préventives de la coccidiose, de valider leur innocuité et leur efficacité.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'étude s'est déroulée dans la ferme expérimentale de l'IRTA à Constantí (Espagne) selon les principes de l'Union Européenne du bien-être animal et de l'expérimentation et les normes ISO 9001 :2015, SOPs PG-75 (conduite de recherches) et IT-0602-F-011 (qualité de l'aliment fabriqué).

1.1. Animaux et élevage

Un total de 1920 poussins Ross 308 mâles d'un jour (issus d'un couvoir commercial) sont séparés en 3 groupes de 8 parcs, à raison de 80 poulets par parc de 6,25 m² (soit une densité proche de 700 cm²/

oiseau). Ils sont vaccinés au couvoir contre la bronchite infectieuse et la maladie de Gumboro (souche vivante atténuée Winterfield 2512 par injection). Le bâtiment est éclairé artificiellement, chauffé au gaz et ventilé par dépression. La température ambiante est de 32-34°C à la mise en place puis elle décroît de 3°C par semaine. L'éclairage est de 24 h les 2 premiers jours puis de 18 heures jusqu'au 7^e jour et de 14 h après. La litière est en paille tandis que l'aliment et l'eau sont à volonté.

1.2. Alimentation

Le programme alimentaire [maïs (entre 46 et 55 %) et tourteau de soja (entre 23 et 32 %) majoritaires] est résumé dans le tableau 1.

Tableau 1: Programme alimentaire

	Démarrage	Croissance	Finition
Age	J1-10	J11-21	J22-35
E.M. kcal /kg	2 950	3 000	3 000
Présentation	Miettes	Granulés 3 mm	
Protéines	21 %	19 %	17,5 %

Les 3 groupes de poulets sont caractérisés dans le tableau 2.

Tableau 2: Caractéristiques des produits testés

G1	G2	G3
Narasin (50 ppm) + nicarbazine (50 ppm) en Démarrage puis narasin (60 ppm) en Croissance & Finition	Vaccination coccidiose à J1 par spray (5 souches vivantes atténuées : <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. mitis</i> et <i>E. tenella</i>) en élevage	Extraits de plantes et d'huiles essentielles (FORCIX PY) à 0,25 % en continu dans l'aliment

1.3. Mesures

Le poids vif (P.V.) moyen par parc est mesuré à J10, J21 et J35 (pesée d'un parc entier divisé par le nombre d'animaux total). Le Gain Moyen Quotidien (G.M.Q.) est également calculé : différence entre le Poids moyen en fin de période et celui en début de période divisé par le nombre de jour (les animaux morts n'ont pas été pris en compte).

La consommation d'aliment par période est mesurée pour chaque parc. L'indice de consommation est calculé en divisant le total d'aliment consommé par période sur le gain de poids total durant la période (animaux vivants + morts et sacrifiés).

Le score lésionnel de l'intestin supérieur (*E. acervulina* et *E. mitis*), moyen (*E. maxima* et *E. necatrix*), inférieur (*E. brunetti*) et des cæca (*E. tenella*) est effectué à 21 jours d'âge selon la

méthode de Johnson et Reid (1970) sur 2 oiseaux par parc.

1.4. Traitement des données

Les résultats sont comparés à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) à 2 facteurs, selon un plan expérimental randomisé en 8 blocs complets correspondant à la localisation des parcs dans le bâtiment et 3 traitements de 8 répétitions chacun.

Des comparaisons multiples de moyennes sont effectuées à l'aide du test de Duncan lorsque les résultats de l'ANOVA sont significatifs au seuil de $P < 0.05$.

2. RESULTATS

2.1 Performances zootechniques

Les performances techniques des 3 groupes sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3: Performances techniques par période et par traitement

Résultats 0-10 jours			
	G1	G2	G3
P.V. kg	0,269 ±0,0098	0,270 ±0,0063	0,273 ±0,0099
G.M.Q. g / j	22,5	22,6	22,9
I.C.	1,142	1,139	1,128
Résultats 11-20 jours			
P.V. kg	0,992 ±0,0284	0,988 ±0,0232	0,989 ±0,0355
G.M.Q. g / j	60,3	59,8	59,6
I.C.	1,379	1,391	1,371
Résultats 21-35 jours			
G.M.Q. g / j	85,4	82,8	82,0
I.C.	1,861	1,869	1,913
Résultats 0-35 jours			
P.V. kg	2,102 ±0,072	2,065 ±0,058	2,054 ±0,132
I.C.	1,604	1,607	1,619
G.M.Q. g / j	58,8	57,7	57,5

D'un point de vue statistique, il n'y a pas de différence significative entre les performances techniques des 3 groupes tout au long de l'essai. Les performances sont en dessous du standard de la souche de poulets (ROSS 308), en raison principalement de la température ambiante élevée (essai estival en juin & juillet 2018).

2.2. Score lésionnel

Aucune lésion n'a été observée.

3. DISCUSSION

Les performances du groupe G3 (ayant reçu sur toute la période d'élevage, un mélange d'extraits de plantes et d'huiles essentielles) sont similaires au groupe G2 (vaccination PARACOX 5) avec -0.2g de GMQ (ns) et +0.012 d'IC (ns). G2 et G3 ayant des performances non significativement différentes du G1 (narasin + nicarbazine puis

narasin) avec -1.3 g de GMQ et +0.015 d'IC (ns). La vaccination et l'utilisation d'un mélange spécifique d'extraits végétaux et huiles essentielles constituent donc bien une alternative aux additifs obtenus par synthèse ou fermentation dans le champ plus vaste de la déparasitologie.

Les résultats pour la vaccination confirment les publications et résultats obtenus sur le terrain. Selon Hafez, 2008, la vaccination a montré son efficacité en tant qu'alternative aux anticoccidiens chimiques et ionophores. Des essais menés par Williams (1994 et 2002), ont montré que des animaux vaccinés contre la coccidiose à l'aide de souches atténuées obtenaient des performances techniques similaires à des animaux ayant reçu un anticoccidien chimique ou ionophore, bien que des lésions aient pu être observées sur certains animaux. Dans notre essai, aucune lésion n'a été observée. Ces résultats confirment l'innocuité de la prévention de la coccidiose par un vaccin. Toutefois, des baisses de performances, souvent associées à des passages d'entérite d'origine bactérienne, notamment dans les premières semaines de vie de poulets, sont reportés dans certains essais, lorsque les animaux étaient vaccinés contre la coccidiose (Chapman, 2002, Kuçukyilmaz, 2012). Dans un cadre plus large que la prévention contre la coccidiose, l'utilisation de vaccin peut également permettre de réensemencer des bâtiments d'élevage avec des populations sensibles de coccidies et limiter ainsi l'apparition de résistance aux anticoccidiens chimiques ou ionophores (Chapman, 2012).

Les résultats obtenus avec le mélange d'extraits de plantes et huiles essentielles confirment des précédents essais effectués avec ces mêmes extraits, tant en station expérimentale que sur le terrain, depuis 2003 : les performances zootechniques sont comparables à celles des poulets recevant des coccidiostatiques et testés en comparaison. Ces résultats sont synthétisés dans le tableau 4 (données IDENA non publiées). Dans cette étude, aucune inoculation expérimentale n'a été effectuée. Toutefois, dans un essai réalisé en station expérimentale en 2014 chez des poulets de chair inoculés à 14 jours avec 2 espèces de coccidies (*E. maxima* et *E. tenella*), aucune différence significative n'avait été obtenue entre les performances des poulets supplémentés dans l'aliment avec le même mélange d'extraits de plantes et d'huiles essentielles et ceux protégés par un anticoccidien ionophore (maduramicine). Le groupe témoin, dont les poulets avaient été inoculés avec les deux espèces de coccidies, mais n'ayant pas reçu de protection anticoccidienne dans l'aliment, avait obtenu des performances significativement inférieures aux 2 autres groupes avec -8,5% de poids vif et +30% d'IC pour les poulets inoculés avec *E. maxima* et -17% de poids

vif et +23% d'IC pour ceux inoculés avec *E. tenella* (Essai privé IDENA, 2014 – non publié). Plus récemment, en 2018, un essai terrain réalisé dans un bâtiment conventionnel de 1500m² séparé en 2x750m² par un grillage central, a comparé le même mélange d'extraits de plantes et huiles essentielles dans l'aliment au programme anticoccidien habituellement utilisé dans cet élevage (Narazin-Nicarbazine de 0 à 21j et Narazin de 22j à l'abattage). A l'abattage à 36 jours, les deux lots de poulets avaient obtenu des performances techniques conformes aux objectifs de productions. Le résultat du contrôle parasitaire, effectué pour les deux groupes à 23 jours (contrôle coccidiose réalisé sur 5 poulets par groupe dans un laboratoire vétérinaire indépendant) indiquait des lésions intestinales faibles pour les deux lots. Le lot ayant reçu le mélange d'extraits de plantes et d'huiles essentielles obtenait un score moyen de 1,4 sur une échelle de 4 (lésions à *E. acervulina*) et le lot recevant le traitement anticoccidien habituel obtenait un score de 2,4 en moyenne. Aucune lésion n'avait été observée pour les autres espèces de coccidies pour les 2 lots (*E. maxima*, *E. tenella*, *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. mitis*). Ces résultats témoignaient de la présence d'une pression

coccidienne dans l'élevage, mais également d'une protection efficace (Essai privé IDENA, 2018 – non publié).

Les résultats obtenus dans cette étude confirment donc l'intérêt du mélange d'extraits de plantes et d'huiles essentielles testé pour le maintien des performances des poulets de chair, non vaccinés contre la coccidiose, ou non protégés par un anticoccidien associant une molécule chimique et un ionophore.

4. CONCLUSION

En conclusion, cette étude indique que la vaccination ou les suppléments à base d'extraits naturels végétaux dans l'aliment représentent des voies alternatives intéressantes pour le maintien des performances de poulets de chair ne recevant pas d'anticoccidiens conventionnels. La vaccination ou les suppléments à base d'extraits naturels végétaux dans l'aliment semblent être deux approches efficaces pour la démedication des élevages de poulets de chair.

Tableau 4: Résumé des essais IDENA conduits depuis 2003 avec les actifs du groupe G3

Année de l'essai	Espèce/souche	Nombre animaux par traitement	Age	T1=Additif extraits de plantes et huiles essentielles		T2=Coccidiostatique	
				P.V. (g)	I.C.	P.V. (g)	I.C.
Essai avec inoculation E. maxima à 14j							
2014	Poulet Cobb500 (Specific Pathogen Free broilers)	15	J25	1143	1,446	Maduramicine (7 ppm)	
						1123	1,383
Essai avec inoculation E. tenella à 14j							
2014	Poulet Cobb500 (Specific Pathogen Free broilers)	15	J25	1118	1,442	Maduramicine 7 ppm)	
						1131	1,443
Essais station expérimentale							
2003	Poulet ROSS 308	7x320 par traitement	J35	1743	1,57	Monensin + nicarbazine	
						1749	1,56
2003	Poulet Cobb500	4x251 par traitement	J42	2893	1,714	Monensin + nicarbazine	
						2891	1,722
						Monensin + lasalocide	
						2899	1,731
						semduramicine	
2854	1,751						
Essais terrain							
2004	Poulet Cobb500	29 475 (T1) 34 557 (T2)	J48	3343	-	Lasalocide + diclazuril	
						3364	-
2004	Poulet Vedette	23 000 par traitement	J34	1851	1,604	Robénidine	
						1813	1,611
2003	Poulet	22 000 par traitement	J35	1760	1,725	Halofuginone	
						1788	1,746
2004	Poulet ROSS PM3	23 000 par traitement	J36	1773	1,73	Lasalocide	
						1845	1,67
2013	Poulet ROSS PM3	6 450 par traitement	J45	3282	1,76	Monensin	
						3249	1,77
2018	Poulet ROSS PM3	17 034 par traitement	J36	1947	1,63	Narazin+Nicarbazine (0-21j) et Narazin (22-36j)	
						2013	1,60

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chapman H.D., 2002. Intern. Journ. For Paras., 32, 617-629
Chapman H.D., 2005. IX International Coccidiosis Conference, 99-103
Crevieu-Gabriel I., Naciri M., 2001. INRA Prod. Anim., 14.4, 231-246.
Hafez Mohamed Hafez, 2008. Arch.Geflügelk, 72 (1). S. 2- 7
Johnson J., Reid W.M., 1970. Experimental Parasitology, 28.1, 30-36.
Kuçukyilmaz K., 2012, Ital.J.Anim.Sci., 11:e1, 1-8
McDougald. L.R., 2003. Iowa State Press, 974-991
Naciri M., 2001. Conférence 12 septembre 2001
Williams R.B., 1994, Vet.Rese.Com, 18, 189-198
Williams R.B., 2002, Avi.Path, 31, 253-265