

SOMMAIRE

Page 1

La tremblante atypique :
approche épidémiologique
d'une maladie sporadique

Page 5

Étude de l'usage des antibiotiques
en aviculture – une approche
pharmaco-épidémiologique

Page 7

Bilan de la caractérisation moléculaire
des souches de *Listeria monocytogenes*
isolées de merguez et de charcuterie
dans le cadre des plans de contrôle
mis en place par la Direction générale
de l'Alimentation en 2008 et en 2009

Page 12 - Brèves

- Aménager les cages des poules pondeuses : quels effets sur leur santé, leurs performances et leur bien-être ?
- Transmissibilité expérimentale des encéphalopathies spongiformes transmissibles aux poissons
- Les Hantavirus : virus à découvrir ou à redécouvrir
- Détection d'une contamination par *Salmonella* de sérotype Typhimurium multirésistante dans les filières bovine et équine en Normandie

ÉDITORIAL

Nous vous proposons dans ce numéro 37 du *BE* une synthèse des études épidémiologiques récentes qui ont permis de mieux comprendre les paramètres et les déterminants de la tremblante atypique, une maladie découverte récemment.

Après vous avoir présenté le Résapath dans les numéros 34 et 36, nous poursuivons les investigations sur le thème de l'antibiorésistance par une approche originale, celle de la pharmaco-épidémiologie en production avicole. Une brève nous alerte également de la présence de souches de *Salmonella* Typhimurium multirésistantes en filières bovine et équine en Normandie.

Enfin, le dernier article présente le bilan de la caractérisation moléculaire des souches de *Listeria monocytogenes* isolées des plans de contrôle 2008 et 2009. *Listeria monocytogenes*, communément répandue dans l'environnement, peut provoquer une maladie rare mais grave, notamment chez la femme enceinte. C'est ainsi l'occasion de rappeler que la consommation de fromages au lait cru ou à pâte molle, ainsi que la viande crue ou peu cuite et certaines charcuteries leur est déconseillée (recommandations PNNS, voir le rapport de l'Afssa : <http://www.afssa.fr/Documents/MIC-Ra-ListerioseAliments.pdf>).

La dématérialisation du *BE* se poursuit, puisque désormais les articles peuvent être téléchargés individuellement sur le site de l'Afssa. De nouvelles évolutions sont prévues pour la fin de l'année, telles que la recherche d'articles parus depuis le début de la publication, ou l'abonnement en ligne à la version électronique.

Le comité de rédaction

La tremblante atypique : approche épidémiologique d'une maladie sporadique

Alexandre Fediaevsky (1), Christian Ducrot (2), Didier Calavas (3)

(1) Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche, Direction générale de l'Alimentation, Bureau de la santé animale

(2) Inra Theix, UR346 EA, 63122 Saint Genès Champanelle

(3) Afssa, Laboratoire d'études et de recherches en pathologie bovine et hygiène des viandes, Lyon

La tremblante atypique des petits ruminants a été découverte de façon fortuite. Les caractéristiques épidémiologiques et physiopathologiques de cette maladie sporadique la séparent clairement de la tremblante classique. La tremblante atypique semble peu ou pas contagieuse et se développe chez des animaux âgés, sous l'influence de facteurs de risque génétiques et/ou environnementaux. Les mesures de contrôle ont été adaptées aux connaissances actuelles mais aussi à leurs limites, certaines questions restant en suspens.

INTRODUCTION

La tremblante est une encéphalopathie spongiforme transmissible (EST), dont les premières descriptions cliniques remontent au XVIII^e siècle (mais qui n'a été scientifiquement caractérisée qu'à la fin du XIX^e siècle). C'est une maladie neurodégénérative, d'évolution toujours fatale qui affecte les ovins et les caprins. Bien qu'étant une maladie rare, c'est une maladie réputée contagieuse (MRC) depuis 1996, souvent difficile à appréhender qui reste d'actualité. La forme de tremblante dite atypique a été découverte il y a une dizaine

d'années. Cet article synthétise les éléments de connaissance qui ont été produits récemment grâce aux efforts de recherche dont elle a fait l'objet et grâce aux programmes de surveillance des EST.

RAPPELS SUR LES EST

Les EST se caractérisent par une évolution lente et l'accumulation spécifique d'une protéine anormale, la protéine prion pathologique (PrP^{Sc}). La PrP^{Sc} est un isomère d'une métalloprotéine physiologique (PrP^C) dont le rôle n'est pas totalement élucidé et qui pourrait jouer un rôle dans la régulation du stress oxydatif. Selon la théorie du prion, désormais largement admise, la PrP^{Sc} serait l'agent infectieux responsable des EST en induisant la transconformation de la PrP^C en PrP^{Sc}.

Chez l'Homme, on distingue des formes d'EST résultant de l'exposition à une PrP^{Sc} exogène et des formes d'EST d'origine génétique résultant de la production de PrP^{Sc} endogène à la faveur de mutation génétique portant sur le gène PRNP codant pour la protéine prion. Les EST sont généralement assez spécifiques d'une espèce mais peuvent infecter une autre espèce, notamment dans le cas de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) dont l'agent infectieux peut induire une forme d'EST humaine, le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. La transmission de l'agent responsable de la tremblante à l'Homme n'a jamais été démontrée.

CONTEXTE DE LA DÉCOUVERTE DE LA TREMBLANTE ATYPIQUE

La possibilité biologique d'un passage de l'ESB chez les petits ruminants a été associée au risque de développement d'une maladie zoonotique cliniquement proche de la tremblante. Pour cette raison des programmes européens de surveillance des EST des petits ruminants ont été mis en place, d'abord sur la base d'une surveillance clinique puis sur la base d'une surveillance active à l'abattoir et à l'équarrissage, réalisées à partir de tests de dépistage sur l'encéphale.

C'est dans ce cadre que des formes inhabituelles de tremblante ont été détectées, d'abord en Norvège en 1998 (baptisée Nor98) [1] puis dans le reste de l'Europe à partir de 2002 [2]. En 2005, l'Autorité européenne de sécurité des aliments a publié une définition phénotypique de la tremblante atypique (comprenant Nor98) [3].

La tremblante atypique se distingue de la forme classique sur des critères diagnostiques, physiopathologiques, génétiques et épidémiologiques. Ces différences conduisent à concevoir un modèle étiologique et épidémiologique différent de celui de la tremblante classique et à adopter des mesures de police sanitaire spécifiques.

DIAGNOSTIC DE LA TREMBLANTE ATYPIQUE

Le diagnostic de confirmation des EST repose sur la mise en évidence de fragments protéiques (PrP^{Res}) issus de la dégradation enzymatique partielle de la PrP^{Sc} par la protéinase K. Le profil biochimique de la PrP^{Res} est caractéristique du type d'EST.

La première difficulté diagnostique de la tremblante atypique provient de la plus grande sensibilité de sa PrP^{Sc} à la protéinase K. Il en résulte que certains kits de diagnostic, associés à un traitement de dégradation protéique important, ne détectent pas de PrP^{Res} et concluent à tort à un résultat négatif. À partir du même échantillon, des tests incluant un traitement de dégradation protéique modéré concluent à un résultat positif, d'où la notion de résultats discordants qui a fait partie des caractéristiques initiales de la tremblante atypique [4]. L'étude plus poussée des propriétés biochimiques de la PrP^{Res} associée à la tremblante atypique montre un profil électrophorétique caractéristique à cinq bandes.

La seconde difficulté majeure pour le diagnostic de la tremblante atypique provient de la localisation des lésions et des dépôts de PrP^{Sc}. Dans le cas de la tremblante classique, la PrP^{Sc}, comme l'infectiosité, est détectable dans de nombreux tissus périphériques (les plus riches en formation lymphoïdes secondaires) et dans le système nerveux central, notamment dans la région de l'obex au niveau du tronc cérébral, qui est aussi le prélèvement de choix pour détecter l'ESB chez les petits ruminants et donc le prélèvement retenu pour les programmes de surveillance active. Dans le cas de la tremblante atypique, le tronc cérébral n'est pas le siège privilégié de la PrP^{Sc} ni des lésions. Celles-ci sont détectées plus fréquemment dans le cervelet et occasionnellement au niveau du cortex cérébral, jamais en dehors du système nerveux central [4].

ÉTIOLOGIE

Le caractère transmissible de la tremblante atypique a été démontré expérimentalement par inoculation intra-cérébrale chez la souris et le mouton [4]. Toutefois, certains éléments suggèrent que la tremblante atypique pourrait avoir un développement complexe dont certaines caractéristiques ne sont pas classiquement associées à une origine infectieuse. Tout d'abord, la typologie des lésions de tremblante atypique et leur localisation très centrale sont évocatrices d'une EST humaine d'origine présumée génétique, le syndrome de Gertsmann-Straüssler-Scheinker [1].

D'un point de vue génétique, chez les ovins, certains génotypes s'avèrent particulièrement touchés, notamment les porteurs des allèles AFRQ et ALHQ [4]. Contrairement aux EST génétiques humaines, tous les génotypes sont susceptibles et la pénétrance ne semble pas complète chez les génotypes les plus sensibles (propension des porteurs d'allèles de sensibilité à développer la maladie). Par ailleurs la sensibilité génétique à la tremblante atypique ne correspond pas à celle de la tremblante classique [5].

L'âge élevé des cas, en moyenne cinq ans et demi [2], est également compatible avec un processus neurodégénératif très progressif. Cependant cet âge élevé peut aussi correspondre à une longue période d'incubation suivant une exposition pendant le jeune âge.

Les recherches de facteurs de risque n'ont pas montré l'effet de pratiques associées à des hypothèses d'origine infectieuse comme l'introduction d'animaux infectés ou l'utilisation d'aliments contaminés [6, 7], contrairement à la tremblante classique. Ces études ont contribué à montrer le rôle probable de la qualité de l'apport minéral et vitaminique, un rôle éventuel de l'exposition à des produits neurotoxiques et l'influence prépondérante de la génétique [7].

La tremblante atypique pourrait donc être une EST dont la PrP^{Sc} aurait une origine endogène et s'accumulerait tardivement, sous l'influence de facteurs de prédisposition génétiques et éventuellement métaboliques. La situation épidémiologique de la tremblante atypique est également compatible avec cette hypothèse.

SITUATION ÉPIDÉMIOLOGIQUE

Compte tenu des contraintes diagnostiques, la prévalence de la tremblante atypique a été calculée en ne comptabilisant que les tests susceptibles de la détecter. Grâce aux programmes de surveillance européens, les prévalences de la tremblante atypique et classique ont pu être estimées et comparées sur plusieurs années et pour plusieurs sous-populations d'animaux de plus de 18 mois. Ces sous-populations comprennent d'une part les animaux prélevés aléatoirement à l'abattoir qui reflètent la population générale, d'autre part les animaux prélevés aléatoirement à

Tableau 1 : Prévalence et intervalle de confiance à 95 % de la tremblante atypique et de la tremblante classique ovine détectées par la surveillance active en France entre 2002 et 2008

| | Année | Tremblante atypique | | | | Tremblante classique | | | |
|--------------|-------|---------------------|-----|----------------|-------------|----------------------|-----|----------------|-------------|
| | | Tests | Cas | Prévalence (‰) | IC 95% (‰) | Tests | Cas | Prévalence (‰) | IC 95% (‰) |
| Abattoir | 2002 | 14 627 | 11 | 0,75 | 0,38 - 1,34 | 33 663 | 16 | 0,48 | 0,27 - 0,77 |
| | 2003 | 25 477 | 22 | 0,86 | 0,54 - 1,31 | 44 267 | 19 | 0,43 | 0,26 - 0,67 |
| | 2004 | 8 366 | 4 | 0,48 | 0,13 - 1,22 | 12 377 | 6 | 0,48 | 0,18 - 1,05 |
| | 2005 | 7 544 | 8 | 1,06 | 0,46 - 2,09 | 12 170 | 3 | 0,25 | 0,05 - 0,72 |
| | 2006 | 195 942 | 107 | 0,55 | 0,45 - 0,66 | 263 181 | 21 | 0,08 | 0,05 - 0,12 |
| | 2007 | 66 183 | 34 | 0,51 | 0,36 - 0,72 | 78 654 | 6 | 0,08 | 0,03 - 0,17 |
| | 2008 | 13 725 | 6 | 0,44 | 0,16 - 0,95 | 14 813 | 1 | 0,07 | 0 - 0,38 |
| Équarrissage | 2002 | 3 839 | 4 | 1,04 | 0,28 - 2,66 | 17 323 | 104 | 5,97 | 4,88 - 7,23 |
| | 2003 | 5 611 | 7 | 1,25 | 0,5 - 2,57 | 18 864 | 24 | 1,27 | 0,81 - 1,89 |
| | 2004 | 5 183 | 2 | 0,39 | 0,05 - 1,39 | 12 228 | 19 | 1,55 | 0,93 - 2,42 |
| | 2005 | 7 980 | 5 | 0,63 | 0,2 - 1,46 | 22 073 | 29 | 1,31 | 0,88 - 1,88 |
| | 2006 | 110 872 | 82 | 0,74 | 0,59 - 0,92 | 228 465 | 161 | 0,7 | 0,6 - 0,82 |
| | 2007 | 171 087 | 135 | 0,79 | 0,66 - 0,93 | 249 240 | 73 | 0,29 | 0,23 - 0,37 |
| | 2008 | 60 161 | 34 | 0,56 | 0,39 - 0,79 | 71 456 | 17 | 0,24 | 0,14 - 0,38 |

l'équarrissage qui représentent une population à risque et enfin les animaux issus des troupeaux soumis à des mesures de police sanitaire après identification d'un cas. Compte tenu de la rareté de la maladie chez les caprins, les études de prévalence ont porté essentiellement chez les ovins.

En France, la prévalence de la tremblante atypique a été globalement stable entre 2002 et 2008 et d'un niveau similaire chez les ovins testés à l'abattoir et à l'équarrissage, entre 6 et 7 cas pour 10 000 animaux testés (Tableau 1). Pendant la même période, la prévalence de la tremblante classique a été nettement supérieure pour les ovins issus de l'équarrissage par rapport à ceux issus de l'abattoir et a diminué dans ces deux plans de surveillance, passant d'un niveau supérieur à celui de la tremblante atypique, à un niveau inférieur. Des situations similaires ont été également observées dans d'autres pays européens [2].

En France entre 2002 et 2008, la répartition géographique des deux formes de tremblante était différente. Une seule zone présentait un risque de tremblante atypique légèrement augmenté et les cas étaient répartis de façon homogène en fonction de la répartition de la population ovine. Cette situation contrastait avec la distribution de la tremblante classique qui présentait des zones de risque nettement accru ou diminué (Figure 1).

L'homogénéité spatio-temporelle de la tremblante atypique conjuguée à une prévalence très faible suggère que la survenue de la maladie ne dépend pas de l'exposition à un agent infectieux dont l'abondance à un moment et un endroit donné est tributaire d'un processus dynamique. Cette répartition suggère davantage un processus aléatoire pouvant être influencé par d'éventuels facteurs de risque, comme l'âge et la génétique. La détection récente d'un cas de tremblante atypique chez un ovin néo-

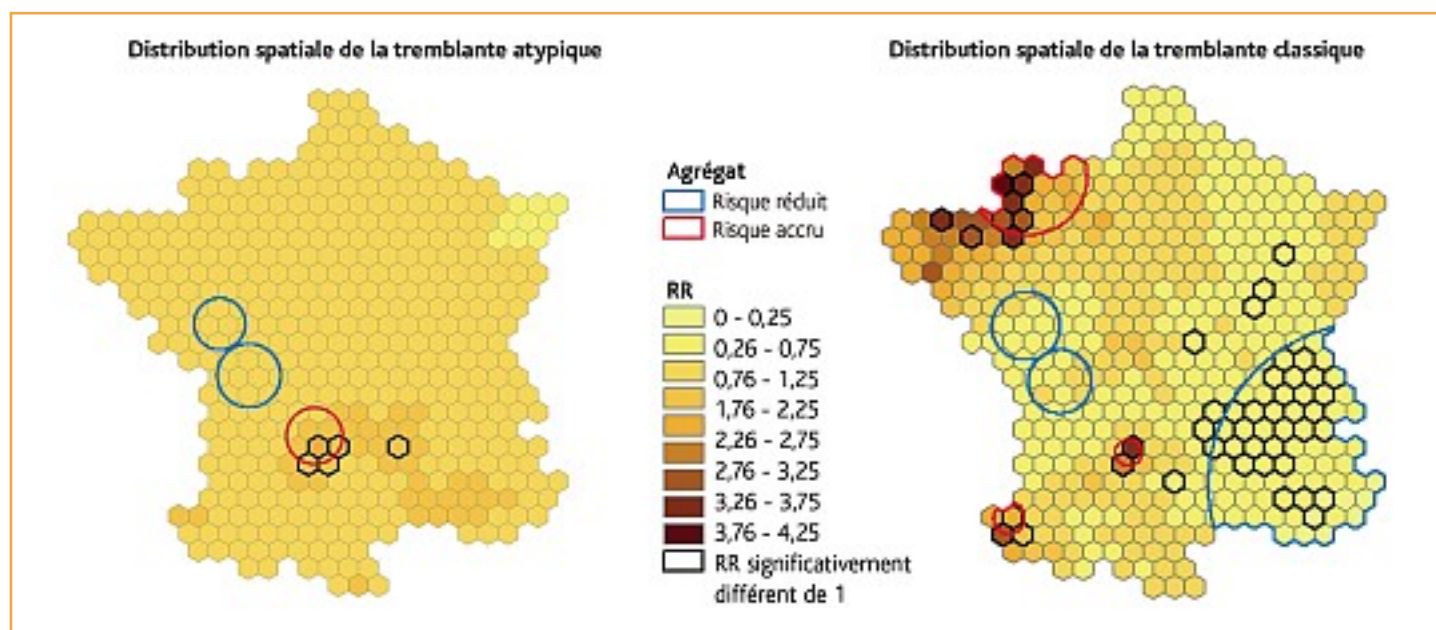


Figure 1 : Distribution spatiale de la tremblante atypique et de la tremblante classique entre 2002 et 2008. Les cercles correspondent à des agrégats de cas (rouges) ou d'absence de cas (bleus) détectés par la méthode de Kulldorff. La couleur des hexagones correspond au risque relatif établi par modèle spatial bayésien hiérarchique autorégressif.

zélandais, pays considéré comme officiellement indemne de tremblante, renforce cette hypothèse.

Dans les troupeaux d'appartenance des cas, des mesures de police sanitaire ont été appliquées, les mêmes pour la tremblante atypique et la tremblante classique. Ces mesures consistaient soit en l'abattage sanitaire des animaux génétiquement sensibles à la tremblante classique, ce qui ne permet pas de repérer tous les cas de tremblante atypique (puisque les génotypes résistants à la tremblante classique peuvent aussi être touchés), soit en une surveillance renforcée pendant trois ans par dépistage systématique des animaux de ces troupeaux à l'abattoir et à l'équarrissage. La prévalence de la tremblante atypique dans les élevages trouvés positifs n'a pas été supérieure à celle observée dans la population générale, quel que soit le type de mesure de police sanitaire appliqué [8]. À l'inverse, les prévalences de tremblante classique dans les troupeaux où le premier cas de tremblante détecté était classique étaient nettement supérieures (3,67 % en abattage sanitaire et 0,25 % en surveillance renforcée) à la prévalence de la tremblante classique à l'abattoir et à l'équarrissage. Un constat similaire a été fait dans d'autres pays européens. Les mesures de police sanitaire ayant permis ces observations n'étaient pas adaptées à l'épidémiologie de la tremblante atypique soit du fait de la sélection génétique ciblant des animaux sensibles à la tremblante classique, soit du fait d'une durée de surveillance courte par rapport à la période d'incubation probablement supérieure à cinq ans. En dépit de ces limites, ces résultats montrent que la tremblante atypique n'est pas ou très peu contagieuse et renforcent l'hypothèse d'une maladie pouvant se développer indépendamment d'une exposition à un agent infectieux.

PERSPECTIVES

Étant données la prévalence de la maladie et son apparente absence de contagiosité, la tremblante atypique ne constitue pas un enjeu majeur en santé animale. À cet égard, il ne semble pas utile de mettre en place un programme de sélection génétique destiné à réduire la fréquence des allèles les plus sensibles à la tremblante atypique (allèles AFRQ et ALHQ), dont la fréquence est par ailleurs très basse. Cela d'autant plus que le programme actuel de sélection génétique de la résistance à la tremblante classique (allèle ALRR) ne devrait pas entraîner d'augmentation de la prévalence de la tremblante atypique, la prévalence chez les animaux ALRR/ALRR n'étant pas différente de celle de la population générale.

Du point de vue de la santé publique, la dangerosité de la tremblante atypique pour l'Homme n'est pas encore bien documentée. Des expériences d'inoculation à des souris transgéniques exprimant la protéine prion humaine sont en cours. L'interprétation, toujours délicate pour ce type d'expérience, indiquera la possibilité éventuelle de franchissement de la barrière d'espèce par l'agent transmissible impliqué dans la tremblante atypique. Par ailleurs, la PrP^{Sc} et les lésions n'étant pas détectées en dehors du système nerveux central, il est probable que le retrait des matériaux à risque spécifié soit une mesure suffisante pour garantir la sécurité sanitaire du consommateur.

Toutefois, de nombreux aspects de la physiopathologie de la maladie sont encore au stade d'hypothèses à confirmer, y compris l'apparente absence de contagiosité. Les nouvelles mesures de police sanitaire de la tremblante atypique sont davantage adaptées aux connaissances actuelles de la maladie et pourront éventuellement permettre d'acquérir des éléments de connaissance supplémentaires.



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Benestad S. L., Sarradin P., Thu B., Schonheit J., Tranulis M. A., Bratberg B. (2003) Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Veterinary Record*, 153(7): 202-208.
- [2] Fediaevsky A., Tongue S. C., Noremark M., Calavas D., Ru G., Hopp P. (2008) A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries. *BMC Veterinary Research*, 4: 19.
- [3] EFSA (2005) Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on classification of atypical Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) cases in Small Ruminants (Question number EFSA-Q-2005-073) adopted on 26 October 2005. 1-30.
- [4] Benestad S. L., Arzac J. N., Goldmann W., Noremark M. (2008) Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Veterinary Research*, 39(4): 19.
- [5] Moreno C. R., Moazami-Goudarzi K., Laurent P., Cazeau G., Andréoletti O., Chadi S., Elsen J. M., Calavas D. (2007) Which PrP haplotypes in a French sheep population are the most susceptible to atypical scrapie? *Archives of Virology*, 152(6): 1229-1232.
- [6] Hopp P., Omer M. K., Heier B. T. (2006) A case-control study of scrapie Nor98 in Norwegian sheep flocks. *Journal of General Virology*, 87(Pt 12): 3729-3736.
- [7] Fediaevsky A., Morignat E., Ducrot C., Calavas D. (2009) A case-control study on the origin of atypical scrapie in sheep, France. *Emerging Infectious Diseases*, 15(5): 710-718.
- [8] Fediaevsky A., Gasqui P., Calavas D., Ducrot C. (2010) Discrepant epidemiological patterns between classical and atypical scrapie in sheep flocks under French TSE control measures. *Vet J, under press*.

Étude de l'usage des antibiotiques en aviculture – une approche pharmaco-épidémiologique

Claire Chauvin (1), François Madec (1), Pascal Sanders (2)

(1) Afssa, Laboratoire d'études et de recherches avicoles, porcines et piscicoles, Ploufragan-Brest

(2) Afssa, Laboratoire d'études et de recherches sur les médicaments vétérinaires et les désinfectants, Fougères

À l'instar de nombreux pays européens, la France a depuis 1998 mis en œuvre un programme de surveillance de l'usage des antibiotiques et de la résistance des bactéries sentinelles, zoonotiques et pathogènes dans les principales filières de production animale. Une originalité du dispositif français résidait dans l'intégration, dès l'origine, d'un volet pharmaco-épidémiologique complémentaire aux dispositifs de surveillance. Ce volet sera ici présenté au travers des travaux conduits en production avicole, de leurs principaux résultats et perspectives [1].

LA PHARMACO-ÉPIDÉMIOLOGIE

La pharmaco-épidémiologie consiste en l'application des outils et principes de l'épidémiologie à l'étude des médicaments, en tant que déterminants de l'état de santé d'une population. L'objet d'étude n'est plus alors la maladie (comme usuellement en épidémiologie) mais le recours aux médicaments, avec pour questions sous-jacentes, la détermination de: ce qui est utilisé, par qui, pourquoi, dans quelles circonstances et avec quels effets bénéfiques ou défavorables. Cette approche en conditions réelles, dans une large population, de l'usage des médicaments vient compléter les connaissances acquises par les essais cliniques préalables à la mise sur le marché. Reconnue en médecine humaine et disposant d'une société internationale, la pharmaco-épidémiologie n'a encore été que peu développée en médecine vétérinaire.

Les outils utilisés relèvent de l'épidémiologie, descriptive pour caractériser les usages aux plans quantitatifs et qualitatifs, analytique afin de déterminer des associations entre les usages et leurs déterminants ou leurs effets. De tels travaux ont été successivement mis en œuvre au cours des dernières années en filière avicole, afin de mieux connaître l'usage des antibiotiques et ses conséquences.

ÉTUDE DESCRIPTIVE DES USAGES ANTIBIOTIQUES

Dispositif d'étude et de suivi des usages en aviculture

Afin de pouvoir étudier et analyser le recours aux antibiotiques un dispositif de recueil de données dénommé *Observatoire avicole des consommations antibiotiques* a été mis en œuvre en 2003 [2]. Le programme de surveillance français comportait déjà depuis 1999 un recueil national annuel des ventes antibiotiques assuré par l'Anmv [3]. Il s'agissait de compléter ces informations par des données spécifiques relatives aux conditions d'emploi des antibiotiques: motifs d'utilisation, âge au traitement, durée d'administration, fréquence, saisonnalité, etc. L'organisation française de l'inspection *ante-mortem* des volailles permettait de collecter ces informations par le biais des fiches sanitaires d'élevage (FSE), documents transmis par les éleveurs aux abattoirs recensant les caractéristiques des lots à abattre et les traitements administrés. Des enquêtes de validation ont permis de garantir la qualité des informations en comparant les déclarations aux factures et ordonnances en élevage. Un échantillon représentatif de FSE a ainsi été mensuellement collecté auprès des abattoirs

de volailles bretons de 2004 à 2008. Chaque mois les usages antibiotiques de près de 250 lots de volailles abattus ont ainsi été enregistrés. En 2009, le dispositif a été suspendu lorsque les fiches d'information sur la chaîne alimentaire (fiches ICA) ont remplacé les FSE, les traitements désormais déclarés étant ceux administrés pendant les 30 derniers jours d'élevage.

Travaux méthodologiques

L'étude des usages antibiotiques nécessite, outre la collecte de données descriptives, la détermination des modalités d'expression des usages [4]. En effet, le recours aux antibiotiques recèle plusieurs dimensions reflétant les composantes et problématiques tout à la fois infectieuses, sanitaires, économiques et environnementales de l'antibiothérapie vétérinaire. Usuellement pour les éleveurs, la mesure économique des usages importe (coût en €), pour les industriels ce sont les volumes de spécialités antibiotiques ou principes actifs (nombre d'unités commerciales), tandis que pour l'infectiologue et le microbiologiste c'est l'intensité du recours aux différentes molécules antibiotiques qui devrait être mesurée (fraction de population traitée par exemple). Or une étude conduite en élevages de volailles a permis d'observer que toutes ces mesures ne sont pas équivalentes [5]. Les molécules antibiotiques présentent des différences importantes de prix et de posologies (dose requise pour traiter un kg de poids vif) qui ne permettent pas de convertir aisément les montants ou volumes vendus en nombre de traitements ou fraction de population exposée. Si un standard international de mesure existe en médecine humaine sous le vocable de DDD (pour « defined daily dose » ou dose journalière requise pour traiter un individu adulte), aucun n'a été validé en médecine vétérinaire, bien que des mesures proches soient d'ores et déjà employées [6,8]. La multiplicité et l'hétérogénéité des espèces à considérer compliquent l'appréhension standardisée des usages antibiotiques en médecine vétérinaire.

ÉTUDE DES DÉTERMINANTS DE L'USAGE DES ANTIBIOTIQUES

Étude de la variabilité des usages entre élevages avicoles

Les outils d'ores et déjà mis en œuvre pour mesurer les usages antibiotiques ont tous mis en lumière la variabilité des quantités utilisées entre élevages et lots d'animaux [3, 5]. Une étude a donc été conduite dans 131 élevages de dindes de chair afin d'identifier les pratiques et caractéristiques d'élevages associées au niveau d'usage antibiotique de 246 lots enquêtés [6]. Les usages ont été exprimés selon la quantité de poids vif traitée dans chaque lot rapportée à la taille des lots en nombre d'animaux. La comparaison visait à caractériser les tiers extrêmes de la distribution des lots (respectivement les plus « faibles » et plus « forts » « utilisateurs »). Les résultats ont montré le rôle joué dans tous les cas par l'application en élevage des mesures de biosécurité et des mesures préventives, toujours associées à un moindre niveau d'usage antibiotique. L'analyse a aussi permis d'identifier l'influence de l'attitude de l'éleveur vis-à-vis des

antibiotiques, ainsi que l'existence d'élevages systématiquement associés à des lots de faible consommation antibiotique tandis que cette observation n'était pas vérifiée pour les lots à forte consommation.

Évolution des pratiques

Outre des facteurs individuels propres aux élevages, d'autres facteurs externes sont susceptibles d'influencer les pratiques d'usage des antibiotiques. L'analyse des fluctuations de l'usage mesuré au fil du temps par l'*Observatoire avicole des consommations antibiotiques* [3] a ainsi permis d'identifier l'impact de facteurs structurels et conjoncturels sur le recours aux antibiotiques des productions avicoles. Certaines molécules présentent ainsi des fluctuations saisonnières d'usage marquées, telles que les tétracyclines en production de dindes. D'autres ont vu leur usage changer progressivement avec la mise en œuvre des traitements à un âge de plus en plus précoce [5]. Ou plus brutalement, une augmentation marquée de la fréquence de traitement des lots avec une molécule particulière a pu être observée, coïncidant avec l'arrivée sur le marché de formes génériques [7,8].

L'ensemble de ces observations suggère que l'usage des antibiotiques en aviculture est fortement lié à des déterminants non seulement sanitaires mais également socio-économiques.

ÉTUDE DE L'IMPACT DE L'USAGE DES ANTIBIOTIQUES - RELATION ENTRE EXPOSITION ET RÉSISTANCE BACTÉRIENNE

L'autre pan important de l'approche pharmaco-épidémiologique consiste à étudier les effets des antibiotiques. S'il est aujourd'hui admis que l'usage des antibiotiques a un impact sur la résistance bactérienne, l'étude de celui-ci repose surtout sur des dispositifs expérimentaux [1]. Les données des dispositifs français de surveillance de la résistance des bactéries commensales et pathogènes ont constitué, couplées aux données d'usage, un matériau de choix pour l'analyse épidémiologique en conditions réelles, du lien entre l'isolement de bactéries résistantes des animaux et l'exposition de ceux-ci en élevage. Ainsi une première analyse cas-témoin réalisée à partir des données de surveillance des souches d'*Enterococcus faecium* isolées de poulets de chair à l'abattoir a permis de quantifier l'association entre résistance à l'avilamycine et exposition des animaux à cet antibiotique facteur de croissance (OR = 2,3 IC95 % [1,2 – 4,3]) [9]. Des analyses similaires ont pu être conduites sur la relation entre l'usage thérapeutique des antibiotiques et l'isolement d'*Escherichia coli* résistants de caeca de poulets à l'abattoir. La multiplicité des expositions thérapeutiques et des résistances ont nécessité le recours à des méthodes d'analyses originales pour permettre leur prise en compte [1,10]. Les résultats obtenus mettent en exergue le rôle de tous les traitements antibiotiques sur l'augmentation de la probabilité d'isoler une bactérie résistante, vis-à-vis de l'antibiotique utilisé comme d'autres familles antibiotiques. En effet par le biais des co-résistances, ce sont tous les usages qui contribuent à la sélection de résistances, homologues comme hétérologues.

Ces études conduites à l'échelle des lots permettent de relier usage et résistance sans toutefois considérer les possibles résistances acquises *via* l'environnement et particulièrement l'effet « différé » des pratiques d'usage. Outre la sélection immédiate de résistances chez les animaux exposés, les usages concourent à enrichir l'environnement en bactéries résistantes susceptibles de persister dans les bâtiments d'élevage et de contaminer les lots ultérieurs. Afin de mesurer l'impact global et à long terme des usages sur

la résistance mesurée, les séries temporelles constituées par les données des dispositifs de surveillance de l'usage (observatoire avicole) et de la résistance des bactéries pathogènes (Résapath) sont aussi conjointement analysées.

CONCLUSION

Ces travaux ont pu être réalisés grâce à la collaboration des professionnels et des autres unités et laboratoires de l'Afssa. Les travaux de pharmaco-épidémiologie nécessitent en effet un recueil de données auprès des utilisateurs, ainsi qu'une collaboration étroite avec d'autres disciplines. Ils ont à ce titre bénéficié de la complémentarité des actions du dispositif français de surveillance des usages et de la résistance bactérienne. Les études se poursuivent aujourd'hui dans d'autres filières (des études et enquêtes sont aussi conduites en productions porcine et cunicole au laboratoire de Ploufragan ainsi que bovine et caprine au laboratoire de Lyon). Les travaux de recherche investissent aussi désormais les domaines de la modélisation et de la conduite d'étude d'intervention, afin de contribuer à la définition d'un usage prudent et raisonné des antibiotiques.



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Chauvin C. (2009) Usage des antibiotiques et résistance bactérienne en élevages de volailles. Thèse de l'Université de Rennes 1. 310pp.
- [2] Chauvin C., Le Bouquin-Leneveu S., Hardy A., Haguët D., Orand J.P., Sanders P. (2005) An original system for the continuous monitoring of antimicrobial use in poultry production in France. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 28: 515-523.
- [3] Moulin G., Cavalie P., Pellanne I., Chevance A., Laval A., Millemann Y., Colin P., Chauvin C., on behalf of the 'Antimicrobial Resistance' *ad hoc* Group of the French Food Safety Agency (2008) A comparison of antimicrobial usage in human and veterinary medicine in France from 1999 to 2005. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62: 617-625.
- [4] Chauvin C., Madec F., Guillemot D., Sanders P. (2001) The crucial question of standardisation when measuring drug consumption. *Veterinary Research*, 32: 533-543.
- [5] Chauvin C., Querrec M., Perot A., Guillemot D., Sanders P. (2008) Impact of antimicrobial drug usage measurement on the identification of heavy users, patterns of usage of the different antimicrobial classes, and time-trends evolution. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31: 301-311.
- [6] Chauvin C., Bouvarel I., Beloeil P.A., Orand J.P., Guillemot D., Sanders P. (2005) A pharmaco-epidemiological analysis of factors associated with antimicrobial consumption level in turkey broiler flocks. *Veterinary Research*, 36: 13-25.
- [7] Chauvin C. (2009) Impact of generic introduction on antimicrobial usages - A time-series analysis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32(Suppl. 1): 111-112.
- [8] Chevance A., Moulin G. (2009) Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2007. Fougères, 38pp.
- [9] Chauvin C., Gicquel-Bruneau M., Perrin-Guyomard A., Humbert F., Salvat G., Guillemot D., Sanders P. (2005) Use of avilamycin for growth-promotion and avilamycin-resistance among *Enterococcus faecium* from broilers in a matched case-control study in France. *Preventive Veterinary Medicine*, 70: 155-163.
- [10] Chauvin C., Clément C., Bruneau M., Pommeret D. (2007) Time-patterns of antibiotic exposure in poultry production - a Markov chains exploratory study of nature and consequences. *Preventive Veterinary Medicine*, 80: 230-240.

Bilan de la caractérisation moléculaire des souches de *Listeria monocytogenes* isolées de merguez et de charcuterie dans le cadre des plans de contrôle mis en place par la Direction générale de l'Alimentation en 2008 et en 2009

Sophie Roussel (1), Laurence Giuliani (2), Trinh Tam Dao (1), Marie-Léone Vignaud (1), Joël Grout (1), Benjamin Félix (1), Anne Brisabois (1)

(1) Afssa, Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires, Maisons-Alfort

(2) Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche, Direction générale de l'Alimentation, Bureau des zoonoses et de la microbiologie alimentaires

Étant donné la recrudescence des cas de listériose humaine observés en France et dans différents États membres de l'Union européenne, la Direction générale de l'Alimentation a mis en place en 2008 et 2009, trois plans de contrôle orientés sur certaines denrées alimentaires potentiellement sensibles en matière de risque lié à *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*). Ces plans ont pour objectif général d'obtenir des données sur la contamination de certaines catégories d'aliments pour apporter des éléments sur l'exposition au danger pour les consommateurs.

Un plan mis en place en 2008, décrit dans la note de service DGAL/SDSSA/N2007-8303, avait pour objectif d'estimer la prévalence et le niveau des contaminations par cette bactérie, dans les merguez crues préemballées contenant de la viande ovine. Ce plan faisait surtout suite à un plan de surveillance réalisé en 2006 de la contamination par *L. monocytogenes* des préparations de viande (DGAL/SDSSA/N2005-8284), qui avait mis en évidence une forte contamination (en termes de prévalence et de concentration) des merguez contenant entre autres de la viande ovine. Dans la plupart des cas, les merguez contiennent un mélange de viandes, bovine, ovine et porcine. Le second plan de 2008, décrit dans la note de service DGAL/SDSSA/N2007-8302, prolongé en 2009 par le plan décrit dans la note de service DGAL/SDSSA/N2008-8337, ciblait les saucisses crues à cuire, les lardons, le bacon, les saucisses et saucissons à consommer en l'état, ainsi que les pâtés (type pâtés de foie et terrines) pour le plan 2009.

Pour le plan ciblant les merguez, les échantillons ont été prélevés dans 24 départements, au stade de la fabrication et ont été

analysés en fin de durée de vie (tests de vieillissement). Tous les prélèvements ont été réalisés dans des départements français métropolitains, tirés au sort et comportant des établissements agréés pour la fabrication des produits ciblés.

Pour les plans ciblant les préparations de viandes, les échantillons ont été prélevés au stade de la distribution et analysés en fin de durée de vie (tests de vieillissement). Les prélèvements ont été réalisés dans 65 départements en 2008 et 63 en 2009.

L'objectif du présent travail était de réaliser la caractérisation génotypique des souches de *L. monocytogenes* isolées dans le cadre de ces trois plans de contrôle.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les souches de *L. monocytogenes*

Conformément aux notes de service de la Direction générale de l'Alimentation, les laboratoires réalisant les analyses de détection et de dénombrement de *Listeria monocytogenes* ont fait parvenir leurs isolats au laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires de l'Afssa à Maisons-Alfort. Un total de 152 souches (Figure 1, Tableau 1) a été collecté. Certains laboratoires ont fait parvenir plusieurs souches isolées d'un même échantillon. Toutes les souches transmises ont été caractérisées en fonction de leur sérotype moléculaire (par la technique de sérotypage moléculaire) et de leur pulsotype (par la technique d'électrophorèse en champ pulsé après macro-restriction ou PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)).

>> Les méthodes moléculaires de typage des souches

Le sérotypage moléculaire

Le sérotypage a été réalisé selon une méthode moléculaire, en utilisant une méthode de PCR multiplex [1], adaptée de celle de Doumith [2]. Le sérotypage moléculaire permet de différencier cinq sérogroupes, regroupant plusieurs sérotypes. Le sérotype IIa regroupe les sérotypes 1/2a et 3a; le sérotype IIb, les sérotypes 1/2b-3b-7, le sérotype IIc, les sérotypes 1/2c-3c, le sérotype IVa, les sérotypes 4a, 4c, le sérotype IVb, les sérotypes 4ab-4b-4d-4e.

Le typage par PFGE

Le typage par PFGE permet de caractériser précisément les isolats de *L. monocytogenes*.

La technique PFGE consiste à extraire de l'ADN total et à le digérer par deux enzymes de macro-restriction Apal et Ascl, suivant un protocole comparable aux protocoles standardisés proposés par PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols>) [3,4]. Les profils générés sont systématiquement analysés et comparés aux profils de la base de données du laboratoire puis identifiés par l'attribution, pour chaque profil, d'un numéro de pulsotype, avec le logiciel BioNumerics (Applied Maths, Belgique, version 5.1). Deux pulsotypes différents au minimum par une bande, comme préconisé par d'autres auteurs [5]. Le numéro du pulsotype avec l'enzyme Apal, suivi du numéro du pulsotype obtenu avec l'enzyme Ascl, correspond à un profil combiné.

Le logiciel permet la construction des dendrogrammes à partir du calcul de la distance entre deux profils selon l'indice de Dice. Le regroupement des profils se fait suivant la méthode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*). Les deux principaux paramètres conditionnant l'analyse sont la tolérance de position et l'optimisation, et sont fixés à 1 %, comme préconisé par PulseNet Europe [6].

Le laboratoire dispose d'une collection de profils PFGE de souches d'origines variées. Ces profils, reliés aux informations épidémiologiques et phénotypiques, sont archivés dans une base de données gérée par le logiciel BioNumerics. La base de données comprend les profils d'environ 3 700 souches d'origine alimentaire. Cette base de données contient également des profils d'une trentaine de souches humaines provenant d'une étude multicentrique internationale menée par l'Organisation Mondiale de la Santé [7] et de différents laboratoires et obtenues lors de projets de recherche ou d'études. La base contient aussi 12 profils combinés envoyés par le Centre National de Référence des *Listeria* (CNR), associés à des signalements observés entre 2006 et 2009. Un signalement se définit par la mise en évidence sur une période de 14 semaines consécutives d'au moins trois cas de listériose dus à des souches présentant des caractéristiques microbiologiques identiques (profils combinés en PFGE) ou de tout autre phénomène jugé anormal par le CNR.

Tableau 1 : Répartition des 152 souches transmises en fonction du plan de contrôle.

| Plan de contrôle | Nombre de prélèvements total par plan | Nombre de prélèvements positifs | Nombre de souches transmises et analysées par sérotypage moléculaire et par PFGE ⁽¹⁾ | Nombre de souches en doublons ⁽²⁾ |
|-----------------------|---------------------------------------|---------------------------------|---|--|
| DGAL/SDSSA/N2007-8303 | 150 | 75 | 96 | 39 |
| DGAL/SDSSA/N2007-8302 | 600 | 56 | 29 ⁽³⁾ | 0 |
| DGAL/SDSSA/N2008-8337 | 750 | 55 | 27 ⁽³⁾ | 0 |
| Total | 1 500 | 186 | 152 | 39 |

(1) PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis.

(2) Lorsque deux souches provenant d'un même échantillon présentait un sérotype identique ainsi qu'un seul et même profil combiné PFGE, ces deux souches étaient considérées comme des doublons.

(3) Le nombre d'isolats testés est inférieur au nombre de prélèvements positifs détectés dans le cadre de ce plan de surveillance, signifiant un manque de transmission des souches à l'Afssa, éventuellement lié à un manque d'information des laboratoires sur les souches transmises à l'Afssa (en particulier sur le contexte du prélèvement, avec identification précise du plan de surveillance).

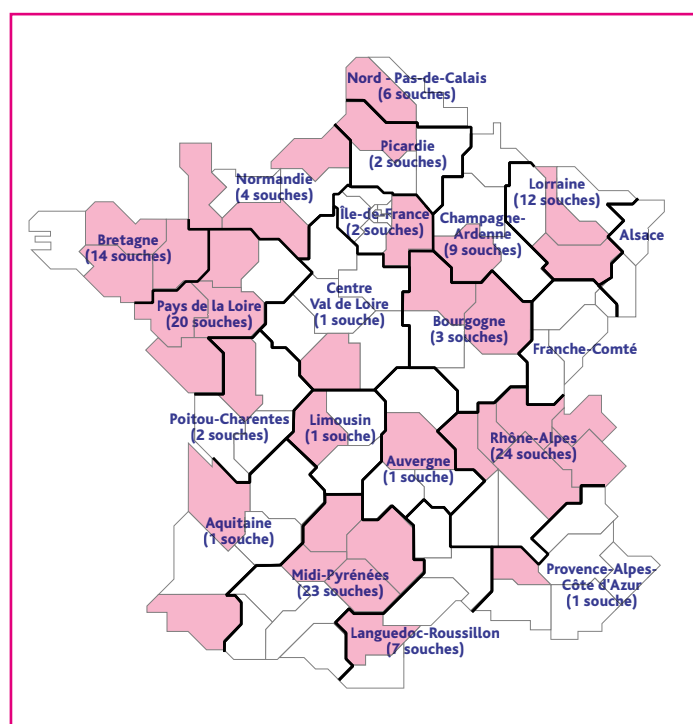


Figure 1 : Départements (indiqués en rose) qui ont transmis des souches à l'unité CEB

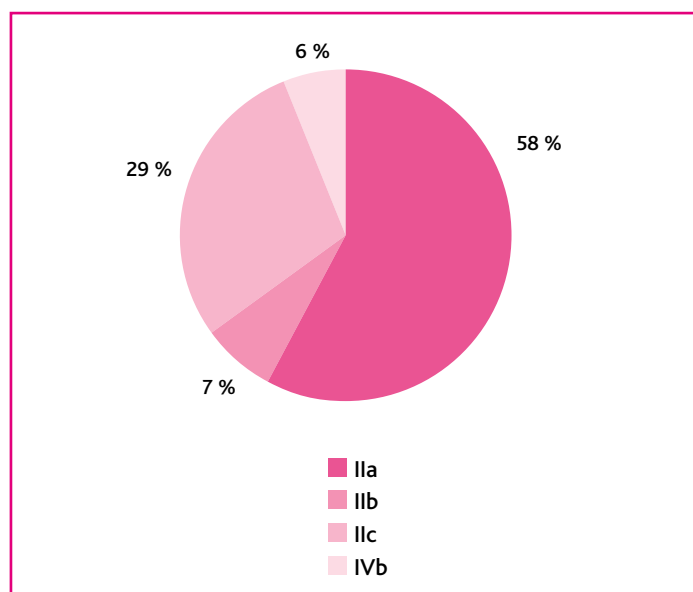


Figure 2 : Répartition des 152 souches de *L. monocytogenes* par sérotype

L'ensemble des analyses a été réalisé sous assurance qualité. Le laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires de l'Afssa à Maisons-Alfort est par ailleurs accrédité par le Cofrac selon la norme EN NF ISO/CEI 17025 sous le numéro 1-0245 (www.cofrac.fr).

RÉSULTATS

Sérotypage moléculaire

Les 152 souches se sont réparties en quatre sérotypes (Figure 2). Le sérotype majoritaire était le sérotype Ila (58 %), ce qui est conforme aux résultats observés depuis de nombreuses années. En effet, parmi toutes les souches d'origine alimentaire et environnementale caractérisées depuis 2001 au laboratoire, le sérotype 1/2a est représenté dans 65 % des souches [8].

Il est cependant à noter que le sérotype Iic est bien représenté dans ces plans de contrôle (29 %). Une forte fréquence de ce sérotype avait déjà été observée lors de l'analyse des souches isolées lors du plan de contrôle mis en place par la Direction générale de l'Alimentation en 2006 (DGAL/SDSSA/N2005-8284) [8]. La faible représentation des sérotypes IVb et Iib avait également déjà été observée lors du plan de contrôle 2006 [8].

Résultats de typage par PFGE

Un dédoublonnage a été réalisé de façon à ne considérer dans l'analyse des profils PFGE qu'un seul profil combiné de ce type par échantillon. Sur les 152 souches reçues, 39 souches en doublon ont été éliminées de l'analyse (Tableau 1). Les résultats présentés ci-dessous proviennent de l'analyse PFGE sur 113 souches.

Analyse des profils PFGE

Le Tableau 2 donne la répartition des souches par sérotype et par profil PFGE.

La combinaison des résultats obtenus avec les deux enzymes de restriction permet de différencier les souches en 72 profils combinés (Tableau 2, Figure 3). La grande majorité (57) de ces profils est associée à une seule souche, confirmant ainsi le bon pouvoir discriminant de la méthode. Les autres profils sont communs à au moins deux souches. Pour la majorité, ces profils sont associés à des souches isolées de prélèvements réalisés dans des départements différents. Seulement trois clusters géographiques correspondant à trois profils ont été observés pour des souches isolées dans le même département. Nous pouvons donc conclure que la clusterisation géographique observée est faible.

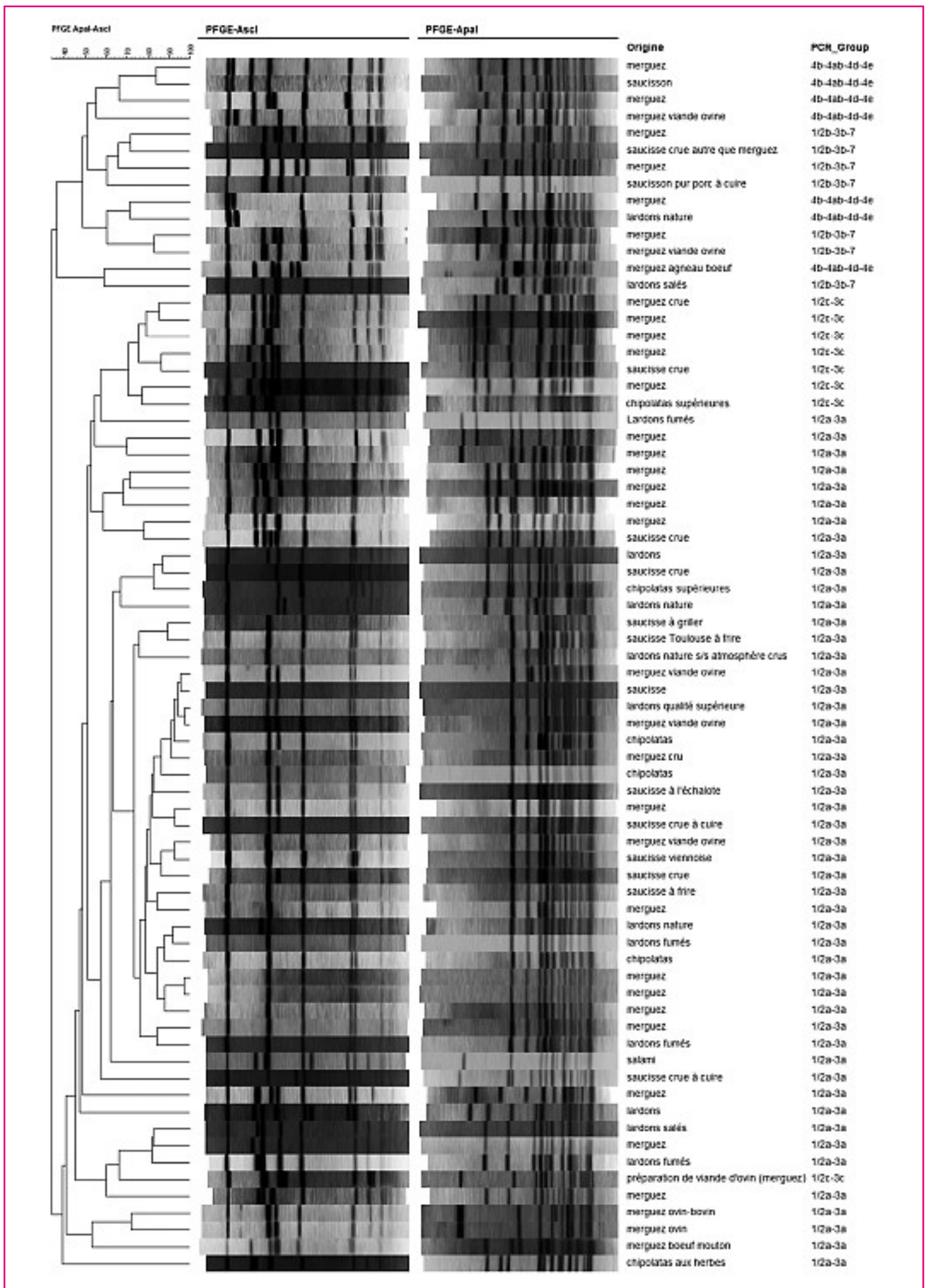


Figure 3 : Les 72 profils PFGE combinés Apal/Ascl identifiés suite à l'analyse PFGE des 113 souches reçues

Les souches des sérogroupes IIa, IIb, IIc et IVb se divisent respectivement en 49, 7, 10 et 6 profils combinés différents (Tableau 2). Tous les profils sont corrélés au séro groupe.

Tableau 2 : Nombre de souches, nombre de profils combinés différents, nombre de profils uniques au sein des quatre sérogroupes

| Sérogroupe | Nombre de souches | Nombre total de profils combinés distincts | Nombre de profils uniques (comportant une seule souche) | Nombre de profils communs à des souches isolées d'un même département |
|------------|-------------------|--|---|---|
| IIa | 66 | 49 | 42 | 1 |
| IIb | 9 | 7 | 5 | 0 |
| IIc | 29 | 10 | 7 | 2 |
| IVb | 9 | 6 | 3 | 0 |
| Total | 113 | 72 | 57 | 3 |

Comparaison des profils obtenus dans le cadre de cette étude avec les profils de la base de données de l'Afssa

Des 72 profils obtenus, plus de la moitié (55) a déjà été observée fréquemment dans la base de données du laboratoire. Seulement trois profils sont communs aux plans N83002 et N8337 et deux profils communs aux trois plans (Tableau 3). Ces profils communs

sont associés à des souches isolées de produits alimentaires variés (saucisses, merguez, farces, chipolatas, fromage, poisson...) et ne semblent donc pas être associés spécifiquement à une catégorie de produits. Seul un profil (« 146/73 ») observé pour des souches isolées dans le cadre des deux plans de contrôle de 2008, et fréquemment observé dans la base, semble être spécifique de la filière charcuterie. Alors que ce profil avait été observé pour une souche isolée de chipolatas dans le cadre du plan de contrôle en 2006 [8], il n'a cependant pas été observé pour des souches isolées lors du plan de contrôle en 2009.

Tableau 3 : Fréquence des profils obtenus en comparaison avec les profils de la base de données du laboratoire

| Sérogroupe | Nombre de profils de l'étude déjà identifiés dans la base de données | Nombre de profils communs aux trois plans de contrôle | Nombre de profils communs aux plans de contrôle -8302 et -8337 ciblant les mêmes catégories d'aliments | Nombre de profils similaires aux profils de souches humaines |
|------------|--|---|--|--|
| IIa | 35 | 1 | 2 | 5 |
| IIb | 4 | 0 | 0 | 0 |
| IIc | 8 | 1 | 1 | 1 |
| IVb | 8 | 0 | 0 | 3 |
| Total | 55 | 2 | 3 | 9 |



Neuf profils sont similaires à des profils de souches humaines disponibles dans la base de données du laboratoire. Parmi ces neuf profils, cinq sont communs à des profils de souches humaines correspondant à des signalements observés entre 2006 et 2009 par le CNR (Tableau 4).

Tableau 4 : Profils communs avec les profils de souches humaines correspondant à des signalements observés par le CNR

| Nom du profil combiné commun à un signalement observé par le CNR | Nombre de souches observées dans les trois plans | Origine | Sérogroupe des souches | Plan de contrôle concerné (nombre de souches concernées par plan) |
|--|--|--|------------------------|---|
| 144/85 | 3 | Merguez Saucisses, lardons | IIa | 8 303 (1) 8 302 (2) |
| 22/12 | 2 | Merguez | IVb | 8 303 |
| 94/136 | 2 | Lardons nature Lardons nature | IVb | 8 302 (1) 8 337 (1) |
| 6/6 | 2 | Merguez Saucisses | IVb | 8 303 (1) 8 302 (1) |
| 70/25 | 18 | Merguez Saucissons, lardons, saucisses... | IIc | 8 303 (10) 8 337 (8) |

DISCUSSION-CONCLUSION

Les 152 souches de *L. monocytogenes*, isolées à partir de préparations de viande ou de produits à base de viande dans le cadre des plans de contrôle mis en place par la Direction générale de l'Alimentation en 2008 et 2009, se sont réparties en 4 sérogroupe. Le sérogroupe IIa était majoritaire. Ceci est conforme aux résultats observés depuis de nombreuses années. La caractérisation par PFGE a permis de différencier les souches en 72 profils combinés Apal/Ascl. Ces profils sont corrélés au sérogroupe. 79 % des profils n'étaient observés que pour une seule souche, ce qui confirme le bon pouvoir discriminant de la méthode. Plus de la moitié des profils avaient déjà été observés dans la base de données initiale des profils PFGE du laboratoire et correspondent à des souches d'origine alimentaire diversifiée (références). Seul un profil s'est avéré plus particulièrement spécifique de souches isolées de merguez et de chipolatas. Il n'est pas possible d'évaluer la spécificité des profils selon les filières (ovine, bovine, ou porcine) et de calculer la prévalence de *L. monocytogenes* au sein d'une filière donnée étant donné que les aliments ciblés dans ces trois plans contiennent un mélange de viande ovine, bovine et porcine.

Une minorité des profils est similaire à des profils correspondant à des signalements observés par le CNR, ce qui peut être expliqué par la faible diversité génétique des profils des souches humaines correspondant aux signalements par rapport aux souches alimentaires. L'organisation entre les laboratoires d'analyse vétérinaire et agro-alimentaire et le laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires, Afssa, Maisons-Alfort permet d'enrichir chaque année une base de données de portée nationale, avec des informations épidémiologiques et biologiques sur les souches de *L. monocytogenes*. Cet outil sert régulièrement de référence

lors d'investigations ou d'études épidémiologiques. Il constitue un outil précieux pour la recherche des sources de contaminations et pour une meilleure connaissance de l'épidémiologie de cet agent pathogène.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les laboratoires d'analyse vétérinaire et agro-alimentaire pour avoir transmis les souches, au laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires de l'Afssa.



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Kerouanton A., Marault M., Petit L., Grout J., Dao TT., Brisabois A. (2010) Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *Journal of Microbiological Methods*, 80: 134-137.
- [2] Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P. (2004) Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8): 3819-22.
- [3] Graves LM., Swaminathan B. (2001) PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 65(1-2): 55-62.
- [4] Graves LM., Swaminathan B. (2005) PulseNet's Step-by-Step laboratory protocol for Molecular Subtyping of listeria monocytogenes by macrorestriction and Pulsed-field Electrophoresis. In: *Methods in Biotechnology*. Vol 21 : Food-Borne Pathogens : Methods and Protocols Ed: C.C. Adley, Humana Press Inc, Totowa, NJ: 57-70.
- [5] Peters TM., Maguire C., Threlfall E.J. (2003) The Salm-gene project - a European collaboration for DNA fingerprinting. *Euro Surveill*, 8:46-50.
- [6] Martin P., Jacquet C., Goulet V., Vaillant V., de Valk H. (2006) Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Listeria monocytogenes* strains : The PulseNet Europe Feasibility Study. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3: 303-308.
- [7] Bille J., Rocourt J. (1996) WHO International Multicenter *Listeria monocytogenes* Subtyping Study- rationale and set-up of the study. *International Journal of Food Microbiology*, 32(3): 251-62.
- [8] Kerouanton A., Marault M., Dao TT., Brisabois, A. (2008). Bilan de la caractérisation des souches isolées dans le cadre du plan de surveillance 2006-contamination par *Listeria monocytogenes* des préparations de viandes. *Bulletin Épidémiologique*, 23-24, 10-11.

Aménager les cages des poules pondeuses : quels effets sur leur santé, leurs performances et leur bien-être ?

En 2012, toutes les cages de poules pondeuses devront être « aménagées » tel que prévu par la directive 1999/74/CE transposée par l'arrêté ministériel du 1^{er} février 2002 établissant les normes minimales relatives à la protection des poules pondeuses. Les cages doivent notamment disposer de plus d'espace par poule (750 cm²). De plus, une litière dans une aire consacrée au grattage et picotage (AGP) doit être fournie, ainsi qu'un nid et des perchoirs.

Les modalités d'aménagement les plus à même de permettre aux poules d'exprimer leurs comportements naturels tels que le perchage, la ponte dans un nid et les picotages et grattages, sont une question primordiale.

Depuis 2007 à l'Afssa, des cages aménagées sont évaluées en termes de bien-être, de santé et de performances zootechniques des animaux. Une première bande d'environ 4500 poules a été suivie (de 1 jour à 72 semaines d'âge), où les animaux étaient répartis dans des cages de 20, 40 ou 60 poules (même espace par poule), avec ou sans apport de substrat (aliment) distribué automatiquement sur un tapis constituant l'AGP.

Une seconde bande est en cours de suivi, uniquement en cages de 60 poules, où les traitements diffèrent de par les types de revêtements dans les nids et les AGP, avec ou sans apport de substrat (son). Lors de ces deux expérimentations, l'impact du système d'élevage est étudié sur de nombreux paramètres: occupation de la cage, perchage, picotage, grattage, bains de poussières, tests de réactivité émotionnelle, de motivation, état corporel (empeplumement, résistance osseuse, poids vif), viabilité, taux de ponte, localisation de la ponte dans la cage, qualité des œufs, consommation d'aliment, contamination microbiologique de la coquille, propreté des cages. Ci-dessous sont décrits quelques-uns des résultats obtenus.

Les trois tailles de groupe testées en première bande sont comparables pour l'ensemble des mesures effectuées, excepté pour le perchage (favorisé avec l'augmentation de la taille de groupe) et la localisation de la ponte: le pourcentage d'œufs pondus en dehors du nid est plus important dans les petits groupes (20 poules: 8,1 % vs. 3,9 et 4,5 % en cages de 40 et 60 poules resp., $p < 0,01$). L'augmentation du nombre de poules dans la cage (avec la même densité) n'a pas posé de problème de picage et de mortalité due au cannibalisme, dans nos conditions expérimentales, le bec des poules étant par ailleurs épointé.

Selon nos premiers résultats, l'apport de substrat dans la cage n'a pas d'effet sur les performances de ponte, sur la qualité des œufs, ni sur la consommation d'aliment. Par contre, il y a une forte augmentation du nombre de poules observées en train de picoter ou gratter (avec l'aliment, à confirmer avec le son), et une légère augmentation des poules prenant des bains de poussières en AGP. Cependant, la fourniture d'un tapis en AGP, couplée à une luminosité adéquate, semblent à eux seuls attirer les poules à faire des bains de poussière.

En cages aménagées, les performances zootechniques sont comparables à celles obtenues en cages conventionnelles. Les animaux ont un bon état sanitaire, grâce au perchage, avec une meilleure résistance des tibias que les poules en cages conventionnelles. La présence d'un nid et d'une aire de grattage améliore le bien-être des poules pondeuses en cages en leur permettant de satisfaire leurs besoins comportementaux. Les résultats de la deuxième bande nous donneront davantage d'éléments sur d'autres revêtements testés, et l'apport d'autres types de litières en aire de grattage et de picotage.

Maryse Guinebretière

Afssa, Laboratoire d'études et de recherches avicoles, porcines et piscicoles, Ploufragan - Brest



Cage aménagée de 60 poules pondeuses, à gauche l'aire de grattage et de picotage ; à droite le nid. Des perchoirs courent sur toute la surface entre ces deux aires.



Poules picotant en AGP



Poule perchée en cage aménagée

Transmissibilité expérimentale des encéphalopathies spongiformes transmissibles aux poissons

Une étude de transmission expérimentale à la daurade royale (*Sparus aurata*) des maladies à prion (encéphalopathies spongiformes transmissibles ou EST) a été réalisée par l'équipe de T. Sklaviadis en Grèce [1]. Le challenge expérimental a été réalisé par voie orale avec un total de 50 mg par poisson de cerveau de bovin atteint d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) ou de mouton atteint de tremblante.

Le résultat essentiel de l'étude est la mise en évidence d'accumulation, au niveau du cerveau, de dépôts en plaques marqués par des anticorps dirigés contre la protéine prion de cette espèce. Ces dépôts sont de nature amyloïde comme en témoigne la biréfringence au colorant rouge congo. Aucun dépôt n'a été identifié dans l'intestin ou la rate, organes classiquement impliqués dans les maladies à prion chez les mammifères. Ces dépôts ont été identifiés chez les poissons 24 mois après le challenge expérimental avec la tremblante (2 animaux sur 5), et de façon plus précoce avec l'ESB (à partir de 8 mois). Une progression chronologique de la distribution, de la taille, des caractéristiques morphologiques ainsi que de la résistance à la protéinase K, une caractéristique biochimique majeure de la protéine prion pathologique chez les mammifères, a été observée. À 24 mois, 4 animaux présentent 500 à 800 dépôts pour 3 animaux et 150 pour un 4^e animal, majoritairement résistants à la protéinase K.

Aucune lésion de ce type n'a été observée chez les animaux contrôles ayant été exposés à des échantillons cérébraux issus de bovin non atteint d'ESB. Malgré la présence de signes histologiques de neuro-dégénérescence, distincts de ceux typiquement observés chez les mammifères, la présence de ces lésions n'a pas été associée à des signes cliniques locomoteurs.

Il est important de souligner qu'à ce stade des travaux, l'étude ne met pas en évidence une infectiosité associée à ces lésions. Une telle démonstration nécessiterait l'inoculation d'extrait du cerveau lésé des poissons à d'autres poissons. Des travaux sont également en cours pour évaluer l'infectiosité potentielle des cerveaux par inoculation à des souris transgéniques exprimant la protéine prion bovine. En tout état de cause, cette expérimentation démontre l'induction d'un phénomène pathologique chez le poisson exposé oralement à l'agent d'EST de mammifères, sans à ce stade apporter d'éléments quant à la pathologie induite, si pathologie il y a, ni *a fortiori* sur son caractère infectieux et transmissible.



Daurade royale

Références bibliographiques

- [1] Salta E., Panagiotidis C., Teliousis K., Petrakis S., Eleftheriadis E., Arapoglou F., Grigoriadis N., Nicolaou A., Kaldrymidou E., Krey G., Sklaviadis T. (2009) Evaluation of the Possible Transmission of BSE and Scrapie to Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). PLoS ONE. 4(7): e6175. doi:10.1371/journal.pone.0006175

Thierry Baron

Afssa, Laboratoire d'études et de recherche en pathologie bovine et hygiène des viandes, Lyon



Les Hantavirus : virus à découvrir ou à redécouvrir

Les *Hantavirus* font partie de la famille des Bunyviridae, ils sont associés aux rongeurs et peuvent être à l'origine de contaminations humaines. Chaque virus est associé préférentiellement à une espèce de rongeur dans laquelle il se maintient. L'infection chez les rongeurs est asymptomatique et persistante, avec une excrétion chronique de virus dans les urines et les fèces.

La distribution géographique des virus et leur remarquable adaptation aux rongeurs suggèrent une co-évolution extrêmement ancienne (1, 2). Les *Hantavirus* peuvent être séparés en deux groupes: ceux de l'Ancien Monde qui entraînent des fièvres hémorragiques à syndrome rénal (FHSR) en Europe et en Asie, et ceux du Nouveau Monde qui sont responsables de syndromes cardio-pulmonaires à *Hantavirus* (SCPH) (Tableau). À chacun de ces deux groupes a été associée une famille de rongeurs considérés comme étant le réservoir naturel: les Muridés pour les virus de l'Ancien Monde et la sous-famille des Sigmodontidés pour ceux du Nouveau Monde. Suite à des études sérologiques réalisées chez le chien et le porc, des passages inter-espèces ont été décrits mais ils sont très rares et sont probablement les conséquences d'infections par contact avec les hôtes primaires.

Les *Hantavirus* sont des virus enveloppés, de 80 à 120 nm de diamètre, caractérisés par des particules virales sphériques ou ovoïdes. Le génome viral est un ARN segmenté, monocaténaire, de polarité négative avec trois segments isolés dans trois nucléocapsides circulaires. Les trois ARN L, M et S codent respectivement pour une ARN polymérase ARN dépendante (RdRp), pour deux glycoprotéines membranaires Gn et Gc et la protéine de la nucléocapside (N).

Les infections humaines par les *Hantavirus* semblent être accidentelles et font suite à des inhalations de poussières contaminées par des excréments de rongeurs infectés.

En Europe du Nord la FHSR est causée principalement par le virus Puumala.

Le virus Puumala est responsable en France de flambées épidémiques régulières qui touchent plusieurs centaines d'individus, la majorité des cas étant regroupés dans la région Champagne-Ardenne. Il entraîne une forme atténuée de FHSR appelée néphropathie épidémique. Elle se caractérise par un syndrome grippal, accompagné de douleurs sévères, une thrombopénie et une atteinte rénale, pouvant entraîner une insuffisance rénale d'évolution le plus souvent favorable. La durée d'incubation est en moyenne de 15 jours et peut varier d'une semaine à deux mois. Les facteurs de risque connus sont l'exercice d'une profession dans le secteur forestier ou agricole, le fait d'habiter à proximité d'une forêt, ou encore de réaliser des travaux de terrassement ou de nettoyage de locaux tels que granges, hangars, etc. Le réservoir du virus Puumala est un rongeur sylvaïque, le campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*).

Depuis décembre 2009, de nombreux cas d'infections à *Hantavirus* ont été signalés dans le Land du Bade-Wurtemberg dans le sud-ouest de l'Allemagne. Fin février 2010, 85 cas avaient été identifiés, ce qui représente une forte augmentation par rapport aux années précédentes, puisque le plus grand nombre de cas annuels dans la région date de 2007 avec un total de 127 cas.

Les autorités allemandes prédisent une augmentation du nombre de cas au cours des prochains mois. Ce nombre anormalement élevé de cas est vraisemblablement dû à une augmentation de la population de campagnol roussâtre dans la région.

Compte tenu des informations disponibles, il est probable que d'autres *Hantavirus* seront découverts. Cependant le fait que les *Hantavirus* soient inféodés généralement à une seule espèce de rongeur sauvage limite le risque d'extension et donc seule l'importation de rongeurs exotiques (potentiellement porteurs) peut présenter un risque. La présence d'infections à *Hantavirus* dans le Sud de l'Allemagne, et la recrudescence du nombre de cas, amènent à être vigilants vis-à-vis de ces affections dans les régions frontalières et renforcent la nécessité de préciser les déterminants épidémiologiques de ces infections, pour mieux en comprendre et contrôler les évolutions spatio-temporelles.

Références bibliographiques

- [1] Heyman P., Vaheri A., Lundkvist A., Avsic-Zupanc T. (2009) *Hantavirus* infections in Europe: From virus carriers to a major public-health problem. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7(2): 205-217.
- [2] Bi Z., Formenty P., Roth C. (2008) *Hantavirus* infection: a review and global update. *Journal of Infection in Developing Countries*, 2(1): 3-23.

Franck Boué, Gérald Umhang

Afssa, Laboratoire d'études et de recherches sur la rage et la pathologie des animaux sauvages, Nancy

Tableau: Caractéristiques des Hantavirus

| | Virus | Maladie | Animal hôte | Distribution géographique |
|---------------|--------------------------|---|--|------------------------------|
| Ancien Monde | <i>Puumala</i> | Fièvre hémorragique à syndrome rénal (FHSR) | <i>Myodes Glaerolus</i> | Europe |
| | <i>Hantaan</i> | | <i>Apodemus agrarius</i> | Chine, Corée, Russie |
| | <i>Dobrava</i> | | <i>Apodemus flavicolis</i> | Balkans |
| | <i>Saaremaa</i> | | <i>Apodemus agrarius</i> | Europe |
| | <i>Seoul</i> | | <i>Rattus sp</i> | Monde entier |
| Nouveau Monde | <i>Sin nombre</i> | Syndromes cardio-pulmonaires à <i>Hantavirus</i> (SCPH) | <i>avirus (SCPH)</i> | États-Unis, Canada |
| | <i>New York</i> | | <i>Peromyscus leucopus</i> | États-Unis |
| | <i>Monongahela</i> | | <i>Peromyscus leucopus</i> | États-Unis |
| | <i>Bayou</i> | | <i>Oryzomys palustris</i> | États-Unis |
| | <i>Black Creek canal</i> | | <i>Sigmodon hispidus</i> | États-Unis |
| | <i>Laguna negra</i> | | <i>Calomys laucha</i> | Paraguay, Bolivie, Argentine |
| | <i>Andes</i> | | <i>Oligoryzomys longicaudatus</i> | Argentine, Chili, |
| | <i>Oran</i> | | <i>Oligoryzomys longicaudatus</i> | Argentine |
| | <i>Choclo</i> | | <i>Oligoryzomys fulvescens</i> | Panama |
| | <i>Lechiguanas</i> | | <i>Oligoryzomys flavescens</i> | Argentine |
| | <i>Araraquara</i> | | <i>Bolomys lasiurus</i> | Brésil |
| | <i>Juquitiba</i> | | <i>Oligoryzomys nigripes</i> | Brésil |
| | <i>Rio mamoré</i> | | Pas de pathogénicité connue chez l'Homme | <i>Oligoryzomys microtis</i> |

Détection d'une contamination par *Salmonella* de sérotype *Typhimurium* multirésistante dans les filières bovine et équine en Normandie



L'Afssa a émis une alerte en février 2010 suite à l'identification de souches de *S. Typhimurium* multirésistantes aux antibiotiques, porteuses d'une BLSE (bêta-lactamase à spectre étendu) et d'une céphalosporinase. Ces souches ont été impliquées dans le décès d'au moins deux chevaux et isolées de lait cru et de fromage issus de la filière bovine dans l'Orne. La circulation de souches de *S. Typhimurium* présentant un niveau de résistance aussi élevé n'avait jamais été détectée en santé animale en France auparavant. Cet événement inhabituel d'un point de vue épidémiologique mérite d'être signalé, investigué et contrôlé dans une perspective aussi bien de Santé publique humaine que vétérinaire.

Chaque année, le Réseau *Salmonella* collecte environ 7000 souches de *Salmonella* d'origine non humaine à partir desquelles le phénotype d'antibiorésistance est étudié en vue de détecter des résistances présentant un intérêt sanitaire.

Ce système d'épidémiosurveillance a permis d'identifier trois souches de *S. Typhimurium* résistantes à la majorité des antibiotiques habituellement testés sur les Gram négatifs. Ces souches sont résistantes aux pénicillines, à toutes les générations de céphalosporines ainsi qu'aux inhibiteurs de bêta-lactamases, aux sulfamides, au triméthoprime, au chloramphénicol, à la streptomycine, la kanamycine, la gentamicine et à la tétracycline. La seule famille d'antibiotiques dont l'activité *in vitro* ne semble pas altérée est la famille des quinolones. Une première étude de caractérisation moléculaire montre la présence concomitante d'une BLSE de type CTX-M du groupe 1 et d'une céphalosporinase de type CMY-2. Par ailleurs, ces trois souches présentent le même profil d'électrophorèse en champs pulsé.

Ces trois souches ont été isolées dans l'Orne et le Calvados par le Laboratoire départemental Frank Duncombe dans le cadre de deux autopsies et un avortement de chevaux, et reçues à l'Afssa entre le 21 janvier 2010 et le 15 février 2010.

Le 16 février 2010, le Réseau *Salmonella* a reçu deux souches de *S. Typhimurium* présentant ce même phénotype de résistance exceptionnel, isolées de lait cru et de fromage au lait cru de vache. La fromagerie ainsi que le troupeau à l'origine du lait contaminé se trouvent également dans l'Orne.

Les investigations se poursuivent avec les différents partenaires impliqués dans la surveillance des *Salmonella* en France (Afssa, InVS, DDCSPP, réseau *Salmonella*, CNR des salmonelles) pour évaluer le lien entre les deux filières animales impliquées. Les vétérinaires de la zone concernée ont été informés par la Direction départementale de la cohésion sociale et de la protection des populations de l'Orne et incités à demander des antibiogrammes en cas de suspicion de salmonellose.

Sophie Granier (1), Karine Maillard (2), Jackie Tapprest (3)

(1) Afssa, Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires, Maisons-Alfort

(2) Laboratoire départemental Frank Duncombe, Caen

(3) Afssa, Laboratoire d'études et de recherches en pathologie équine, Dozulé

VIENT DE PARAÎTRE

Avis sur la fièvre Q

- Dans le cadre de l'épidémie humaine de fièvre Q qui se déroule aux Pays-Bas, la Commission européenne a demandé à l'Autorité européenne de sécurité des aliments (Efsa) un avis sur:
- i/ l'évaluation de la situation sanitaire au regard de la fièvre Q dans l'Union européenne (chez les animaux et les humains);
 - ii/ l'évaluation des facteurs de risque d'apparition et de persistance de la maladie en élevage, et les facteurs de risque d'apparition de cas humains;
 - iii/ l'évaluation de l'efficacité des mesures de contrôle telles que la vaccination, l'antibiothérapie, les restrictions de mouvements d'animaux, l'abattage.

Dans le même temps, l'Efsa a fait paraître un rapport scientifique visant à proposer une harmonisation des modalités de surveillance de la fièvre Q en élevage au sein de l'Union européenne. Les documents sont disponibles sur le lien suivant: <http://www.efsa.europa.eu/fr/press/news/ahaw100511.htm>

Par ailleurs, l'ECDC a rendu un avis dans le même temps sur l'évaluation des risques liés à la fièvre Q au regard de la santé humaine: <http://www.ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx>

Sont abordés plus précisément dans cet avis: les risques liés à la transfusion sanguine, l'impact des formes chroniques, le risque particulier encouru par les femmes enceintes, les modalités de surveillance qui pourraient être recommandées.



Campylobacter spp.

Rapport sur l'évaluation des risques liés à *Campylobacter* spp. dans les poulets de chair. OMS – 2009. http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/MRA11_Fr.pdf

Résistance aux antimicrobiens

Rapport de l'Efsa sur la résistance aux antimicrobiens dans les bactéries zoonotiques pour la période 2004-2007. *The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004-2007.*

<http://www.efsa.europa.eu/fr/press/news/zoonoses100427.htm>

<http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/scdoc/1309.htm>

Annonce

I3S 2010

Symposium international sur les salmonelles et salmonelloses, les 28, 29 et 30 juin 2010 à St-Malo organisé conjointement par l'Afssa, l'Inra, l'Institut Pasteur et l'ISPAIA (Institut supérieur des productions animales et des industries agro-alimentaires).

Contact et renseignements à: ISPAIA – BP 7 – 22440 Ploufragan
Tél.: 02 96 78 61 30 – Fax: 02 96 78 61 31 – Courriel: i3s2010@zoopole.asso.fr
Lien: www.zoopole.com/ispaia/i3s2010

**Ce Bulletin Épidémiologique
est accessible sur
www.afssa.fr
www.agriculture.gouv.fr**

Directeur de publication: Marc Mortureux
Directrice associée: Pascale Briand
Comité de rédaction: Didier Boisseleau, Anne Brisabois, Françoise Gauchard, Pascal Hendrikx, Paul Martin, François Moutou, Élisabeth Repérant, Julien Santolini
Rédacteur en chef: Didier Calavas
Rédactrice en chef adjointe: Anne Bronner

Secrétaire de rédaction: Sabine Delannoy
Chargée d'édition: Carole Thomann
Assistante d'édition: Céline Leterg
Afssa - www.afssa.fr
27-31 avenue du Général Leclerc - 94701 Maisons-Alfort Cedex
Courriel: bulletin@afssa.fr

Conception et réalisation: Parimage
Photographies: Maryse Guinebretière, Christophe Lepetit
Impression: Bialec
95 boulevard d'Austrasie - 54000 Nancy
Tirage: 5000 exemplaires
Dépôt légal à parution / ISSN 1630-8018
Imprimé sur papier PEFC / 10-31-1745