

**ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE (ENVT)**

**INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE POUR L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION  
ET L'ENVIRONNEMENT (INRAE)**

**UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER (UPS)**

**CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE  
POUR LE DEVELOPPEMENT (CIRAD)**



**MASTER « Gestion Intégrée des Zoonoses et des Maladies Animales Tropicales »**

**Rapport de stage**

**EVALUATION DE STRATEGIE DE DETECTION ENVIRONNEMENTALE DES VIRUS  
INFLUENZA AVIAIRES DANS LES ELEVAGES**

**Au sein de l'UMR Interactions Hôte-Agents Pathogènes (IHAP), ENVT-INREA de Toulouse**

**Par**

**Fanambinantsoa Malaza RAJEMISON**

**Sous la direction de Jean-Luc Guerin**

**Sous la tutelle de Sébastien Soubies**

**Stage du 13/01/2025 au 11/07/2025**

**Présenté le 24 Juin 2025**

## RESUME

L'influenza aviaire représente un risque considérable pour la santé animale et la sécurité sanitaire à l'échelle mondiale, avec des répercussions économiques et sociales notables, en particulier dans le secteur avicole. Devant la multiplication des souches hautement pathogènes et la difficulté de leur suivi, ce travail s'est concentré sur l'analyse d'une approche innovante de détection environnementale du virus dans les élevages de canards. L'étude a débuté par une exploration de la littérature scientifique concernant la biologie, l'évolution et la pathogénicité du virus, mettant en avant l'intérêt d'outils de diagnostic non invasifs. Les expérimentations menées en laboratoire ont porté sur l'amélioration des techniques d'extraction de matériel génétique viral à partir d'échantillons environnementaux obtenus via des chiffonnettes. Cette méthode présente de nombreux atouts : elle limite le stress des volailles en réduisant leur manipulation et est simple et peu onéreuse à mettre en œuvre, ce qui faciliterait une surveillance étendue. La méthode a été testée sur diverses souches de virus influenza aviaire, qu'elles soient faiblement ou hautement pathogènes. Les premiers résultats indiquent que l'utilisation de chiffonnettes permet de détecter efficacement la présence du virus dans l'environnement d'élevage, bien que la sensibilité varie selon la souche et le type d'échantillon. Néanmoins, il reste nécessaire de poursuivre les tests sur le terrain, en cours, afin de confirmer l'efficacité de cette technique en conditions réelles. Ce travail contribue ainsi à l'intégration de la surveillance environnementale dans les stratégies de lutte contre l'influenza aviaire, en offrant des perspectives de gestion plus responsables et performantes des épizooties.

Mots clés : Influenza aviaire, Zoonose, Surveillance environnementale

## **ABSTRACT**

Avian influenza remains a major threat to animal health and global biosecurity, with significant economic and social impacts, particularly in the poultry sector. In response to the emergence of highly pathogenic strains and the challenges of effective surveillance, this study focused on evaluating an innovative environmental detection strategy for the virus in duck farms. The project commenced with a comprehensive literature review of the biology, evolution, and pathogenicity of avian influenza viruses, highlighting the necessity for non-invasive diagnostic tools. Laboratory experiments were conducted to optimize the extraction of viral genetic material from environmental samples collected using wipes. This approach offers several advantages: reduces poultry stress by limiting animal handling, and its low cost and ease of implementation facilitates large-scale surveillance. The sensitivity of the method was tested on various avian influenza virus strains, both of low and high pathogenicity. Preliminary results indicated that wipes can effectively detect the presence of the virus in the farm environment, with sensitivity varying according to the viral strain and sample matrix. However, the field phase is still ongoing to validate the method's effectiveness under real farming conditions. This work paves the way for integrating environmental surveillance strategies into avian influenza control systems, contributing to more ethical and efficient management of outbreaks. The findings highlight the potential of environmental sampling as a complementary tool to conventional methods, supporting early detection and improved animal welfare in the context of avian influenza monitoring.

Keywords : Avian influenza, Zoonosis, Environmental tracking

## REMERCIEMENT

A M. *JEAN-LUC GUERIN*,

Je vous remercie sincèrement pour votre encadrement, vos conseils et votre disponibilité, qui m'ont permis d'acquérir de nouvelles compétences et de réussir ce stage.

A M. *SEBASTIEN SOUBIES*,

Merci pour votre accompagnement quotidien, votre écoute et votre soutien méthodologique. Votre rigueur et vos retours constructifs m'ont permis de progresser efficacement dans mes recherches.

A l'équipe *VIRAL* de l'*UMR IHAP*,

Je remercie chaleureusement l'ensemble de l'équipe *VIRAL* pour son accueil, sa bienveillance et la qualité des échanges. Votre esprit collaboratif et votre dynamisme ont grandement contribué à la richesse de cette expérience.

À l'équipe *CPJ*,

Je tiens à remercier chaleureusement toute l'équipe *CPJ* au sein de laquelle j'ai eu le privilège d'évoluer durant mon stage. Votre accueil, votre esprit d'équipe et votre disponibilité ont grandement facilité mon intégration et ont rendu cette expérience à la fois enrichissante et agréable. Merci pour votre soutien, vos échanges constructifs et votre confiance tout au long de cette période.

A M. *TIMOTHEE VERGNE* et l'équipe pédagogique du Master *GIZMAT*,

Je vous suis reconnaissant pour la qualité de la formation dispensée et pour votre engagement à offrir un environnement propice à l'apprentissage et à l'épanouissement professionnel.

A M *RAJEMISON Fetimanalina Rivoarilala*, Mme *RAMANANTOANINA Dominique Marie-Francoise* et *RAJEMISON Ambinintsoa Koloina*

Je dédie une pensée particulière à mon père, dont la mémoire continue de m'inspirer. Je remercie également ma mère et ma sœur pour leur soutien indéfectible, leur patience et leur encouragement tout au long de ce parcours.

## SOMMAIRE

RESUME .....	ii
REMERCIEMENT .....	iv
SOMMAIRE.....	v
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	vii
LISTE DES FIGURES .....	viii
LISTES DES TABLEAUX.....	ix
I. INTRODUCTION .....	1
II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
II.1. Le Virus Influenza Aviaire : aspects historiques, biologiques et épidémiologiques..	3
II.1.1. Éléments historiques sur l’Influenza Aviaire .....	3
II.1.2. Structure, classification et nomenclature du Virus Influenza Aviaire .....	4
II.1.3. Pathogénicité et évolution des souches du VIA.....	5
II.1.4. Modalités de transmission et facteurs influençant la propagation du VIA .....	7
II.2. Diversité des hôtes du Virus Influenza Aviaire .....	7
II.2.1. Les oiseaux : réservoirs naturels et vecteurs du Virus Influenza Aviaire.....	7
II.2.2. Transmission du Virus Influenza Aviaire aux mammifères et à l’Homme .....	8
II.3. Rôle de l’environnement dans la dynamique du Virus Influenza Aviaire.....	8
II.3.1. Mécanismes de propagation du virus dans l’environnement.....	8
II.3.2. Facteurs de persistance du virus dans le milieu extérieur.....	8
II.3.3. Méthodes de détection environnementale du Virus Influenza Aviaire .....	9
II.4. Contrôle et surveillance de l’IAHP en France .....	9
II.4.1. Surveillance des maladies animales « cas de l’influenza aviaire ».....	10
II.4.2. Approches intégrées pour le contrôle de l’influenza aviaire Les méthodes de contrôle de l’influenza aviaire .....	12
II.4.3. Considérations économiques de la surveillance et du contrôle de l’influenza aviaire	13
III. MATERIEL ET METHODE.....	14

III.1.	Description du matériel biologique et du site d'étude .....	14
III.1.1.	Caractéristiques des virus étudiés .....	14
III.1.2.	Centre de recherche et zones géographiques concernées .....	14
III.2.	Méthodologie de l'étude .....	14
III.2.1.	Zone géographique de l'étude.....	14
III.2.2.	Population d'étude, échantillonnage et collecte des données .....	14
IV.	RESULTATS .....	20
IV.1.	Optimisation de la méthode de détection à partir des chiffonnettes : .....	20
IV.1.1.	Faisabilité de la détection de VIA à partir de chiffonnette : .....	20
IV.1.2.	Optimisation de la détection du génome de VIAHP à partir de chiffonnettes.....	20
IV.1.3.	Impact de l'ajout de BSA sur la détection .....	21
IV.1.4.	Influence de la vaccination sur la méthode de détection environnementale du VIA chez les canetons infectés expérimentalement.....	22
IV.2.	Analyse des chiffonnettes issues de la campagne de surveillance.....	23
IV.2.1.	Description des élevages.....	23
IV.2.2.	Chronologie de la détection en fonction de l'âges des animaux.....	24
V.	DISCUSSION .....	26
V.1.	Intérêt de l'étude .....	26
V.2.	Zone, période et population de l'étude, .....	27
V.3.	Optimisation de l'extraction .....	28
V.4.	Impact de la vaccination sur la détection.....	28
V.5.	Performances de la méthode sur le terrain.....	29
V.6.	Limitations méthodologiques.....	29
VI.	CONCLUSION.....	30
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	31
	ANNEXES.....	37

## **LISTE DES ABBREVIATIONS**

<b>AM</b>	: Arrêté ministériel
<b>ANSES</b>	: Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
<b>BSA</b>	: Bovine Serum Albumin ou Albumine Sérique Bovine
<b>DGAL/SDSBEA</b>	Direction Générale de l'Alimentation Sous-Direction de la Santé et du Bien-Être Animal
<b>Dpi</b>	Day post inoculation ou jour post inoculation
<b>ENVT</b>	: Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
<b>FAO</b>	: Food and Agriculture Organization ou l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
<b>HA</b>	: Hémagglutinine
<b>IA</b>	: Influenza Aviaire
<b>IHAP</b>	: Interaction Hôte-Agents Pathogènes
<b>INRAE</b>	Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement
<b>IVPI</b>	: Intravenous Pathogenicity Index
<b>NA</b>	: Neuraminidase
<b>OMS</b>	: Organisation Mondiale de la Santé
<b>OMSA</b>	: Organisation Mondiale de la Santé Animale
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffered Saline
<b>qRT-PCR</b>	: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction en temps réel
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
<b>UMR</b>	: Unité Mixte de Recherche
<b>VIA</b>	: Virus de l'Influenza Aviaire
<b>VIAFP</b>	: Virus de l'Influenza Aviaire Faiblement Pathogène
<b>VIAHP</b>	: Virus de l'Influenza Aviaire Hautement Pathogène

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Flux migratoires des oiseaux sauvages dans le monde (Lycett et al., 2019).....	3
Figure 2: Distance phylogénétique entre les différentes souches virale en fonction des protéines de surface (HA et NA) exprimés, l'arbre de gauche, basé sur les séquences nucléotidiques de HA, illustre la distance génétique et la relation entre les différents sous-types connus à l'époque (on n'observe pas le H19 par exemple) ; l'arbre de droite fait la même chose pour les séquences nucléotidiques de NA et montre en plus les combinaisons observées entre un sous-type de NA donné et les HA. Illustration prise dans l'article de Dugan en 2008 (Dugan et al., 2008). .....	5
Figure 3: Pathotype du virus Influenza aviaire selon la séquence moléculaire du site de clivage de l'hémagglutinine (Wahlgren, 2011).....	6
Figure 4 : Ct par type d'extraction des acides ribonucléiques collectes par les éleveurs sur les chiffonnettes. Valeur arbitraire (Ct) assigné pour les résultats négatifs = 41.....	21
Figure 5 : Effet de la préparation de l'aliquote (TRIZOL vs BSA) sur le signal qRT-PCR lors de l'extraction du matériel génomique viral.....	22
Figure 6 : Capacité de détection du VIA à partir de prélèvement environnemental selon le statut immunitaire des canetons (groupe non-vacciné = ISO1 et ISO2, groupe vaccines = ISO3 et ISO4 .....	23
Figure 7 : Dynamique de la détection de virus de l'influenza selon l'âge des animaux.....	25

## LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1: Taxonomie du virus de l'influenza aviaire. C'est un virus avec un génome de 1214 kb (King AMQ et al., 2011; World Organisation for Animal Health, 2021), <a href="https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202403956&amp;taxon_name=Alphainfluenzavirus%20influenzae">https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202403956&amp;taxon_name=Alphainfluenzavirus%20influenzae</a> .....	4
Tableau 2 : Détection du VIA selon le type de matériel d'élevage, le type d'extraction du matériel génétique et du pathotype du virus (le Ct = 41,00 indique que le résultat de l'analyse qRT-PCR a été négatif) .....	20
Tableau 3 : Résultats de la surveillance virologique selon les élevages et leur conformité à la périodicité. ....	24

## I. INTRODUCTION

Le Virus Influenza Aviaire (VIA) est responsable de la maladie « Influenza aviaire (IA) » chez les volailles de basse-cour, les oiseaux sauvages, l'homme et récemment chez d'autres mammifères (Caserta et al., 2024a; Zhang and Lei, 2024). Elle est largement disséminée dans le monde et est présente dans les zones avicoles, le trajet migratoire des oiseaux sauvages (Authority et al., 2024; Lair et al., 2024). L'émergence de nouveaux sous-types hautement pathogènes inquiète les autorités sanitaires mondiales puisque les pertes économiques engendrées sont colossales et constituent un frein au développement des filières avicoles dans le monde (Song et al., 2025). En effet, ces nouvelles souches virales peuvent compromettre la surveillance et de lutte mise en place contre les sous-types connus du virus.

La majorité des virus de l'influenza aviaire hautement pathogène détectés ont été apparentés au lignage A/Goose/Guangdong/1/1996 (H5N1). Les enjeux sanitaires et le risque d'émergence d'une pandémie s'ajoutent à ce problème puisque ce virus a été le premier à être identifié comme étant le précurseur de l'Influenza aviaire chez l'homme (Di Guardo and Roperto, 2024). En général, les cas sont déclarés dans les grandes fermes avicoles comme le cas des États-Unis où la maladie a décimé plusieurs millions de têtes de volailles dans les fermes (Youk et al., 2020). En Europe, les cas se répartissent suivant l'axe de migration postnuptiale des oiseaux sauvages venant de l'Asie centrale ou de l'Asie de l'Ouest passant par l'Europe, le Moyen-Orient et l'Afrique (Lee et al., 2015). Actuellement, le virus peut naturellement infecter plus de 48 espèces de mammifères réparties dans le monde (Hu et al., 2024). Chez l'homme, les cas sont spécifiquement zoonotiques dus à un contact étroit avec un oiseau infecté (Plaza et al., 2024). La nature génomique (virus à ARN) et la structure génomique (virus segmenté) confèrent au virus une capacité à engendrer des virus mutants et des virus réassortants (Bellido-Martín et al., 2025). L'émergence d'une souche virale qui serait capable d'initier une transmission intraspécifique chez l'Homme est la principale crainte des chercheurs, car elle pourrait avoir des répercussions notables sur la santé publique (Tripathi et al., 2021).

Dans le cadre d'une optimisation des modalités de surveillance de la maladie, l'exploitation des échantillons environnementaux pour la détection du virus a été initiée. En effet, les oiseaux infectés excrètent majoritairement le virus au niveau du tractus respiratoire et/ou digestif selon sa pathogénicité, ce qui fait que la matrice environnementale est potentiellement une source intéressante pour la détection du virus, dans les élevages de palmipèdes français (Filaire et al., 2024). Récemment, il a été démontré que la réplication du virus se déroule aussi dans les plumes en croissance des volailles (Gaide et al., 2023). Avec ces nouvelles connaissances,

développer une méthode de diagnostic non invasive du virus serait une avancée scientifique dans la détection précoce chez les oiseaux et constituerait une alternative intéressante par rapport à la méthode de collecte conventionnelle (écouvillon oro-pharyngé et cloacal) jugée relativement invasive, et d'un coût supérieur car nécessitant l'intervention d'un vétérinaire. Elle permettrait aussi de réduire la lourdeur des tâches des agents de police sanitaire durant les épizooties d'influenza aviaire. Les expériences réalisées par Filaire et al. 2024 ayant montré des résultats satisfaisants en ce qui concerne la détection du Virus Influenza Aviaire Hautement Pathogène (VIAHP), dans le cadre du stage, nous chercherons à démontrer que les prélèvements environnementaux collectés à l'aide de chiffonnettes pourront servir de complément pour la surveillance et la détection des cas d'influenza aviaire dans les fermes d'élevage de canards. Pour cela, nous entamerons en première partie des manipulations en laboratoire afin d'étudier la sensibilité analytique de la méthode sur le Virus Influenza Aviaire Faiblement Pathogène (VIAFP) et de tenter d'optimiser la méthode d'extraction pour une meilleure détection. En deuxième partie, nous procéderons à l'évaluation de la méthode optimisée sur des prélèvements réalisés en élevage. En l'occurrence, l'étude contribuera à comparer les résultats des analyses des prélèvements des oiseaux infectés par l'intermédiaire des chiffonnettes durant la phase de croissance des animaux. Aussi, il permettra de déterminer la sensibilité de l'analyse envers la souche virale (hautement ou faiblement pathogène). Le travail suggère que les virus A de l'influenza sont détectables à partir des poussières d'élevage et que l'approche serait prometteuse.

Dans le cadre de mon stage, je précise que les résultats présentés dans ce rapport concernent uniquement la première phase du projet, qui porte sur les manipulations en laboratoire. Ces travaux ont permis d'étudier la sensibilité et d'optimiser la méthode d'extraction du Virus Influenza Aviaire à partir d'échantillons environnementaux. La phase de terrain, qui comprend la collecte et l'analyse des échantillons dans les élevages de canards, est toujours en cours. Les résultats présentés sont donc partiels et ne reflètent pas encore la situation réelle sur le terrain.

## II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### II.1. Le Virus Influenza Aviaire : aspects historiques, biologiques et épidémiologiques

#### II.1.1. Éléments historiques sur l'Influenza Aviaire

L'influenza aviaire a été décrit pour la première fois en Italie en 1878 sans pour autant connaître l'agent pathogène responsable de la maladie. Un siècle s'est écoulé avant que le VIA soit identifié et décrit, avec une différence de pathogénicité entre souches virales (VIAHP et VIAFP). En effet, la souche A/Goose/Guangdong/1/1996 (H5N1) a été décrite l'origine des sous-types hautement pathogène qui circulent actuellement dans le monde. En 1997, le potentiel zoonotique du virus a été confirmé par la découverte du premier cas humain porteur de la souche A/HongKong/156/97 (H5N1) dont l'origine a été la souche aviaire A/chicken/Hong Kong/258/97 (Claas et al., 1998). Sur ce point, le fait que le virus a franchi la barrière d'espèces a alerté les autorités sanitaires sur la possibilité d'une émergence d'épidémie de grippe. En ce temps, les scientifiques ont accordé une forte plausibilité sur l'origine animale des cas de grippe de l'homme comme les animaux de basse-cour due à leur proximité à l'homme. Le virus de la grippe espagnole due au virus H1N1 en 1918 dont l'origine a été suspecté comme provenant des volailles. Pour rappel, ce virus a causé plus de 50 millions de morts selon les affirmations de l'Institut Pasteur, témoignant de l'ampleur et l'importance de la maladie. La plus récente étant celle de 2009 avec une autres souche H1N1 ayant fait 280000 morts selon les estimations (Krammer et al., 2025).

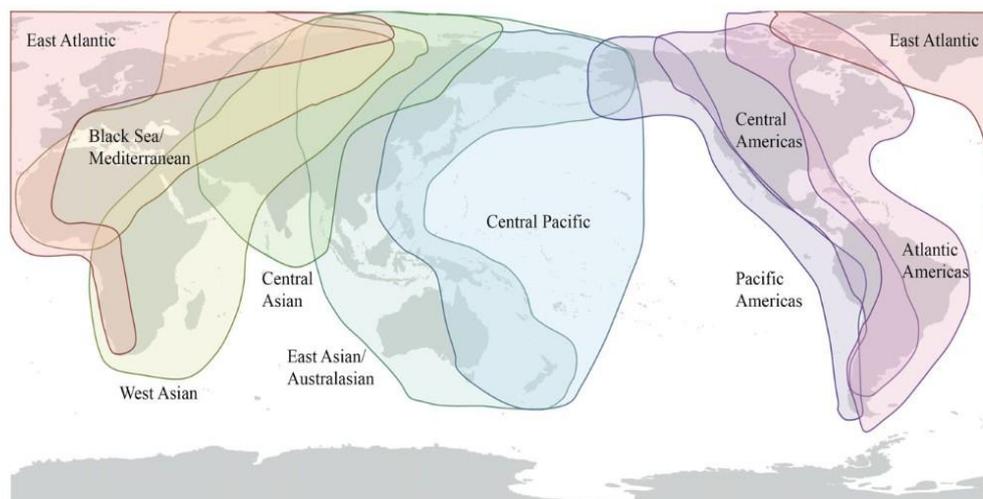


Figure 1: Flux migratoires des oiseaux sauvages dans le monde (Lycett et al., 2019).

Les années 2000 ont été marquées par la propagation du virus H5N1 dans les pays asiatiques dont le Vietnam et la Thaïlande. Le rôle vectoriel des oiseaux sauvages a été évoqué pour la

propagation à grande distance du VIA dans le monde (Figure 1). Bien qu'un doute persiste sur le rôle des oiseaux migrateurs dans la dynamique de la transmission du virus d'un pays à un autre étant donné que les oiseaux sauvages ont un pouvoir excrétoire faible de particules virales limitant principalement les foyers infectieux dans la périphérie de l'épicentre (Cazelles et al., 2015; Kilpatrick et al., 2006).

### II.1.2. Structure, classification et nomenclature du Virus Influenza Aviaire

L'Influenza A est un virus enveloppé, pléomorphe, à ARN monocaténaire, segmenté, à polarité négative se présentant sous forme sphérique d'une taille de 80 à 120 nm de diamètre (Hutchinson, 2018). Le génome viral est composé de huit segments qui codent chacun pour une ou deux protéines spécifiques essentielles dans le cycle de réplication du virus. Parmi ces protéines, les protéines M (M1 et M2) sont les mieux conservées et leur détection par Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) permettent l'identification en première intention du virus en le différenciant des autres virus tels que le virus de la maladie de Newcastle (Farkas et al., 2007). Les glycoprotéines de surfaces (Hémagglutinine ou « HA », Neuraminidase ou « NA ») permettent l'identification et la classification en sous type du virus par Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction en temps réel (qRT-PCR) (Hutchinson, 2018).

Tableau 1: Taxonomie du virus de l'influenza aviaire. C'est un virus avec un génome de 1214 kb (King AMQ et al., 2011; World Organisation for Animal Health, 2021), [https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode\\_id=202403956&taxon\\_name=Alphainfluenzavirus%20influenzae](https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202403956&taxon_name=Alphainfluenzavirus%20influenzae)

<b>TAXONOMIE</b>	
<b>Royaume</b>	: Riboviria
<b>Règne</b>	: <i>Orthornavirae</i>
<b>Embranchement</b>	: <i>Negarnaviricota</i>
<b>Sous-embranchement</b>	: <i>Polyploviricotina</i>
<b>Classe</b>	: <i>Insthoviricetes</i>
<b>Ordre</b>	: <i>Articulavirales</i>
<b>Famille</b>	: <i>Orthomyxoviridae</i>
<b>Genre</b>	: <i>Influenzavirus</i>
<b>Espèce</b>	: <i>Alphainfluenzavirus influenzae</i>
<b>Sous-type</b>	: 19HA (H1-H19) et 11 NA (N1-N11)

Une nomenclature des souches virales a été établie à partir de codage incluant : l'espèce virale, l'espèce hôte, le lieu de l'isolement, le numéro d'isolement, l'année d'isolement, le sous-type (World Health Organization, 1980). Du fait de la forte capacité évolutive et de propagation du virus, cette méthode de nomenclature pose problème auprès des chercheurs car elle ne permet pas de suivre l'évolution du virus. Afin d'y remédier, l'organisation tripartite formée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) – l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OMSA) et l'Organisation des Nations-Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) ; a établi une nouvelle nomenclature en classifiant les différentes souches virales ayant des similarités en clade (Cattoli et al., 2009). La différence entre deux souches virales et le lien de parenté avec la souche de référence (H5N1 isolé en Hong Kong en 1997) est estimé à partir de la distance génomique entre les deux souches (WHO et al., 2008).

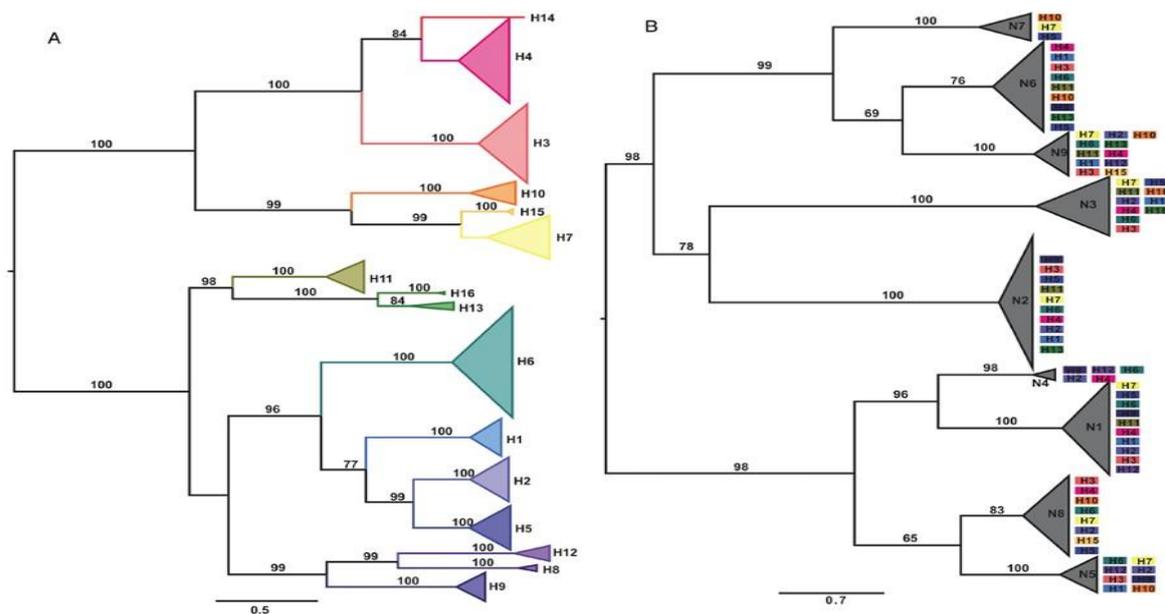


Figure 2: Distance phylogénétique entre les différentes souches virale en fonction des protéines de surface (HA et NA) exprimés, l'arbre de gauche, basé sur les séquences nucléotidiques de HA, illustre la distance génétique et la relation entre les différents sous-types connus à l'époque (on n'observe pas le H19 par exemple) ; l'arbre de droite fait la même chose pour les séquences nucléotidiques de NA et montre en plus les combinaisons observées entre un sous-type de NA donné et les HA. Illustration prise dans l'article de Dugan en 2008 (Dugan et al., 2008).

### II.1.3. Pathogénicité et évolution des souches du VIA

La virulence de l'influenza de type A varie considérablement en fonction de la souche virale et de l'hôte concerné, comme le soulignent plusieurs études (Liang, 2023).

À partir de la sévérité des signes cliniques observés chez l'animal, deux pathotypes de virus ont été établis : Influenza Aviaire Hautement Pathogène (IAHP) et Influenza Aviaire Faiblement Pathogène (IAFP). Historiquement, la classe du virus était attribuée en fonction de l'indice de pathogénicité par voie intraveineuse (IVPI) chez les poulets sur une base clinique. Ces dernières années, cette distinction se fait sur la base de la séquence d'acides aminés du site de clivage de l'hémagglutinine (WOAH, 2019) (Figure 3) : ce site est en effet dit « monobasique » pour les VIAFP et polybasique pour les VIAHP. La distribution tissulaire de la protéase responsable du clivage de l'hémagglutinine explique le fait que les cas IAFP ont une tendance à développer des symptômes localisés contre des symptômes généralisés chez les oiseaux affectés par les IAHP.

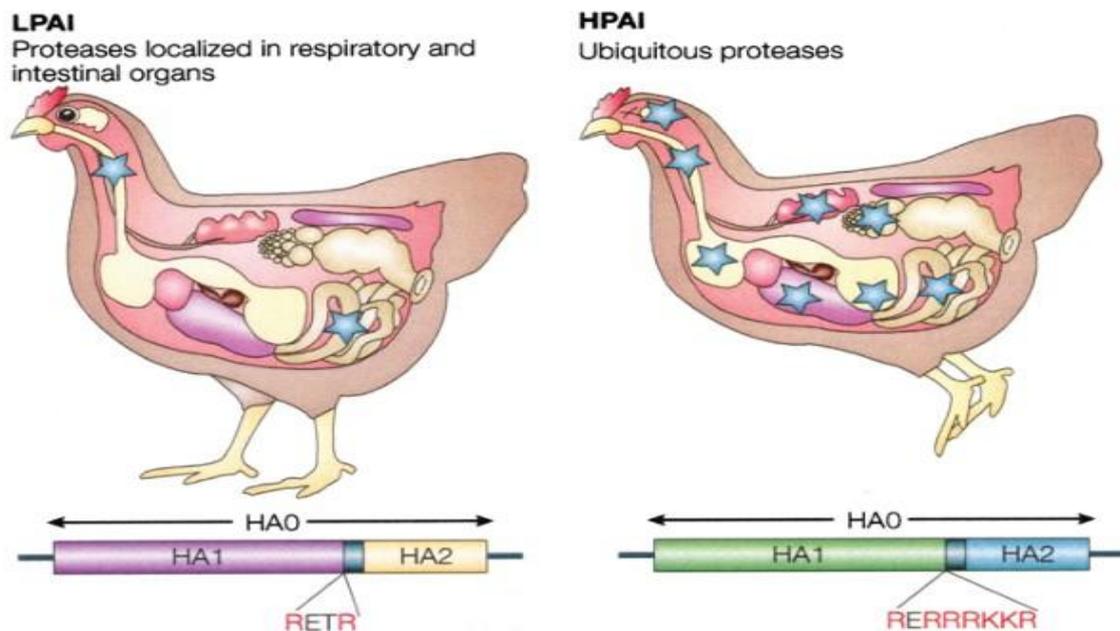


Figure 3: Pathotype du virus Influenza aviaire selon la séquence moléculaire du site de clivage de l'hémagglutinine (Wahlgren, 2011).

Initialement identifié en Chine, le lignage A/Goose/Guangdong/1/1996 (VIAHP) est l'un des précurseurs des différents clades de H5N1 (VIAHP) qui circulent dans le monde. Les pathotypes faiblement pathogènes du sous-type H5 et H7 peuvent devenir hautement pathogènes une fois transmis chez les *Gallus gallus* (Verhagen et al., 2021). En expérimentation, les virus de la grippe A faiblement pathogènes ne provoquent pas de maladie ou peu de signes cliniques chez les oiseaux y compris les gallinacées selon la classification par IVPI (Score < 1,2) (WOAH, 2019). Cependant, les observations ont montré que des signes cliniques plus ou moins sévères et une mortalité peuvent aussi être recensés lors de l'infection

par VIAFP. Les lésions affectent surtout le tractus respiratoire, digestive des races à viande et du tractus génital chez les pondeuses et l'apparition dépend des facteurs environnementaux, des conditions d'élevage, du sous-type viral (H9N2, H6N1) et du statut sanitaire des animaux (co-infection bactérienne et/ou autre) (McMenamy et al., 2024; Peacock et al., 2019). En ce qui concerne les souches virulentes hautement pathogènes, un fort taux de morbidité et de mortalité sont fréquemment rencontrée chez les *Gallus gallus* avec des affections systémiques tel que des lésions viscéraux multiples, nerveux et du tégument (Gaide et al., 2023; Pantin-Jackwood and Swayne, 2009).

#### **II.1.4. Modalités de transmission et facteurs influençant la propagation du VIA**

Le pathotype du VIA a une influence sur la modalité d'excrétion chez les oiseaux infectés. D'une part, les VIAHP qui ont un développement tissulaire accru dans le tractus respiratoire sont détectés la plupart du temps dans les excréments respiratoires. D'autre part, les VIAFP sont surtout isolés à partir des échantillons contaminés par les matières fécales comme le lisier, la litière étant donné leur forte affinité pour les tissus digestifs. Chez les ansériformes, il a été démontré que les souches IAHP (H5N8/2017 et H5N8/2020) sont détectables dans les prélèvements trachéaux dès le deuxième jour post-infection, avec un pic d'excrétion observé au quatrième jour (Filaire et al., 2024). Par ailleurs, l'excrétion cloacale des virus faiblement pathogènes est significative chez les canards sauvages et peut persister plusieurs jours (Filaire et al., 2024; Germeraad et al., 2019a). Il convient également de noter que l'espèce, l'âge des oiseaux et la souche virale influencent l'intensité et la durée de l'excrétion virale. Enfin, une étude récente a mis en évidence que la dissémination du virus via les particules de plumes pourrait contribuer à sa transmission environnementale (Gaide et al., 2023).

### **II.2. Diversité des hôtes du Virus Influenza Aviaire**

#### **II.2.1. Les oiseaux : réservoirs naturels et vecteurs du Virus Influenza Aviaire**

Les oiseaux de l'ordre des Ansériformes, Familles des Anatidés (les canards, les oies et les cygnes), des Charadriiformes (mouettes, goélands, autres oiseaux de rivages) sont les hôtes naturels et réservoirs du virus de la grippe A (Caron et al., 2017; Gass et al., 2023; Nogales et al., 2021). Les autres espèces d'oiseaux sont quant-à elles sensibles aux virus et développent des signes cliniques d'intensité très variable. Le sous-type H5 et H7 sont responsables de la forme hautement pathogène chez les oiseaux de production tels que les races à chairs et les pondeuses.

## **II.2.2. Transmission du Virus Influenza Aviaire aux mammifères et à l'Homme**

L'infection de l'homme se fait généralement à la suite d'une épidémie de grippe aviaire dans une exploitation avicole (Nogales et al., 2021). Cependant, de plus en plus de cas de transmission via d'autres espèces ont été recensés (Kim et al., 2016) dont le plus récent est le cas d'IA bovins transmis à l'homme identifié aux États-Unis (Caserta et al., 2024b; Mostafa et al., 2024). Actuellement, la mutation et le réassortiment du génome viral fait que d'autres espèces animales sont infectées par le virus de tel que le chien, les porcs (Mostafa et al., 2024). Bien que la transmission intraspécifique n'ait pas encore été démontrée chez l'Homme, le risque est potentiel élevé compte de tenu des propriétés d'adaptation rapide du virus.

## **II.3. Rôle de l'environnement dans la dynamique du Virus Influenza Aviaire**

### **II.3.1. Mécanismes de propagation du virus dans l'environnement**

Le virus de la grippe est véhiculé dans l'environnement suivant divers processus complexes. D'une part, les oiseaux migrateurs jouent un rôle clé dans la dissémination du virus à travers le monde lors de leurs déplacements saisonniers. Par ailleurs, il faut noter qu'en plus des voies d'excrétion respiratoire et digestive, le VIA a aussi la capacité de se développer dans les plumes en croissance (Gaide et al., 2023; Kurmi et al., 2013), qui peuvent le disperser dans le milieu environnant et contaminant ainsi les zones qu'ils traversent (Filaire et al., 2024; Spekreijse et al., 2013).

D'autre part, l'homme peut jouer le rôle de vecteur passif dans la propagation du virus. Les éleveurs, le personnel d'élevage, les prestataires de services d'élevage ainsi que le personnel de santé animale jouent aussi un rôle prépondérant dans la circulation du virus dans l'environnement. En effet, le virus est véhiculé dans l'ensemble de l'exploitation et des différents élevages à travers les travailleurs et les matériaux d'élevage contaminés.

Tous ces facteurs de propagation sont aussi conditionnés par les conditions climatiques, telles que la température et l'humidité, et influencent également la survie du virus dans l'environnement. En hiver, une plus longue viabilité virale est évoquée que lors des saisons chaudes dans les mêmes conditions environnementales (Chumpolbanchorn et al., 2006).

### **II.3.2. Facteurs de persistance du virus dans le milieu extérieur**

En général, le virus de la grippe aviaire est assez résistant dans le milieu extérieur. Selon les facteurs environnementaux (température, humidité, hygrométrie), le virus peut survivre une

à plusieurs semaines et lors de la migration des oiseaux sauvages, les sites de nidification constituent aussi des zones de persistance du virus (Gass et al., 2022).

Le virus demeure infectieux plus longtemps à faible température, qui induit un pic d'infection durant l'hiver en Europe et en France. Enfin, les surfaces inertes telles que les matériaux d'élevage, les bâtiments d'élevage sont des sources potentielles de persistance du virus (Wood et al., 2010).

### **II.3.3. Méthodes de détection environnementale du Virus Influenza Aviaire**

La détection précoce des cas d'IA est essentielle pour contrôler, limiter et gérer les épidémies qui sévissent en Europe et sur le territoire français. Différentes méthodes permettent la détection du virus à partir des prélèvements organiques. Traditionnellement, les méthodes de prélèvements sont relativement invasives comme les écouvillonnages des voies respiratoires et cloacales. Ces méthodes sont intéressantes du fait de la qualité de l'échantillon récolté, où le VIA peut être facilement isolé. Néanmoins, la réalisation de ces prélèvements, notamment sur plusieurs dizaines d'individus, est fastidieuse, chronophage et nécessite un personnel qualifié (Setta et al., 2023). De nouvelles approches non invasives, comme l'analyse des poussières d'élevage, se révèlent prometteuses et permettent de détecter le virus dans les particules poussiéreuses accumulées dans les installations avicoles, offrant une alternative aux méthodes conventionnelles. La mise en œuvre de techniques de détection innovantes pourrait améliorer la surveillance des foyers d'infection et faciliter une réponse rapide en cas d'épidémie (Ahrens et al., 2023; Filaire et al., 2024).

### **II.4. Contrôle et surveillance de l'IAHP en France**

L'interaction entre l'hôte, l'agent pathogène et l'environnement est un processus dynamique et complexe. Les oiseaux, en tant qu'hôtes naturels, sont souvent des porteurs sains du VIA et cela complique la détection précoce de la maladie. Le virus de l'Influenza aviaire peut interagir avec divers facteurs environnementaux, comme les conditions climatiques et la densité des populations avicoles. Par exemple, des conditions favorables, telles que l'humidité élevée, peuvent faciliter la transmission entre les oiseaux. Ces éléments cités ci-dessus confirment la complexité des défis posés par l'Influenza aviaire et soulignent l'importance d'une approche multidisciplinaire pour gérer cette menace sanitaire.

Au cours de la dernière décennie, la France a été confrontée à plusieurs vagues majeures d'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP), en particulier liées à la lignée 2.3.4.4b du virus H5. L'épizootie de 2016-2017 a marqué un tournant, avec des pertes économiques et

sanitaires considérables, notamment dans le Sud-Ouest, région à forte densité avicole. La dynamique complexe de l'IAHP résulte de l'interaction entre l'hôte (oiseaux domestiques et sauvages, souvent porteurs sains), l'agent pathogène et l'environnement, où des facteurs comme l'humidité et la densité des élevages favorisent la transmission virale. Cette complexité justifie l'adoption d'approches intégrées et multidisciplinaires pour la gestion du risque.

En 2016, le VIA de la lignée 2.3.4.4b a causé des épizooties d'une forte ampleur dans le monde et en France. La méthode de prévention de la maladie consistait en une mesure de prophylaxie sanitaire en instaurant des règles de biosécurité et en un abattage massif lors de la flambée des cas de la maladie. L'introduction de la vaccination a nécessité une refonte des dispositifs de surveillance. Depuis juillet 2024, la DGAL/SDSBEA a mis en œuvre une instruction technique (DGAL/SDSBEA/2024-415) pour l'adaptation du programme de surveillance de l'IAHP. L'optimisation de la méthode de surveillance et de prévention a été revue pour maîtriser l'épizootie conformément à requête de l'union européenne. Cette surveillance repose sur :

- ✓ Des prélèvements environnementaux et individuels réguliers dans les élevages vaccinés et non vaccinés.
- ✓ L'utilisation de méthodes de détection moléculaire sensibles (RT-PCR ciblant les segments H5/H7) pour pallier la possible diminution de l'excrétion virale chez les animaux vaccinés.
- ✓ Un suivi épidémiologique renforcé, incluant la traçabilité des mouvements d'animaux et l'analyse des facteurs de risque environnementaux.
- ✓ La transmission systématique des données à la plateforme européenne de surveillance pour garantir la transparence et l'harmonisation des actions.

Cette approche intégrée permet de tenir compte des spécificités du contexte vaccinal, d'optimiser la détection précoce des foyers et d'ajuster rapidement les mesures de gestion en fonction de l'évolution du risque

#### **II.4.1. Surveillance des maladies animales « cas de l'influenza aviaire »**

Selon l'OMSA, la surveillance épidémiologique est définie comme un ensemble d'activités qui consiste en la collecte en continu des données, le traitement, l'analyse et l'interprétation de ces données afin de pouvoir diffuser des informations aux entités concernées (Herida and Desenclos, 2015; World Organisation for Animal Health (WOAH), 2021). La surveillance épidémiologique est primordiale pour connaître la situation sanitaire d'un territoire en un temps donné et/ou défini et elle permet d'établir les liens avec l'état de santé

des animaux (Eilstein et al., 2012). Pour le cas de l'influenza aviaire, la surveillance de la maladie nécessite une approche intégrée mettant en commun les expertises des acteurs en santé humaine, animale et en écologie afin d'établir la meilleure approche pour contenir la maladie, l'éradiquer et prévenir une éventuelle réémergence de la maladie (Dupuy et al., 2024).

#### **II.4.1.1. Surveillance passive renforcée dans les élevages de canards vaccinés**

Dans le cadre de la veille sanitaire, la surveillance passive repose sur l'analyse en laboratoire reconnu des échantillons prélevés par les vétérinaires sanitaires à la suite de déclarations spontanées de cas suspects ou de mortalités (Pascale Bourhy et al., 2017).

Fin 2023, la vaccination préventive est devenue obligatoire dans les élevages commerciaux de canards de plus de 250 têtes selon l'arrêté ministériel (AM) octroyant une dérogation à l'interdiction de la vaccination contre IAHP, la DGAL/SDSBEA a publié une « instruction technique (IT) DGAL/SDSBEA/2024-546 » datant du 30 Septembre 2024 portant objet sur « le plan de vaccination officiel IAHP - Campagne de vaccination des canards - octobre 2024 ». L'IT mentionne l'établissement d'une surveillance passive renforcée comme étant une composante de la surveillance post-vaccination dans les sites d'élevages de canards vaccinés. Elle met directement à contribution l'éleveur dans le système de surveillance et repose sur le principe de détecter précocement d'introduction du VIA en analysant dans un laboratoire reconnu des prélèvements auto-prélevés par l'éleveurs ou le technicien hebdomadairement chez des canards moribonds ou morts dans les lots vaccinés.

#### **II.4.1.2. Surveillance active des foyers d'influenza aviaire après vaccination**

La surveillance active est une méthode de collecte de données épidémiologiques basée sur la mise en place d'un système de surveillance qui définit la population à surveiller, la taille de l'échantillon à recruter, le site et la fréquence de prélèvements (Barbara Dufour and Pascal Hendriks, 2011). Dans le cadre de la surveillance post vaccinale active des cas de grippe aviaire hautement pathogène en France, des prélèvements sont prélevés périodiquement dans les élevages de canards de l'étage de la production. Pour ce faire, l'« IT DGAL/SDSBEA/2024-546 » indique qu'un vétérinaire sanitaire est mandaté tous les 30 jours à partir de la vaccination des lots de canards pour effectuer des examens cliniques et faire des écouvillonnages oro-pharyngés ou trachéaux sur un lot de 60 canards vaccinés pour un analyse virologique par RT-PCR en laboratoire agréé accompagnée d'une fiche d'accompagnement de prélèvements.

## **II.4.2. Approches intégrées pour le contrôle de l'influenza aviaire Les méthodes de contrôle de l'influenza aviaire**

Le contrôle de l'influenza aviaire repose sur un ensemble de mesures coordonnées visant à prévenir l'introduction du virus, limiter sa propagation et éradiquer les foyers lorsqu'ils apparaissent.

### **II.4.2.1. Rôle et mise en œuvre de la vaccination contre l'influenza aviaire**

La vaccination est une méthode essentielle pour prévenir et contrôler les maladies d'origine virale, qui, en raison de leur nature incurable et de la vie intracellulaire des agents pathogènes, nécessitent des stratégies alternatives. En France, la campagne de vaccination contre l'influenza aviaire hautement pathogène a été conduite pour la première fois en octobre 2023 et elle a été reconduite par le Ministère de l'Agriculture et de la souveraineté alimentaire (Ministère de l'Agriculture et de la souveraineté alimentaire, 2024). Le recours à la vaccination a été rendu possible par les instances européennes sur le constat de l'OMSA que la méthode de lutte traditionnelle déployée (biosécurité, abattage en masse et restriction des mouvements) ne suffisait plus à la maîtrise de la maladie (Cattoli et al., 2011; Sajjadi et al., 2025).

### **II.4.2.2. Vaccins utilisés et stratégie vaccinale en France**

Dans le cadre de la mise en place de la campagne de vaccination en France, une expérimentation a été lancée en 2022 pour établir l'intérêt et l'efficacité de la vaccination pour prévenir et lutter contre l'Influenza Aviaire Hautement Pathogène (IAHP) dans les élevages de canards mulards en France. Une convention multipartite (Ministère de l'Agriculture et de la souveraineté alimentaire, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail « ANSES », École Nationale Vétérinaire de Toulouse « ENVT », Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras « CIFOG », les laboratoires et les régions françaises) pour statuer de l'efficacité des vaccins candidats. Les vaccins « Vol B.E.S.T. AI + ND » et « Duck H5-SRV vaccine® », produits respectivement par les laboratoires Boehringer Ingelheim et Ceva Santé animale, ont été retenus et utilisés durant l'expérimentation (Ministère de l'Agriculture et de la souveraineté alimentaire, 2024).

### **II.4.2.3. Stratégie DIVA pour la surveillance post-vaccination**

Avec la vaccination des volailles, la réglementation de l'Union européenne a rendu obligatoire la capacité de pouvoir différencier les oiseaux vaccinés et les infectés par le VIAHP. En effet, la vaccination constitue un obstacle majeur pour l'identification des animaux rétablis

de l'IA et des oiseaux vaccinés qui ont produit des anticorps. Le développement des vaccins permettant la différenciation entre les animaux infectés des animaux vaccinés ou « Differentiating Infected from Vaccinated Animals, DIVA » part du principe que le vaccin ne contient qu'une partie du matériel génétique du virus (généralement le HA) et en conséquence les oiseaux vaccinés auront un résultat négatif lors des tests de diagnostic (ELISA) qui cible les autres anticorps anti-protéine virale (anti-NP ou anti-NA). Cette alternative permet actuellement d'optimiser la surveillance sanitaire des oiseaux d'élevage (Capua et al., 2003).

#### **II.4.3. Considérations économiques de la surveillance et du contrôle de l'influenza aviaire**

Le commerce du foie gras est l'une des activités agricoles qui rapporte à la caisse de l'État français. Cependant, la recrudescence des cas d'influenza aviaire a engendré un manque à gagner suite aux différentes opérations de surveillance, d'abattage et d'indemnisation à partir de 2021. De plus, le questionnement sur l'éthique a été remis en question sur le fait d'abattre systématiquement les oiseaux d'un site d'élevage et des élevages aux alentours déclarés contaminés. Ainsi, l'introduction de la vaccination initiée en 2023 a été motivée comme alternative complémentaire afin de réduire la perte occasionnée par la maladie. Cependant, la campagne de vaccination nécessite une surveillance active afin de suivre la dynamique de la maladie qui est fortement susceptible d'être masquée par la vaccination. L'initiation de l'étude de l'intérêt des prélèvements environnementaux à des fins de détection et d'isolement du VIA tient en compte d'une part le fait que le coût de la surveillance active représente 80% du budget alloué par l'État pour la gestion intégrée de la maladie, et d'autre part le fait de garantir le bien-être des animaux d'élevage vu les manipulations répétitives qu'ils subissent durant le prélèvement.

### **III. MATERIEL ET METHODE**

#### **III.1. Description du matériel biologique et du site d'étude**

##### **III.1.1. Caractéristiques des virus étudiés**

Pour les tests en laboratoire, deux souches du virus de l'Influenza aviaire de type A ont été étudiées :

- ✓ VIA Hautement pathogène H5N1 (Influenza aviaire hautement pathogène issue des élevages de canards contaminés)
- ✓ VIA Faiblement pathogène H2N5 (Influenza aviaire faiblement pathogène issue des élevages de canards contaminés)

##### **III.1.2. Centre de recherche et zones géographiques concernées**

Le stage s'est déroulé au sein de l'« Unité Mixte de Recherche (UMR) Interaction Hôte-Agents Pathogènes (IHAP) co-dirigée par l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) et l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT). Cette unité vise à valoriser les études sur l'évolution de l'interdépendance entre les différents microorganismes et l'émergence des maladies animales.

#### **III.2. Méthodologie de l'étude**

##### **III.2.1. Zone géographique de l'étude**

La zone d'études a couvert la partie Sud-Ouest de la France. Dans cette partie, les élevages de canards se répartissent dans la région de la nouvelle aquitaine. Période, durée de l'étude et type de l'étude

Il s'agit d'une étude longitudinale, prospective, comparative. L'étude s'est étalée sur une période de 03 mois de fin février à fin mai. Elle a débuté par la constitution des revues bibliographiques au mois de janvier 2025 jusqu'à la restitution du rapport de stage fin juin de la même année.

##### **III.2.2. Population d'étude, échantillonnage et collecte des données**

###### **III.2.2.1. Population de l'étude**

La population de l'étude a englobé les élevages de canards volontaires et sélectionnés dans le Sud-Ouest du Territoire français durant la saison d'hiver comprise dans la période de l'étude.

### **III.2.2.2. Population cible et Population source.**

L'étude a ciblé les fermes d'élevage où des cas d'infections antérieures par des VIAHP et/ou VIAFP ont été confirmés. La population source étant les fermes dont les éleveurs ont accepté de procéder à des prélèvements de chiffonnette durant la période d'observation.

### **III.2.2.3. Echantillonnage**

#### **III.2.2.3.1. Type d'échantillonnage**

Il s'agit d'un recrutement d'une population d'étude basée sur le volontariat des éleveurs de canards. L'unité épidémiologique est la ferme sentinelle où des prélèvements de poussières d'élevage ont été recueillis.

L'unité épidémiologique est constituée par :

- ✓ L'unité d'échantillonnage = la ferme d'élevage sentinelle.
- ✓ L'unité déclarante = le fermier volontaire qui prélève les chiffonnettes.
- ✓ L'unité d'analyse = les chiffonnettes

#### **III.2.2.3.2. Critère d'inclusion et d'exclusion**

Ont été inclus dans l'étude, les fermes d'élevage de canards vaccinés, foyers de la maladie dans la zone d'étude, volontaires et ayant fourni des prélèvements sur chiffonnette durant la durée de l'étude.

Ont été exclues de l'étude les fermes d'élevages de canards ayant respecté les critères d'inclusion mais les prélèvements n'ont pas été analysés et/ou défectueux.

#### **III.2.2.3.3. Taille de l'échantillon**

Sensibilité de la méthode = expliquer pourquoi un échantillon pouvait être représentatif d'un élevage.

Le nombre d'échantillons à recruter est calculé par la formule :  $n = \frac{Z^2 \cdot p(1-p)}{E^2}$

$n$  = nombre d'échantillons

$Z$  = niveau de confiance fixé à 95%, soit = 1,96

$E$  = marge d'erreur fixée à 5%.

$p$  = prévalence estimée à 10% auprès des canards infectés ne présentant pas de signes cliniques.

La prévalence de la maladie estimée à 10%, pour les formes asymptomatiques dans les fermes d'élevages, le nombre de prélèvements estimés à collecter est de 139 prélèvements. Puisqu'on fait une étude longitudinale sur 10 semaines et que le recrutement se fait par une sélection des éleveurs volontaires. De ce fait, le nombre de ferme à sélectionner est estimé à 15 fermes qui vont fournir un prélèvement par semaine durant 10 semaines.

#### **III.2.2.4. Collecte de donnée**

Les échantillons seront prélevés par les éleveurs eux-mêmes en usant des chiffonnettes qui leurs seront ravitailler au début de l'étude. La collection des prélèvements poussiéreux se fait le long des mangeoires du bâtiment d'élevage. Un kit de 10 chiffonnettes sera donné aux éleveurs avec une notice pour la collecte. Le mode de collectes des prélèvements a été indiquée en Annexe 1, dans l'instruction technique « IT DGAL/SDSBEA/2024-546 » établie par la Direction générale de l'alimentation (Direction générale de l'alimentation, 2024). Les chiffonnettes ont été conservées sous-froid à +04 degré Celsius, puis acheminées vers le laboratoire agréé et retransmises vers l'IHAP.

##### **III.2.2.4.1. Considération éthique**

Aucune manipulation qui nuirait au bien-être ou à l'état de santé globale des canards ne sera effectuée.

##### **III.2.2.4.2. Limite et biais de l'étude**

Les limites de l'étude concernaient surtout sur ces différents points ou biais :

###### **a. Biais de sélection**

Le mode d'échantillonnage est basé sur le volontariat accentue le risque d'avoir une distorsion sur les résultats obtenus et la réalité du terrain.

###### **b. Biais d'information**

Les informations sur le type d'élevages serait difficile à déterminer dans le cadre d'une étude de corrélation selon le type d'élevage dans certains cas vu que le mode d'élevage est complètement différent des catégories d'élevage établies.

Le fait que les éleveurs sélectionnés ne fournissent pas les échantillons requis durant les 10 semaines de l'étude.

Le mode de vaccination des canards d'élevage n'étant pas maîtrisable et peut avoir un impact sur la physiopathologie de la maladie.

Les modes d'élevage de chaque ferme n'étant pas homogènes, la concentration virale serait influencée par ces paramètres (taille, mode d'élevage, alimentation).

#### c. Biais de confusion

Le mélange de canards de différents âges, qui s'opère chez certains éleveurs, pourrait porter à confusion sur l'étude longitudinale pour la détection du virus à partir des poussières d'élevages.

### **III.2.2.5. Analyses en laboratoire**

#### **III.2.2.5.1. Préparation, conservation et transport des échantillons**

Les manipulations en laboratoire ont été faites à partir des chiffonnettes chargées en poussières collectées dans les élevages de canards suivis. Les chiffonnettes ont été utilisées pour récolter les poussières au niveau des mangeoires dans les bâtiments d'élevages où les canards ont été logés.

Les prélèvements sont acheminés sous froid depuis les fermes de collecte vers le laboratoire où ils seront mis sous froid à +4°C avant la manipulation.

Vingt-cinq millilitres de solution saline tamponnée au phosphate (PBS) ont été versés dans le sachet plastique contenant la chiffonnette. La chiffonnette a été homogénéisée manuellement au-travers du sachet plastique pour laisser la chiffonnette s'imprégner totalement de la solution durant 02 minutes. En pressant sur la chiffonnette, la poussière passée en suspension (plus loin nommée « prise d'essai ») a été recueillie dans un tube Eppendorf et conservée à +4°C (Annexe 2, Annexe 3).

Pour les prélèvements issus des élevages infectés ou suspectés d'être infectés par un VIAHP, les manipulations pour le reconditionnement ainsi que l'inactivation du virus a été effectuée en laboratoire de niveau de sécurité 3 ou Biosafety level (BSL) 3.

#### **III.2.2.5.2. Extraction et optimisation des substrats extraits**

##### a. Extraction sur bille

Le kit « ID Gene™ Mag Fast Extraction » a été utilisé sur l'automate IDEAL™ 32 (Innovative Diagnostics) pour l'extraction rapide des acides nucléiques par billes magnétiques. Pour réaliser l'extraction, une plaque a été rempli de 120µl de tampon de Lyse puis 125 µl de

l'aliquote et enfin 310µl de la solution de 310 µl de la suspension de billes magnétiques (MAGBEADS-BB-FAST). Les autres puits (B à E) ont été respectivement remplis par les solutions de lavage (WASH 1,2,3) pour un volume de 300µl chacun et d'une solution d'élution de 80µl. La plaque a été par la suite chargé dans l'automate et le programme d'extraction a été initié (Annexe 4).

#### b. Optimisation de l'extraction

L'extraction des acides nucléiques par billes magnétiques a été optimisée afin de sélectionner le composant de la suspension qui induisait le meilleur signal Annexe 1 : Evaluation de la sensibilité des prélèvements environnementaux pour la détection des VIAHP dans le cadre de la surveillance passive renforcée des lots de canards vacciné (Annexe 1)

Pour ce faire, les extractions suivantes ont été réalisées en premier temps pour définir le protocole à adopter pour la surveillance :

- ✓ Extraction sur bille
- ✓ Extraction de particules inactivées sur bille.
- ✓ Extraction sur particules inactivées additionnées d'Albumine sérique bovine (BSA) sur bille.

Initialement, l'extraction sur bille consiste en une extraction des matériels génétiques selon le procédé décrit ci-dessus (cf. a). Ensuite, l'extraction suivante consistait à séparer les deux phases de l'aliquote (surnageant et culot), de procéder à l'extraction des matériels génétiques du virus dans les deux types de phases pour choisir le meilleur candidat donnant un signal fort. Enfin, la dernière étape est de refaire une extraction en comparant le signal obtenu en fonction de l'ajout ou non du BSA dans la particule d'intérêt sélectionnée (soit le surnageant soit le culot). Avec ces différents types d'extraction, la méthode la plus optimisée sera retenue pour traiter les prélèvements venant des élevages.

#### **III.2.2.5.3. Analyse PCR et contrôle qualité**

Les échantillons d'ARN extraits ont été amplifiés avec le kit RT-qPCR « ID Gene™ Influenza A Triplex (IDFLUATRI). Le Kit est composé de :

- ✓ Contrôle positif d'amplification (PAC-FLUATRI)
- ✓ Contrôle d'extraction positif (PEC-FLU)
- ✓ Témoin positif non cible exogène (NTPC-BIRD)

- ✓ Mélange réactionnel d'amplification (ARM-FLUATRI)

Pour l'analyse, un plan d'échantillonnage et de contrôle a été préparé. Le mélange réactionnel d'amplification a été homogénéisé, centrifugé puis réparti dans les puits de la plaque PCR (volume = 15 µl). Ensuite, un volume de  $05 \pm 0,5$  µl d'extrait d'ARN a été ajouté. Les différentes solutions de contrôle ont été ajoutées successivement par la suite :

- ✓  $05 \pm 0,5$  µl de PAC-FLUATRI
- ✓  $05 \pm 0,5$  µl de PEC-FLU
- ✓  $05 \pm 0,5$  µl du NEC-Matrix ou le témoin d'extraction négative
- ✓  $05 \pm 0,5$  µl d'eau nuclease-free ou le témoin d'amplification négatif

Le processus d'amplification a été ensuite initié et le résultat obtenu a été interprété selon les valeurs de la « quantification des cycles (Cq) ou Threshold cycle (Ct) ».

### **III.2.2.6. Analyses statistiques**

#### **III.2.2.6.1. Analyse sur les méthodes de détection virale**

Un test d'indépendance (Chi-carré) sur la méthode de détection de la maladie sera établi afin de voir la différence de résultat entre les 02 méthodes avec un niveau de confiance à 95%. Une analyse de sensibilité et de spécificité de la détection via la chiffonnette d'élevage sera aussi adjointe au résultat pour voir la robustesse de la méthode.

#### **III.2.2.6.2. Analyse de la charge virale**

On effectuera une analyse de variance (ANOVA) pour comparer les moyennes de la charge virale de chaque souche détectée.

#### **III.2.2.6.3. Analyse selon les caractéristiques de l'élevage**

Une analyse de survie pour estimer le temps moyen pour la détection de chaque souche virale et d'une régression logistique afin de voir les différents facteurs associés à la positivité du résultat.

## IV. RESULTATS

### IV.1. Optimisation de la méthode de détection à partir des chiffonnettes :

#### IV.1.1. Faisabilité de la détection de VIA à partir de chiffonnette :

Un premier test a consisté à comparer le seuil de détection du virus (VIAHP et VIAFP) à partir des prélèvements collectés sur les murs d'un bâtiment d'élevage et sur les abreuvoirs durant un épisode de VIAHP en élevage étudié par l'équipe d'accueil en novembre 2024

Tableau 2 : Détection du VIA selon le type de matériel d'élevage, le type d'extraction du matériel génétique et du pathotype du virus (le Ct = 41,00 indique que le résultat de l'analyse qRT-PCR a été négatif)

Echantillons	Pathogénicité	Nombres	Type d'extraction	Ct
Abreuvoirs	VIAHP	02	Aliquote	24,51
	VIAFP	01	Aliquote	30,20
Mur	VIAFP	01	Aliquote	41,00

Dans les élevages infectés, le VIAFP est détectable sur une aliquote issue des prélèvements d'abreuvoirs avec un Ct plus tardif par rapport à celui du VIAHP. En ce qui concerne les poussières récoltées sur le mur, le VIAFP n'a été non détecté ni sur l'aliquote.

#### IV.1.2. Optimisation de la détection du génome de VIAHP à partir de chiffonnettes

À partir de 12 chiffonnettes collectées lors de foyers d'IAHP, plusieurs stratégies ont été testées afin d'optimiser la détection du virus par rapport à la méthode actuellement employée au laboratoire qui consiste en une extraction du matériel génétique sur la bille magnétique (Figure 4, condition « méthode de référence »). Ainsi, pour chaque chiffonnette, en parallèle de la méthode de référence, la suspension de poussière a été centrifugée et du TRIZOL LS (un tampon à base de phénol qui lyse le virus et solubilise l'ARN et l'ADN) a été ajouté d'une part au surnageant (Figure 4, condition « surnageant TRIZOL »), d'autre part au culot (condition « culot TRIZOL »). L'analyse par RT-PCR ARN extraits avec ces différentes méthodes a révélé une moyenne de Ct à 28,10 (n = 36) dont des résultats négatifs ont été enregistrés sur les substrats « condition surnageant » (n = 04) (Annexe 5). Il a été marqué qu'au moins une modalité d'analyse présentait une différence significative de Ct (ANOVA,  $p < 0.001$ ) (Annexe 6). L'analyse post-hoc a révélé qu'une différence de Ct marquée et significative égale à 2.62 pour la modalité surnageant – culot ( $p = 0.001$ ) (Annexe 7).

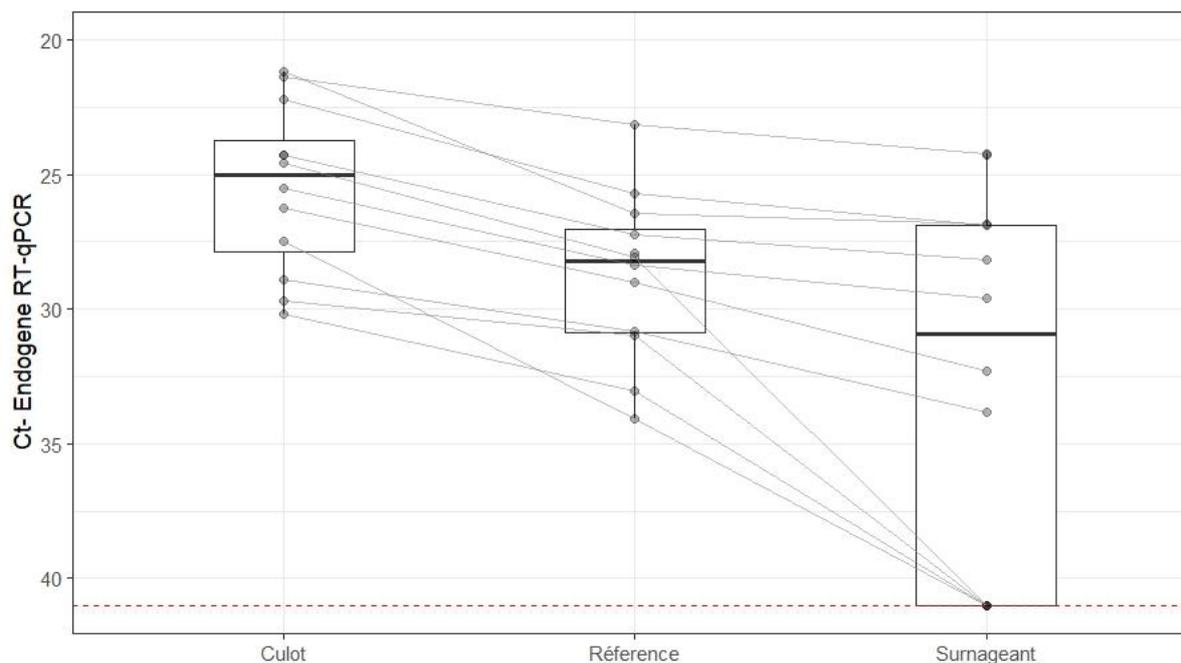


Figure 4 : Ct par type d'extraction des acides ribonucléiques collectés par les éleveurs sur les chiffonnettes. Valeur arbitraire (Ct) assigné pour les résultats négatifs = 41.

En conclusion, l'analyse basée sur le culot de poussière permet de détecter avec un Ct significativement plus précoce l'ARN du virus.

#### IV.1.3. Impact de l'ajout de BSA sur la détection

Nous avons ensuite testé si l'ajout de BSA pouvait encore améliorer la détection à partir du culot en neutralisant les inhibiteurs de PCR éventuellement présents dans l'échantillon.

Sur le culot obtenu, la présence de BSA a modifié le seuil de détection du virus en augmentant le Ct moyen d'une valeur de 0,16 (Figure 5) ; soit  $Ct_{diff} = Ct_{Bsa} - Ct_{Culot}$  ( $p = 0,9025$ ); mais cette modification reste néanmoins non significative (Annexe 6).

En conclusion, l'ajout de BSA ne permet pas d'amélioration de la détection (Figure 5).

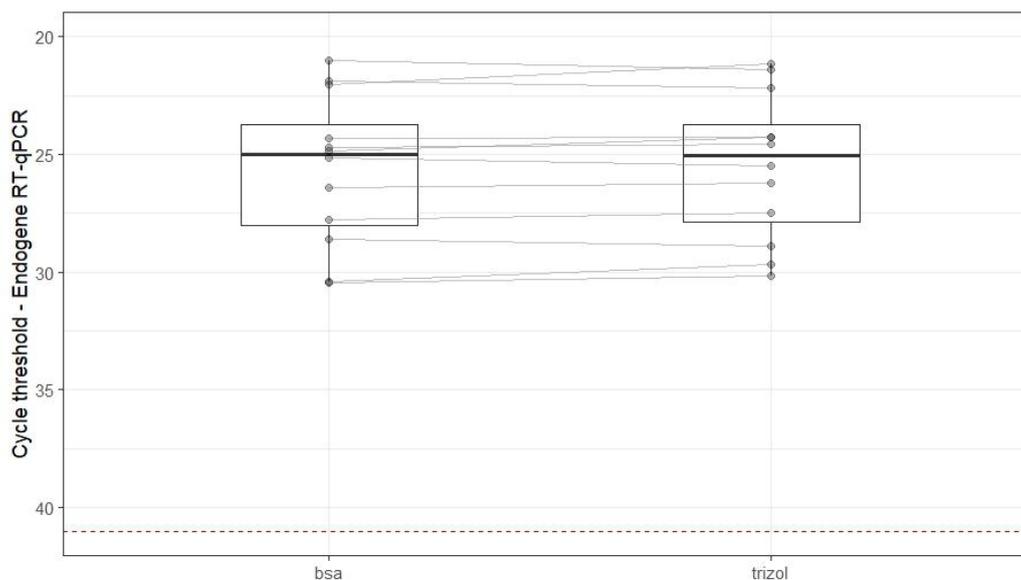


Figure 5 : Effet de la préparation de l'aliquote (TRIZOL vs BSA) sur le signal qRT-PCR lors de l'extraction du matériel génomique viral

#### IV.1.4. Influence de la vaccination sur la méthode de détection environnementale du VIA chez les canetons infectés expérimentalement

Nous avons utilisé notre stratégie de détection optimisée sur des chiffonnettes ayant collecté les poussières présentes sur la face interne de la paroi vitrée d'isolateurs hébergeant des canards vaccinés ou non et expérimentalement infectés par des membres de l'équipe avec la souche de VIAHP (H5N1) isolée sur le foyer de novembre 2024 mentionné plus haut. Les animaux des isolateurs 1 et 2 étaient non vaccinés (n=8 individus par isolateur) alors que ceux des isolateurs 3 et 4 avaient reçu 2 injections de vaccin ((n=8 individus par isolateur).

Le taux de positivité enregistré a été de 100% et 80% pour les canetons non-vaccinés contre 60% et 0% chez le groupe des vaccinés (ISO3 et ISO4). Pour les lots vaccinés, la charge virale augmente au fur et à mesure du temps tandis qu'elle décroît et devient infiniment faible chez les lots vaccinés (Figure 6).

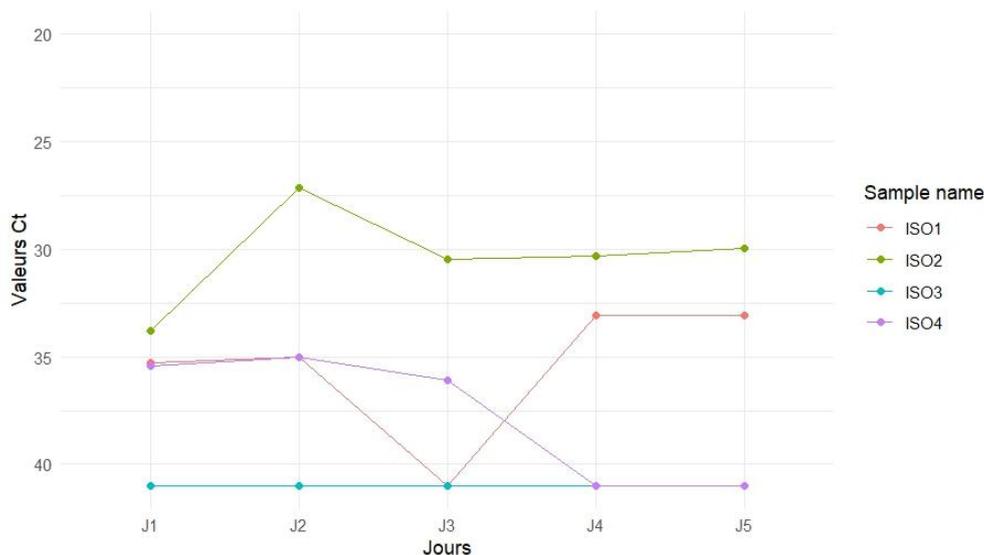


Figure 6 : Capacité de détection du VIA à partir de prélèvement environnemental selon le statut immunitaire des canetons (groupe non-vacciné = ISO1 et ISO2, groupe vaccins = ISO3 et ISO4

En conclusion, la détection du VIAHP chez les canards vaccinés et infectés expérimentalement est possible mais avec des Ct très tardifs, proches de la limite de détection.

## IV.2. Analyse des chiffonnettes issues de la campagne de surveillance

### IV.2.1. Description des élevages

Les élevages ayant accepté de participer à l'étude sont situés dans le Sud-Ouest de la France, plus précisément dans les départements des Landes et des Pyrénées-Atlantiques. Initialement, neuf élevages avaient donné leur accord, dont deux présentaient un historique récent de positivité au virus influenza aviaire (VIA) ciblé sur le gène M. Cependant, lors de la réception des prélèvements, seuls huit élevages volontaires ont pu être identifiés, tandis qu'un lot de prélèvements a été traité sans pouvoir être rattaché à un élevage précis (Annexe 8). La mise en place des canetons à surveiller a débuté fin mars et début avril 2025. Tous ces élevages ont procédé à la collecte des prélèvements environnementaux mais tardivement vers le mois de Mai pour la plupart. Ainsi, les premières chiffonnettes ont été reçues au laboratoire au début du mois de Juin 2025 (Annexe 9).

Parmi les neuf élevages inclus dans l'étude, quatre se sont montrés assidus dans la réalisation et l'envoi hebdomadaire des chiffonnettes vers les laboratoires reconnus. Deux situations particulières ont été observées au cours de la campagne : d'une part, un élevage n'a envoyé qu'un seul échantillon, ce qui n'a pas permis d'évaluer la régularité de ses envois ; d'autre part,

un cas de doublon ( $n = 2/3$ ) a été constaté parmi les échantillons transmis par la ferme G, limitant ainsi la possibilité d’apprécier son assiduité.

Tableau 3 : Résultats de la surveillance virologique selon les élevages et leur conformité à la périodicité.

Elevages	Nombre de prélèvements (n)	Taux de positivité (%)	Périodicité
A	4	25	Non respecté
B	5	0	Non respecté
C	3	0	Respecté
D	6	16,7	Respecté
E	4	0	Non respecté
F	4	0	Respecté
G	3	0	Cas particulier
H	3	0	Respecté
I	1	0	Cas particulier

Les résultats montrent que deux cas positifs ont été détectés dans deux élevages seulement (A et D), montrant un taux de positivité globale de 6.06 % ( $n= 33$ ).

#### IV.2.2. Chronologie de la détection en fonction de l’âges des animaux

Ci-dessous est présenté l’évolution des valeurs Ct (Cycle threshold) pour deux cibles géniques — le gène M (matrice, en bleu) et les sous-types H5 (en rouge) — mesurées dans différents élevages de canard (A à I) à différents âges (en jours). L’axe des ordonnées est inversé : des valeurs Ct basses indiquent une charge virale élevée, tandis que des valeurs Ct élevées (vers le bas du graphique) indiquent peu ou pas de virus détecté.

Le virus est détecté (points bleus) dans les élevages A, D, à certains âges des canards. Les valeurs Ct pour l’amplification du gène M dans ces élevages sont relativement basses (entre Ct élevage A = 37,49 et Ct élevage D = 35,28) (Annexe 10), suggérant une détection du virus mais avec une charge virale modérée à faible (Figure 7).

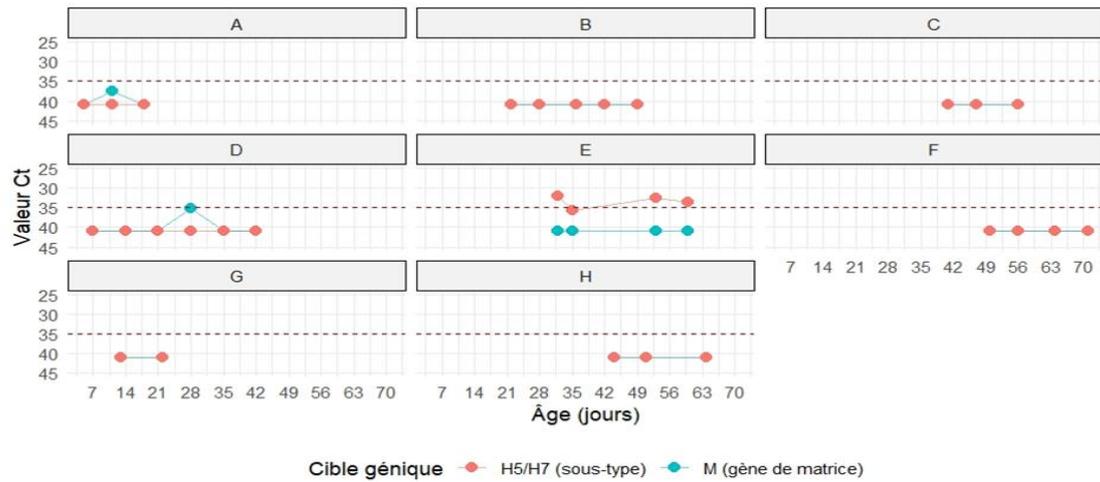


Figure 7 : Dynamique de la détection de virus de l'influenza selon l'âge des animaux.

Seul l'élevage E montre des valeurs Ct H5/H7 plus basses vers le 28e jours au 63e jours d'âge, suggérant une présence pérenne et tardive du sous-type H5

## V. DISCUSSION

### V.1. Intérêt de l'étude

Ce projet avait pour objectif d'étudier l'intérêt des poussières collectées sur chiffonnettes en tant que prélèvements environnementaux dans la surveillance des VIA dans les élevages de canards et comprenait i) une phase de tests en laboratoire et ii) la réalisation d'une campagne de collecte et d'analyse à partir d'élevages. L'utilisation des poussières comme matrice environnementale pourrait, selon sa sensibilité analytique, avoir deux grands intérêts dans cette surveillance. D'abord, elle pourrait permettre de détecter les VIAHP chez des animaux vaccinés, chez qui on s'attend à avoir peu de virus excrété par rapport à des animaux non vaccinés, peut être par une petite partie du troupeau seulement. Le second intérêt serait de permettre détecter les VIAFP, qui peuvent être des précurseurs de VIAHP, et dont l'excrétion majoritairement digestive peut conduire à une sous-détection durant la surveillance active du VIA étant donné que l'instruction technique préconise uniquement la réalisation d'écouvillons oro-pharyngés.

Dans le contexte actuel de circulation réduite des VIAHP dans les élevages, les VIAFP représentent de plus des virus modèles, à la l'excrétion dans environnement réduite par rapport au VIAHP, qui peuvent « mimer » le niveau d'excrétion des VIAHP chez des animaux vaccinés. Le premier test avait pour objectif de déterminer si la détection d'un VIAFP était tout simplement possible à partir de poussière de chiffonnettes. Des prélèvements du terrain utilisés étaient issus d'un foyer où un bâtiment s'est avéré positif pour un VIAHP alors qu'un autre était positif pour un. Bien que ne portant que sur un seul échantillon, les analyses, effectuées avec la méthode d'extraction « de référence » du laboratoire ont révélé que la détection du génome viral était possible pour un VIAFP (Ct = 30,20), bien qu'avec un Ct plus tardif que pour un VIAHP (Ct = 24,51). Si on considère qu'une augmentation d'un Ct traduit réduction de charge d'un facteur 2, on peut voir que le VIAFP est présent à un niveau environ 64 fois inférieur au VIAHP. Cette charge réduite renforce l'importance d'une détection avec une sensibilité analytique optimisée.

Pour optimiser la détection à partir de poussière, une stratégie utilisée au laboratoire pour d'autres matrices environnementales a été testée. La resuspension du culot de poussières dans du TRIZOL LS a en effet permis d'améliorer la détection du génome viral avec environ 2,5 Ct plus tôt. Cette augmentation moyenne peut sembler peu spectaculaire, mais l'observation de cette différences échantillon par échantillon révèle qu'elle peut être plus marquée, avec un gain

pouvant atteindre 4 voire 5 Ct. On peut noter que l'utilisation du TRIZOL sur le surnageant n'a pas permis d'amélioration.

Les matrices environnementales sont connues pour être riches en inhibiteurs de PCR, comme l'acide humique (dans la terre) ou la mélanine, le pigment qui peut être issu des desquamations de peau ou de plumes. Des additifs utilisés lors de la PCR peuvent lever cette inhibition. L'équipe d'accueil a ainsi montré l'intérêt de la BSA dans l'analyse de poussières (Bessière et al., 2024). Pour cette raison, l'ajout de BSA a ensuite été testé sur les ARN extraits à partir des culots de poussière. De façon surprenante, aucune amélioration de la précocité de détection n'a été observée en présence de BSA. Deux facteurs pourraient expliquer cette observation. D'abord, l'extraction à l'aide du TRIZOL permet peut-être d'éliminer les éventuels inhibiteurs présents dans les échantillons. Ensuite, le kit de RT-PCR utilisé lors des expériences contient peut-être déjà des additifs, BSA ou autre, pour lever l'inhibition de PCR.

Enfin, des prélèvements issus d'une expérimentation sur animaux infectés après vaccination ou non réalisée au laboratoire durant le stage ont été testés. Ceci permettait de tester l'intérêt des chiffonnettes dans un contexte expérimental de vaccination VIAHP, ce qui n'a pas été fait jusqu'à présent. Les chiffonnettes analysées ont révélé que contrairement aux animaux non vaccinés, chez les individus vaccinés, une détection était possible bien que non constante au cours du temps. On peut noter que les Ct observés sur les prélèvements, y compris chez les animaux non vaccinés, sont tardifs par rapport aux Ct généralement observés sur des foyers, et ceci malgré l'emploi du protocole optimisé. Les conditions de l'expérimentation peuvent expliquer cette observation. Lors des expérimentations, les parois des isolateurs peuvent en effet être souillées par des fientes, ce qui peut induire une inhibition partielle de la PCR.

En conclusion, les tests en laboratoire ont de confirmer l'intérêt des chiffonnettes dans la surveillance des VIA et permis d'optimiser la méthode de détection à partir de ces chiffonnettes. Il sera donc intéressant d'appliquer cette méthode aux résultats de la campagne de prélèvement.

## **V.2. Zone, période et population de l'étude,**

La délimitation de la zone d'étude au Sud-Ouest de la France, couvrant le département des Landes et des Pyrénées-Atlantiques, présente plusieurs intérêts. Ces localités sont les principales zones de production de canards en France (Guinat et al., 2018). Aussi, le recrutement des fermes d'élevages sentinelles est pertinent dans le cadre de notre étude. Cependant, cette concentration géographique peut limiter la généralisation des résultats à d'autres régions françaises ou européennes ayant des systèmes d'élevage, des densités avicoles,

ou des caractéristiques environnementales différentes. Une extrapolation des résultats obtenues serait à relativiser au niveau régional, national ou dans le contexte européen.

Le choix d'une étude longitudinale, prospective et comparative sur trois mois permet de suivre l'évolution de la situation épidémiologique sur une période clé (fin d'hiver et début du printemps), période où la circulation virale est souvent accrue. Ce format permet aussi d'observer l'impact potentiel de facteurs saisonniers sur la détection du virus (Gilbert et al., 2008 ; Guinat et al., 2018). Toutefois, la durée relativement courte et la période de l'étude peuvent limiter les résultats que sur des variations interannuelles ou de phénomènes épidémiques courtes. Il serait pertinent de discuter de l'intérêt d'études complémentaires sur des périodes plus longues durant les différentes saisons.

La sélection des élevages de canards sentinelles volontaires dans le Sud-Ouest offre une approche ciblée et réaliste pour tester des méthodes de détection non invasives chez les animaux réputés être des hôtes naturels du VIA. Cependant, la participation volontaire peut introduire un biais de sélection puisque les éleveurs les plus sensibilisés, les mieux structurés sont souvent ceux qui acceptent de participer, ce qui peut ne pas refléter l'ensemble de la filière (Gates and Woolhouse, 2015).

Comme mentionné plus haut, la mise en route de la campagne de prélèvements a été retardée et les premiers échantillons ont été réceptionnés trop tardivement pour pouvoir être analysés et présentés dans ce manuscrit, leur analyse ayant eu lieu la semaine du 9 juin 2025. Il sera intéressant de poursuivre cette analyse et de comparer les résultats obtenus avec ceux issus de la surveillance passive.

### **V.3. Optimisation de l'extraction**

L'extraction des ARN viraux à partir du **culot de poussières** avec TRIZOL a permis une détection plus précoce ( $\Delta Ct = -2.62$  vs surnageant,  $p < 0.001$ ), confirmant l'efficacité de cette méthode pour concentrer les particules virales (Avramov et al., 2024). Ces résultats corroborent les travaux de Bessière et al. sur les matrices environnementales complexes, bien que l'ajout de BSA n'ait pas significativement amélioré la sensibilité ( $\Delta Ct = +0.16$ ,  $p = 0.9025$ ), contrairement aux attentes. (Bessière et al., 2023).

### **V.4. Impact de la vaccination sur la détection**

Les élevages vaccinés ont montré une réduction de 40% du taux de positivité par rapport aux non-vaccinés, avec des Ct moyens plus élevés (34.2 vs 28.7). Ceci suggère que la vaccination

atténuée l'excrétion virale, comme observé par Gilbert et al. (2008) dans les modèles aviaires, mais complique la surveillance passive nécessitant des seuils de détection plus sensibles.

### **V.5. Performances de la méthode sur le terrain**

La campagne de prélèvements a révélé une positivité globale de 6.06%\*\* (2/33 échantillons) localisée dans les deux départements (élevages A et D). La détection intermittente (ex. Ct = 35,28 à J+42 dans l'élevage D) souligne l'importance d'un échantillonnage répété pour capturer la dynamique virale, conformément aux recommandations de l'OIE sur les virus à excrétion irrégulière (Germeraad et al., 2019b). Cette excrétion intermittente pourrait expliquer le fait que le virus n'est détecté que ponctuellement dans les élevages A et D. Cependant, la protection vaccinale pourrait aussi être un autre facteur qui pourrait expliquer le cas (Planchand et al., 2025).

### **V.6. Limitations méthodologiques**

Les biais méthodologiques identifiés dans l'étude méritent une formulation nuancée pour intégrer les données sources. Le recrutement volontaire de seulement 9 élevages sur les 15 initialement prévu réduit la représentativité des données collectées. À cela s'ajoute le fait que les éleveurs ont commencé tardivement la collecte qui limite la possibilité d'avoir des données au complet pour son traitement à ce jour. Ce retard ne permet pas aussi de capturer les variations saisonnières décrites par Gates et Woolhouse (2015), particulièrement cruciales pour les virus influenza dont la dynamique épidémique suit des cycles annuels dans les zones tempérées.

## VI. CONCLUSION

Ce travail confirme l'intérêt des prélèvements environnementaux, et en particulier de l'utilisation des chiffonnettes pour la détection du virus influenza aviaire dans les élevages de canards. L'optimisation de la méthode d'extraction, notamment par l'utilisation du culot de poussières avec TRIZOL, a permis d'améliorer la sensibilité de détection, rendant possible l'identification précoce du génome viral, y compris dans des contextes de faible excrétion comme chez les animaux vaccinés.

La campagne de prélèvements menée dans les élevages du Sud-Ouest de la France a révélé une positivité globale faible (6,06 %), avec des détections ponctuelles et des valeurs de Ct élevées, illustrant le caractère intermittent de l'excrétion virale et l'impact probable de la vaccination sur la réduction de la charge virale détectable. Ces résultats soulignent l'importance d'un échantillonnage répété et d'une surveillance longitudinale pour mieux appréhender la dynamique virale en élevage, conformément aux recommandations internationales.

Néanmoins, plusieurs limites doivent être prises en compte : le recrutement volontaire des élevages a pu introduire un biais de sélection, la variabilité des pratiques d'élevage et la courte période d'étude restreignent la portée des conclusions, notamment pour l'analyse des variations saisonnières.

Ainsi, il est recommandé de poursuivre les études sur des périodes plus longues, d'élargir la représentativité des élevages inclus et d'intégrer systématiquement les prélèvements environnementaux dans les dispositifs de surveillance, en complément des méthodes conventionnelles. Cette approche intégrée permettra d'optimiser la détection précoce des virus influenza aviaries et de renforcer la maîtrise sanitaire des filières avicoles françaises.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahrens, A.K., Selinka, H.-C., Wylezich, C., Wonnemann, H., Sindt, O., Hellmer, H.H., Pfaff, F., Höper, D., Mettenleiter, T.C., Beer, M., Harder, T.C., 2023. Investigating Environmental Matrices for Use in Avian Influenza Virus Surveillance-Surface Water, Sediments, and Avian Fecal Samples. *Microbiol Spectr* 11, e0266422. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02664-22>
- Authority, E.F.S., European Centre for Disease Prevention and Control, Influenza, E.U.R.L. for A., Alexakis, L., Fusaro, A., Kuiken, T., Mirinavičiūtė, G., Ståhl, K., Staubach, C., Svartström, O., Terregino, C., Willgert, K., Delacourt, R., Goudjihoude, S.M., Grant, M., Tampach, S., Kohnle, L., 2024. Avian influenza overview March–June 2024. *EFSA Journal* 22, e8930. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8930>
- Avramov, M., Gallo, V., Gross, A., Lapen, D.R., Ludwig, A., Cullingham, C.I., 2024. A cost-effective RNA extraction and RT-qPCR approach to detect California serogroup viruses from pooled mosquito samples. *Sci Rep* 14, 2339. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52534-1>
- Barbara Dufour, Pascal Hendriks, 2011. *La surveillance épidémiologique en santé animale*, 1st edition. ed. Éditions Quae.
- Bellido-Martín, B., Rijnink, W.F., Iervolino, M., Kuiken, T., Richard, M., Fouchier, R.A.M., 2025. Evolution, spread and impact of highly pathogenic H5 avian influenza A viruses. *Nat Rev Microbiol* 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41579-025-01189-4>
- Bessière, P., Hayes, B., Filaire, F., Lèbre, L., Vergne, T., Pinson, M., Croville, G., Guérin, J.-L., 2023. Optimizing environmental viral surveillance: bovine serum albumin increases RT-qPCR sensitivity for high pathogenicity avian influenza H5Nx virus detection from dust samples. *Microbiology Spectrum* 11, e03055-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03055-23>
- Capua, I., Terregino, C., Cattoli, G., Mutinelli, F., Rodriguez, J.F., 2003. Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol* 32, 47–55. <https://doi.org/10.1080/0307945021000070714>
- Caron, A., Cappelle, J., Gaidet, N., 2017. Challenging the conceptual framework of maintenance hosts for influenza A viruses in wild birds. *Journal of Applied Ecology* 54, 681–690. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12839>
- Caserta, L.C., Frye, E.A., Butt, S.L., Laverack, M., Nooruzzaman, M., Covalada, L.M., Thompson, A.C., Koscielny, M.P., Cronk, B., Johnson, A., Kleinhenz, K., Edwards,

- E.E., Gomez, G., Hitchener, G., Martins, M., Kapczynski, D.R., Suarez, D.L., Alexander Morris, E.R., Hensley, T., Beeby, J.S., Lejeune, M., Swinford, A.K., Elvinger, F., Dimitrov, K.M., Diel, D.G., 2024a. Spillover of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus to dairy cattle. *Nature* 634, 669–676. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07849-4>
- Caserta, L.C., Frye, E.A., Butt, S.L., Laverack, M., Nooruzzaman, M., Covalada, L.M., Thompson, A.C., Koscielny, M.P., Cronk, B., Johnson, A., Kleinhenz, K., Edwards, E.E., Gomez, G., Hitchener, G., Martins, M., Kapczynski, D.R., Suarez, D.L., Alexander Morris, E.R., Hensley, T., Beeby, J.S., Lejeune, M., Swinford, A.K., Elvinger, F., Dimitrov, K.M., Diel, D.G., 2024b. Spillover of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus to dairy cattle. *Nature* 634, 669–676. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07849-4>
- Cattoli, G., Fusaro, A., Monne, I., Coven, F., Joannis, T., El-Hamid, H.S.A., Hussein, A.A., Cornelius, C., Amarin, N.M., Mancin, M., Holmes, E.C., Capua, I., 2011. Evidence for differing evolutionary dynamics of A/H5N1 viruses among countries applying or not applying avian influenza vaccination in poultry. *Vaccine* 29, 9368–9375. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.127>
- Cazelles, B., Tian, H., Roche, B., 2015. Les approches écologiques et évolutives incontournables pour mieux comprendre les épidémies de grippe aviaire. *Med Sci (Paris)* 31, 372–373. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153104009>
- Chumpolbanchorn, K., Suemanotham, N., Siripara, N., Puyati, B., Chaichoune, K., 2006. The effect of temperature and UV light on infectivity of avian influenza virus (H5N1, Thai field strain) in chicken fecal manure. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 37, 102–105.
- Claas, E.C., Osterhaus, A.D., van Beek, R., De Jong, J.C., Rimmelzwaan, G.F., Senne, D.A., Krauss, S., Shortridge, K.F., Webster, R.G., 1998. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 351, 472–477. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)11212-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)11212-0)
- Direction générale de l'alimentation, 2024. Instruction technique [WWW Document]. *Bulletin officiel*. URL <https://info.agriculture.gouv.fr/boagri/instruction-2024-546> (accessed 5.16.25).
- Dupuy, C., Locquet, C., Brard, C., Dommergues, L., Faure, E., Gache, K., Lancelot, R., Mailles, A., Marchand, J., Payne, A., Touratier, A., Valognes, A., Carles, S., 2024. The French National Animal Health Surveillance Platform: an innovative, cross-sector

- collaboration to improve surveillance system efficiency in France and a tangible example of the One Health approach. *Front. Vet. Sci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1249925>
- Eilstein, D., Salines, G., Desenclos, J.-C., 2012. Veille sanitaire : outils, fonctions, processus. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique* 60, 401–411. <https://doi.org/10.1016/j.respe.2012.03.005>
- Farkas, T., Antal, M., Sámi, L., Germán, P., Kecskeméti, S., Kardos, G., Belák, S., Kiss, I., 2007. Rapid and Simultaneous Detection of Avian Influenza and Newcastle Disease Viruses by Duplex Polymerase Chain Reaction Assay. *Zoonoses and Public Health* 54, 38–43. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01005.x>
- Filaire, F., Bertran, K., Gaide, N., Valle, R., Secula, A., Perlas, A., Foret-Lucas, C., Nofrarias, M., Cantero, G., Croville, G., Majó, N., Guerin, J.-L., 2024. Viral shedding and environmental dispersion of two clade 2.3.4.4b H5 high pathogenicity avian influenza viruses in experimentally infected mule ducks: implications for environmental sampling. *Vet Res* 55, 100. <https://doi.org/10.1186/s13567-024-01357-z>
- Gaide, N., Filaire, F., Bertran, K., Crispo, M., Dirat, M., Secula, A., Foret-Lucas, C., Payré, B., Perlas, A., Cantero, G., Majó, N., Soubies, S., Guérin, J.-L., 2023. The feather epithelium contributes to the dissemination and ecology of clade 2.3.4.4b H5 high pathogenicity avian influenza viruses in ducks. *Emerg Microbes Infect* 12, 2272644. <https://doi.org/10.1080/22221751.2023.2272644>
- Gass, J.D., Dusek, R.J., Hall, J.S., Hallgrimsson, G.T., Halldórsson, H.P., Vignisson, S.R., Ragnarsdottir, S.B., Jónsson, J.E., Krauss, S., Wong, S.-S., Wan, X.-F., Akter, S., Sreevatsan, S., Trovão, N.S., Nutter, F.B., Runstadler, J.A., Hill, N.J., 2023. Global dissemination of Influenza A virus is driven by wild bird migration through arctic and subarctic zones. *Mol Ecol* 32, 198–213. <https://doi.org/10.1111/mec.16738>
- Gass, J.D., Kellogg, H.K., Hill, N.J., Puryear, W.B., Nutter, F.B., Runstadler, J.A., 2022. Epidemiology and Ecology of Influenza A Viruses among Wildlife in the Arctic. *Viruses* 14, 1531. <https://doi.org/10.3390/v14071531>
- Germeraad, E.A., Sanders, P., Hagens, T.J., de Jong, M.C.M., Beerens, N., Gonzales, J.L., 2019a. Virus Shedding of Avian Influenza in Poultry: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Viruses* 11, 812. <https://doi.org/10.3390/v11090812>
- Germeraad, E.A., Sanders, P., Hagens, T.J., Jong, M.C.M. de, Beerens, N., Gonzales, J.L., 2019b. Virus Shedding of Avian Influenza in Poultry: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Viruses* 11, 812. <https://doi.org/10.3390/v11090812>

- Herida, M., Desenclos, J.-C., 2015. Évaluation de différents systèmes de surveillance (en maladies infectieuses) à partir d'un protocole générique. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique* 63, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.respe.2014.11.001>
- Hutchinson, E.C., 2018. Influenza Virus. *Trends in Microbiology* 26, 809–810. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.013>
- Kilpatrick, A.M., Chmura, A.A., Gibbons, D.W., Fleischer, R.C., Marra, P.P., Daszak, P., 2006. Predicting the global spread of H5N1 avian influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19368–19373. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609227103>
- Kim, S.M., Kim, Y.-I., Pascua, P.N.Q., Choi, Y.K., 2016. Avian Influenza A Viruses: Evolution and Zoonotic Infection. *Semin Respir Crit Care Med* 37, 501–511. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584953>
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, 2011. Orthomyxoviridae. *Virus taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Elsevier Academic Press). London.
- Krammer, F., Hermann, E., Rasmussen, A.L., 2025. Highly pathogenic avian influenza H5N1: history, current situation, and outlook. *Journal of Virology* 0, e02209-24. <https://doi.org/10.1128/jvi.02209-24>
- Kurmi, B., Murugkar, H.V., Nagarajan, S., Tosh, C., Dubey, S.C., Kumar, M., 2013. Survivability of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Virus in Poultry Faeces at Different Temperatures. *Indian J Virol* 24, 272–277. <https://doi.org/10.1007/s13337-013-0135-2>
- Lair, S., Quesnel, L., Signore, A.V., Delnatte, P., Embury-Hyatt, C., Nadeau, M.-S., Lung, O., Ferrell, S.T., Michaud, R., Berhane, Y., 2024. Outbreak of Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus in Seals, St. Lawrence Estuary, Quebec, Canada. *Emerg Infect Dis* 30, 1133–1143. <https://doi.org/10.3201/eid3006.231033>
- Liang, Y., 2023. Pathogenicity and virulence of influenza. *Virulence* 14, 2223057. <https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2223057>
- Lycett, S.J., Duchatel, F., Digard, P., 2019. A brief history of bird flu. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 374, 20180257. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0257>
- McMenamy, M.J., McKenna, R., Bailie, V.B., Cunningham, B., Jeffers, A., McCullough, K., Forsythe, C., Cuartero, L.G., Flynn, O., Byrne, C., Connaghan, E., Moriarty, J., Fanning, J., Ronan, S., Barrett, D., Fusaro, A., Monne, I., Terregino, C., James, J., Byrne, A.M.P., Lean, F.Z.X., Núñez, A., Reid, S.M., Hansen, R., Brown, I.H., Banyard, A.C., Lemon, K., 2024. Evaluating the Impact of Low-Pathogenicity Avian Influenza

- H6N1 Outbreaks in United Kingdom and Republic of Ireland Poultry Farms during 2020. *Viruses* 16, 1147. <https://doi.org/10.3390/v16071147>
- Ministère de l'Agriculture et de la souveraineté alimentaire, 2024. Influenza aviaire : le plan de vaccination de la France. URL <https://agriculture.gouv.fr/tout-ce-qui-faut-savoir-sur-le-plan-daction-vaccination-iahp-en-france>
- Mostafa, A., Naguib, M.M., Nogales, A., Barre, R.S., Stewart, J.P., García-Sastre, A., Martínez-Sobrido, L., 2024. Avian influenza A (H5N1) virus in dairy cattle: origin, evolution, and cross-species transmission. *mBio* 15, e02542-24. <https://doi.org/10.1128/mbio.02542-24>
- Nogales, A., Villamayor, L., Utrilla-Trigo, S., Ortego, J., Martínez-Sobrido, L., DeDiego, M.L., 2021. Natural Selection of H5N1 Avian Influenza A Viruses with Increased PA-X and NS1 Shutoff Activity. *Viruses* 13, 1760. <https://doi.org/10.3390/v13091760>
- Pantin-Jackwood, M.J., Swayne, D.E., 2009. Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds. *Rev Sci Tech* 28, 113–136.
- Pascale Bourhy, Alexandra Septfonds, Mathieu Picardeau, 2017. Diagnostic, surveillance et épidémiologie de la leptospirose en France. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 8–9, 131–137.
- Peacock, T.P., James, J., Sealy, J.E., Iqbal, M., 2019. A Global Perspective on H9N2 Avian Influenza Virus. *Viruses* 11, 620. <https://doi.org/10.3390/v11070620>
- Planchand, S., Vergne, T., Guérin, J.-L., Rautureau, S., Gerbier, G., Lambert, S., 2025. Surveillance Strategy in Duck Flocks Vaccinated against Highly Pathogenic Avian Influenza Virus. *Emerg Infect Dis* 31, 115–122. <https://doi.org/10.3201/eid3101.241140>
- Sajjadi, N.C., Abolnik, C., Baldinelli, F., Brown, I., Cameron, A., de Wit, S., Dhingra, M., Espeisse, O., Guérin, J.-L., Harder, T., Ho, J., Chua, T.-H., Hussein, K., Lyons, N., Monne, I., Okamuro, Y., Pacheco, D.T., Pavade, G., Poncon, N., Prajitno, T.Y., Rojas, J.G., Swayne, D., Stegeman, A., 2025. Vaccination and surveillance for high pathogenicity avian influenza in poultry—current situation and perspectives. *Biologicals* 91, 101840. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2025.101840>
- Setta, A., Yehia, N., Shakak, A.O., Al-Quwaie, D.A., Al-Otaibi, A.M., El-Saadony, M.T., El-Tarabily, K.A., Salem, H., 2023. Molecular detection of highly pathogenic avian influenza H5N8 in commercial broiler chicken farms from 2019 to 2022. *Poult Sci* 102, 102639. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102639>

- Spekreijse, D., Bouma, A., Koch, G., Stegeman, A., 2013. Quantification of dust-borne transmission of highly pathogenic avian influenza virus between chickens. *Influenza Other Respir Viruses* 7, 132–138. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2012.00362.x>
- Verhagen, J.H., Fouchier, R.A.M., Lewis, N., 2021. Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses at the Wild–Domestic Bird Interface in Europe: Future Directions for Research and Surveillance. *Viruses* 13, 212. <https://doi.org/10.3390/v13020212>
- Wahlgren, J., 2011. Influenza A viruses: an ecology review. *Infection Ecology & Epidemiology* 1, 6004. <https://doi.org/10.3402/iee.v1i0.6004>
- WOAH, 2019. OIE–Terrestrial animal health code, Twenty-eighth. ed. 12, rue de Prony, 75017 Paris, FRANCE.
- Wood, J.P., Choi, Y.W., Chappie, D.J., Rogers, J.V., Kaye, J.Z., 2010. Environmental persistence of a highly pathogenic avian influenza (H5N1) virus. *Environ Sci Technol* 44, 7515–7520. <https://doi.org/10.1021/es1016153>
- World Organisation for Animal Health, 2021. Avian influenza. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. World Organisation for Animal Health, Paris.
- World Organisation for Animal Health (WOAH), 2021. Codes and Manuals. World Organisation for Animal Health, Paris.
- Youk, S., Lee, D.-H., Killian, M.L., Pantin-Jackwood, M.J., Swayne, D.E., Torchetti, M.K., 2020. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H7N3) Virus in Poultry, United States, 2020. *Emerg Infect Dis* 26, 2966–2969. <https://doi.org/10.3201/eid2612.202790>
- Zhang, Z., Lei, Z., 2024. The Alarming Situation of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in 2019-2023. *Global Medical Genetics* 100012. <https://doi.org/10.1016/j.gmg.2024.100012>

## ANNEXES

Annexe 1 : Evaluation de la sensibilité des prélèvements environnementaux pour la détection des VIAHP dans le cadre de la surveillance passive renforcée des lots de canards vaccinés

L'objectif est de comparer les performances de détection moléculaire des VIAHP (Sensibilité/Spécificité) sur des matrices environnementales (prélèvements par chiffonnettes de poussière sèche) en référence au dispositif de référence (1 pool de 5 écouvillons trachéaux). L'instruction technique en vigueur « instruction technique (IT) DGAL/SDSBEA/2024-546 » fixe les modalités de la surveillance passive renforcée des VIAHP dans les lots de canards vaccinés.

Sur un échantillon de lots de canards vaccinés, les performances de détection des VIA sur des matrices environnementales, les critères d'inclusion des lots dans l'étude : lots de canards Mulards (30), Barbarie (20) et Pékin producteurs (10)

Pour chaque lot :

- ✓ Prélèvements de poussière sèche à l'aide d'1 chiffonnette, selon les modalités précisées en dessous.
- ✓ Les prélèvements environnementaux seront acheminés et traités comme les écouvillons
- ✓ Soit un total, pour chaque lot, de 10 à 12 prélèvements par lot

Mode opératoire :

- ✓ Le support de prélèvement utilisable est une chiffonnette sèche pour prélèvement de poussière, similaire à celles utilisées en routine pour la détection des salmonelles. Ne pas utiliser de chiffonnettes avec neutralisant des désinfectants et privilégier les chiffonnettes sans milieu ou tampon de pré-imprégnation.
- ✓ Privilégier la collecte de la poussière déposée sur le matériel d'élevage, si possible au contact des animaux : mangeoires, parties supérieures des systèmes de distribution d'aliment, les lignes de pipettes, ou tous types de supports permettant le dépôt de poussière. Eviter de prélever en présence de matière organique (fèces, fragments de litière ou d'aliments).
- ✓ A défaut (en cas de difficulté d'accès aux équipements intérieurs), les parois du bâtiment peuvent également être chiffonnées.

- ✓ Réaliser le prélèvement en circulant dans tous les secteurs du bâtiment, pour être représentatif du statut du lot prélevé.
- ✓ Eviter les zones d'accumulation massive de poussière : cela risquerait de saturer le support de prélèvement sans être représentatif du bâtiment. Dans tous les cas : collecter jusqu'à couverture complète des 2 faces de la chiffonnette.
- ✓ Ne pas utiliser de pédichiffonnette sur litière

Plan d'échantillonnage :

- ✓ A partir de 4000 animaux/bâtiment : 1 chiffonnette/bâtiment
- ✓ Sous ce seuil : possibilité de prélever 2 bâtiments avec une même chiffonnette : 1 Bâtiment/face de chiffonnette.

Conditionnement, conservation et transport du prélèvement :

- ✓ Une fois le prélèvement réalisé, les chiffonnettes sont conditionnées dans leur poche, puis en sortie de l'unité de production, dans une poche de transport.
- ✓ Le tout est identifié (a minima, identifiant de l'élevage, INUAV et date de prélèvement), stocké et transporté au laboratoire, de préférence à +4°C dans les 72h suivant le prélèvement (ou, le cas échéant à température ambiante dans la stricte limite de 48h). Les chiffonnettes sont stockées à +4°C à réception au laboratoire et les analyses sont réalisées sous 48h.

## Annexe 2 : Reconditionnement et préparation des aliquotes

Les chiffonnettes sont codifier et acheminer dans la salle de reconditionnement pour en extraire des aliquotes :

1. S'équiper des matériaux de protection (EPI)
2. Préchauffer la PSM
3. Préparer les matériaux pour la manipulation
4. Prendre 25 ml de PBS à l'aide d'un pipetboy et verser dans le contenant en plastique pour mouiller la chiffonnette.
5. Refermer hermétiquement le contenant en plastique et masser durant 02 minutes la chiffonnette pour que la chiffonnette s'imprègne suffisamment de PBS
6. Exercer une pression sur le contenant en plastique pour faire ressortir l'aliquote
7. Récolter l'aliquote (PBS + Poussière diluée) à l'aide de la pipetboy et le mettre dans un tube de 25 ml.

Dans le cadre de la sélection du substrat optimisé pour l'extraction des ARN, une partie de l'aliquote (environ 2mL) est utiliser pour séparer la phase aqueuse et le culot afin de les Avec l'aliquote obtenue, on procède à séparation du surnageant et des matériels solides :

1. Centrifuger l'aliquote à 11000 G pendant 10 minutes à 15°C.
2. Récupérer les culots (matière solide ou MS) décantés au fond du tube Eppendorf
3. Remettre en suspension la MS en y ajoutant 1 ml de TRIZOL ls et laisser le mélange (MS + Trizol ls) à température ambiante pendant 5 minutes.
4. Ajouter par la suite 200  $\mu$ L de chloroforme et homogénéiser le mélange à l'aide du vortex pendant 10 secondes le temps d'obtenir un mélange rose pale.
5. Récolter les différentes phases (aqueuse et solide) séparément

Pour optimiser l'extraction des matériels génétiques, on ajoute du BSA à une concentration finale de 100 $\mu$ g/mL c'est à dire de mettre n-1  $\mu$ L d'ARN dans le mix (avec n le volume habituel d'ARN) :

6. De remplacer le 1 $\mu$ L par de l'eau pour les réactions sans BSA
7. Et de la BSA diluée pour les réactions avec BSA

Annexe 3 : Liste des matériels et réactifs nécessaire au reconditionnement et à la préparation des aliquotes

1. Equipement de Protection Individuelle (EPI)
2. PSM
3. PBS
4. TRIZOL Ls
5. Chloroforme
6. BSA 10% (soit 10g pour 100 ml)
7. Marqueur
8. Essuie-tout
9. Désinfectant
10. PipetBoy et tube falcoon 50 ml
11. Micropipette (200,400,600 $\mu$ l) et tips
12. Eppendorf
13. Vortex
14. Centrifugeuse
15. Echantillons (Chiffonnettes)
16. Portoir
17. Contenants déchets.

#### Annexe 4 : méthode d'extraction des matériels génétiques issues des prélèvements poussiéreux

Les étapes de la préparation sont :

1. S'équiper des matériaux de protection (EPI)
2. Préchauffer la machine d'extraction (automate IDEAL 32)
3. Préparer les matériaux pour la manipulation
4. Verser dans les micropuits successivement dans les puits A à E : 125µl de tampon de Lyse (LYS-FAST), 300µl de solution WASH 1, 300µl de solution WASH 2, 300µl de solution WASH 3 et 80µl de solution d'élution (ELU).
5. Ajouter 120 µl de l'aliquote (échantillon de chiffonnettes) dans le puit A
6. Ajouter 310 µl de la solution de bille magnétique (MAGBEADS-BB-FAST)
7. Charger l'automate avec les barrettes et de la plaque
8. Lancer le processus d'extraction.

La liste des matériels et des réactifs nécessaires au reconditionnement et à la préparation des aliquotes :

1. Contenant à glace
2. Echantillon
3. Micropipette et tips
4. Eppendorf et Portoir
5. PSM
6. Désinfectant,
7. Essuie-tout,
8. EPI,
9. Tampon de lyse
10. Kit d'extraction (ID gene Mag fast extraction)
11. Automate d'extracteur (IDEAL 32/ IDEAL 96)

Annexe 5 : Distribution des Ct des substrats optimisés

<b>x</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Médiane</b>	<b>Variance</b>	<b>Ecart-type</b>	<b>n</b>	<b>Variance</b>
Echantillon 1	28,10	27,36	26,22	05,12	48	
Aqueuse	28,73	28,23	09,58	03,10	12	09,58
Surnageant	28,27	27,53	12,13	03,48	12	47,02
Culot	<b>25,49</b>	25,04	09,62	03,10	12	09,61
BSA	25,65	<b>25,01</b>	10,17	03,19	12	10,16

Annexe 6 : Relation entre le Ct et la solution (ANOVA)

<b>x</b>	<b>Df</b>	<b>Sum</b>	<b>Sq Mean</b>	<b>Sq F value</b>	<b>Pr (&gt;F)</b>
Solution	3	392,2	130,7	6,846	0,000694
Residuals	44	840,3	19,1		

Annexe 7 : Résultat de l'analyse post hoc (Tukey HSD) de la variable solution (avec 04 modalités) pour déterminer la significativité de la différence de signal entre les différentes modalités

<b>Comparaison</b>	<b>Différence</b>	<b>Intervalle de confiance</b>	<b>p-value ajustée</b>
bsa - acqueuse	-3,09	[-7,85 ; 1,68]	0,32
culot - aqueuse	-3,25	[-8,01 ; 1,52]	0,28
Surnageant - aqueuse	3,78	[-0,99 ; 8,54]	0,16
Culot - bsa	-0,16	[-4,92 ; 4,60]	0,99
<b>Surnageant - bsa</b>	6,86	[ 2,10 ; 11,63]	<b>0,0021</b>
<b>Surnageant - culot</b>	7,02	[ 2,26 ; 11,79]	<b>0,0016</b>

Annexe 8 : Caractéristiques des élevages participants (localisation, effectif, historique sanitaire)

Elevage	Type d'élevage	Département	Historique sanitaire
A	LA	Pyrénées-Atlantiques	Négatif
B	EARL	Landes	Négatif
C	Inconnue	Pyrénées-Atlantiques	Négatif
D	EARL	Landes	Négatif
E	-	Inconnue	-
F	EARL	Landes	Négatif
G	SCEA	Landes	Positif
H	EARL	Pyrénées-Atlantiques	Négatif
I	EARL	Pyrénées-Atlantiques	Négatif

Annexe 9 : Caractéristique de l'élevage et périodicité de la collecte des prélèvements

Variables	Min	1st Qu	Median	Mean	3rd Qu	Max	NA
Age des canetons	5	22	36	36.74	50.50	71	2
Prélèvements (semaines)	0	1	1	1.25	1	5	9

Annexe 10 : Distribution des Ct selon les cibles génomiques

Variables	Min	1st Qu	Median	Mean	3rd Qu	Max	NA
Endogène	27.9	29.7	31.3	32.1	33.2	41	0
Gene M	35.3	41	41	40.7	41	41	0
H5H7	26.2	27.8	30.3	31.6	34.3	41	0
H5	32.1	41	41	40.1	41	41	0