

## PARUTION ANTICIPEE

### Evaluation de la survie des virus Influenza aviaries H5N8 dans les lisiers d'élevages de palmipèdes gras

Sophie Le Bouquin<sup>1</sup>, Audrey Schmitz<sup>2</sup>, Marion Pertusa<sup>3</sup>, Axelle Scoizec<sup>1</sup>, Nathalie Rousset<sup>3</sup>,  
Nicolas Eterradossi<sup>2</sup>

Auteur correspondant : [sophie.lebouquin-leneveu@anses.fr](mailto:sophie.lebouquin-leneveu@anses.fr)

- <sup>1</sup> Anses, Laboratoire de Ploufragan Plouzané, Unité Epidémiologie et bien-être en aviculture et cuniculture, Ploufragan, France
- <sup>2</sup> Anses, Laboratoire de Ploufragan Plouzané, Laboratoire national de référence pour l'influenza aviaire et la maladie de Newcastle, Ploufragan, France
- <sup>3</sup> Itavi, UMT Sanivol, Ploufragan, France

#### Résumé

La gestion des effluents d'élevage, et plus particulièrement celle des lisiers, constitue un facteur important à prendre en compte pour préciser les voies de dissémination des virus influenza aviaries dans l'environnement et prévenir leur diffusion. Lors de l'épizootie d'influenza aviaire hautement pathogène de l'hiver 2016-2017 en France dans laquelle les élevages de canards étaient majoritairement infectés, la survie des virus influenza aviaire H5N8 dans le lisier était donc un élément crucial à évaluer. Pour cela, a été réalisé le suivi du vieillissement de lisiers prélevés dans cinq foyers IAHP H5N8. Cette étude a montré que les fosses à lisier pouvaient constituer un lieu de persistance des virus influenza aviaire avec la mise en évidence d'une durée de survie jusqu'à trois semaines pour des virus H5N8 et d'au moins sept semaines pour un autre virus influenza aviaire de sous-type 4.

**Mots clés :** influenza aviaire, IAHP, H5N8, volailles, canard, lisier

## **Abstract**

### **Evaluation of H5N8 avian influenza viruses' survival in manure from fatty web-footed bird farms**

Manure management, and especially liquid manures, is a key factor that need to be explored for determining the avian influenza viruses dissemination routes into the environment and for preventing epizooties spread. The avian influenza H5N8 viruses' survival into liquid manure under field conditions was a crucial element to evaluate during the HPAI H5N8 winter 2016-2017 epizootics in France, which mostly affected duck farms. For that purpose, a follow up of the maturation of liquid manures issued from five IAHP H5N8 duck farm outbreaks, was performed. This study showed that liquid manure pits could represent sites for avian influenza viruses' persistency, as the survival duration reached three weeks for HPAI H5N8 viruses and at least seven weeks for another avian influenza virus of sub-type 4.

**Keywords:** Avian influenza, HPAI, H5N8, Poultry, Duck, Manure

La gestion des effluents d'élevage constitue, au même titre que les mouvements d'animaux, un facteur important à prendre en compte pour préciser les voies de dissémination des virus influenza aviaires dans l'environnement et prévenir la diffusion de l'épizootie actuelle. Dans une enquête menée en 2008 par l'Anses de Ploufragan (Duvauchelle et al., 2013), les lisiers avaient été identifiés comme facteurs de contamination des élevages de canards reproducteurs par les virus IA. L'analyse de la littérature montre qu'il existe une grande hétérogénéité du comportement des virus IA avec des durées de survie dans le milieu naturel pouvant aller de quelques heures à quelques dizaines voire centaines de jours, en fonction des conditions environnementales (Davidson et al., 2010; Elving et al., 2012; Horm et al., 2012; Lu et al., 2003; Nazir et al., 2011). Parmi les facteurs avancés par ces différents auteurs pour expliquer cette variabilité figurent, outre la souche virale elle-même, la température, le pH, la salinité, la nature des supports, la présence de matière organique, l'humidité relative, l'exposition aux rayons UV, etc. Ainsi, une combinaison de facteurs favorables associant une température basse, un pH neutre, l'absence d'exposition aux UV et une protection par un milieu riche en matières organiques favorise de manière importante la persistance des particules virales et le maintien de leur infectiosité (Anses - Saisine 2016-SA-0027, 2016). De telles conditions sont susceptibles de se retrouver dans une fosse à lisier en période hivernale. La grande majorité des travaux publiés ont été réalisés en conditions expérimentales en simulant les conditions de terrain. Par ailleurs, aucune donnée concernant la survie des virus dans les effluents d'élevages de canards n'a, à notre connaissance, été publiée à ce jour.

En l'absence de données disponibles, trois modalités de gestion des lisiers ont été autorisées réglementairement<sup>1</sup> conduisant à un assainissement plus ou moins rapide :

- le traitement en usine agréée de production de biogaz par méthanisation équipée d'une unité d'hygiénisation,
- le traitement par chaulage permettant d'atteindre un pH entre 10 à 12 pendant sept jours,
- l'assainissement naturel sur site par stockage minimum de 60 jours après abattage des animaux.

L'épandage sans assainissement préalable ou l'enfouissement immédiat sont strictement interdits. Plusieurs paramètres sont à prendre en compte par l'éleveur afin de déterminer le mode de traitement des lisiers le mieux adapté à sa situation :

- le traitement par méthanisation se prête bien aux fosses en géotextile qui ne peuvent supporter le chaulage et aux fosses trop pleines pour être brassées. Sa facilité de mise en œuvre va dépendre de la proximité entre les usines de traitement et les élevages,
- le traitement par chaulage va permettre un assainissement rapide par alcalinisation. Ce mode de gestion ne convient généralement pas aux fosses géo-membranes (constituées d'une bâche étanche spécifique) qui ne supportent pas un tel pH. Il est adapté aux fosses en béton avec un niveau de remplissage compatible avec un brassage sans risque de débordement. Toutefois, la validation du couple temps/pH reste à confirmer expérimentalement. La manipulation de la chaux est délicate car elle produit une volatilisation d'ammoniac et peut produire des résidus difficiles à éliminer en fond de cuve ; de ce fait, elle doit être réalisée par une entreprise spécialisée. L'obtention d'un pH homogène est conditionnée à un brassage correct de la fosse et sa mise en œuvre pratique est contraignante car il est nécessaire de suivre l'évolution du pH,
- enfin, l'assainissement naturel par stockage est une solution envisageable quel que soit le type de fosse, dès lors qu'une sécurisation du site est réalisée pour éviter tout risque de contamination. Néanmoins ce stockage long n'est pas forcément compatible avec les capacités actuelles des fosses. De plus, constituant un lieu résiduel de maintien de virus sur l'exploitation, il est incompatible avec un assainissement complet et rapide du site d'élevage.

Dès lors, la gestion de l'épizootie actuelle impose de disposer de connaissances plus précises sur la résistance des virus circulant et de vérifier l'efficacité des mesures de gestion retenues pour assainir les lisiers dans les élevages de canards reproducteurs et de canards gras. Début 2016, une étude a été mise en place par l'Anses de Ploufragan et l'Itavi<sup>2</sup>, afin d'estimer la persistance des virus IAHP dans les lisiers de canards à partir de lisiers contaminés expérimentalement et de lisiers contaminés naturellement, issus d'élevages infectés. A cette

---

<sup>1</sup> Note de service DGAL/SASPP/2017-142 du 16/02/2017 : Mesures applicables suite à une suspicion ou à la mise en évidence de foyer IAHP en France\_6<sup>ème</sup> mise à jour.

<sup>2</sup> Etude réalisée dans le cadre de l'UMT Sanivol.

occasion, un état des lieux des équipements et des pratiques concernant la gestion du lisier en élevage de canards gras a été réalisé et des investigations complémentaires conduites dans quelques foyers ont permis de préciser si des mesures de gestion spécifiques avaient été mise en place.

Les résultats obtenus sur deux lisiers d'élevages de canards reproducteurs barbarie et pékin contaminés expérimentalement par un virus H5N9HP infectieux isolé en France au cours de l'épisode de l'hiver 2015-2016, suggèrent une durée de survie du virus infectieux inférieure à cinq semaines en l'absence de tout traitement. Cette période est réduite à moins de deux semaines dans les lisiers traités à pH 10 et 12 (Schmitz et al., 2017). Ces résultats sont cohérents avec la durée de stockage de 60 jours préconisée par la réglementation en cas d'assainissement naturel mais restent à conforter pour les fosses traitées par chaulage pour lesquelles la réglementation se base sur une durée de stockage de sept jours.

Afin de confronter ces résultats expérimentaux aux conditions de terrain, des prélèvements ont été réalisés dans cinq foyers de canards en gavage contaminés par des virus H5N8HP au cours de l'hiver 2016-2017.

## **MATERIELS ET METHODES**

Une sélection de cinq élevages infectés (confirmation de présence de virus H5HP par le diagnostic officiel RT-PCR et séquençage du site de clivage) a été effectuée en concertation avec les DDecPP, sur la base du volontariat des éleveurs. Après une première prise de contact avec l'éleveur, une visite a été réalisée sur chaque site afin de compléter un questionnaire succinct sur les équipements de stockage de lisier et les pratiques de gestion associées (nombre de places en gavage, produits utilisés pour le nettoyage des salles, devenir du lisier, capacité et type de fosse). Dans chacun de ces élevages, deux litres de lisier ont été prélevés à l'aide d'une perche télescopique (idéalement 1 L en surface de la fosse et 1 L en profondeur prélevés à l'aide d'un récipient lesté équipé d'un clapet anti-retour). Ces prélèvements ont par la suite été mélangés pour chaque élevage puis transmis sous couvert du froid (+4°C) au laboratoire national de référence (LNR), dans un délai le plus court possible. Le passage par une étape intermédiaire de surgélation semblant interférer avec la survie du virus a été évité. Les lisiers prélevés ont ensuite été stockés à +4°C, température positive la plus favorable à la survie du virus. Chaque semaine, un prélèvement de chaque lisier a été réalisé, afin d'évaluer la persistance de virus infectieux. Pour cela, des analyses par ovoculture accompagnées de recherche génomique par RT-PCR temps réel gène M ont été réalisés. Après centrifugation des prélèvements reçus, les surnageants récoltés ont été pré-incubés avec un mélange d'antibiotiques puis ont été inoculés à des œufs embryonnés de neuf jours provenant de poules EOPS (exemptes d'organismes pathogènes spécifiés). Après cinq à six jours d'incubation, les liquides allantoïdiens ont été récoltés et leur activité hémagglutinante testée. Un second passage sur œufs a été réalisé en cas de résultats négatifs. La recherche de génome de virus d'IA a été réalisée sur les ARN extraits de prélèvements hebdomadaires de lisier ainsi que sur les liquides allantoïdiens récoltés à l'issue de l'ovoculture. Les ARN viraux ont été extraits selon le protocole décrit dans le kit RNEasy mini kit

(Qiagen, Courtaboeuf Cedex, France), puis ont été testés en RT-PCR temps réel gène M-AIV selon la méthode officielle en vigueur (Spackman et al., 2002).

Le vieillissement des lisiers contaminés a été arrêté dès lors que l'absence de virus infectieux a pu être démontrée dans deux prélèvements hebdomadaires consécutifs.

Toutes les manipulations de virus vivants ont été réalisées dans un laboratoire de niveau BSL3.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les visites ont été réalisées entre le 5 janvier et le 8 février 2017, dans cinq élevages de canards en gavage du Sud-Ouest de la France (deux dans les Landes, deux dans le Gers et un dans les Pyrénées Atlantique). Les principales caractéristiques de ces élevages sont présentées dans le tableau 1. En moyenne, la visite a eu lieu douze jours après le départ des animaux, à l'exception de l'élevage 2, dans lequel les animaux étaient encore présents le jour des prélèvements de lisier. Tous les élevages sont équipés de fosses géotextiles, sauf un, équipé d'une fosse bétonnée. Pour quatre élevages, le nettoyage et la désinfection étaient en cours au jour de la visite. Les fosses ont donc reçu les eaux de lavage de la salle de gavage dans lesquelles des produits détergents et/ou désinfectants ont pu être déversés. Seule la fosse de l'élevage 2 dans lequel les animaux étaient encore présents, n'avait rien reçu. Le stockage sur place était la méthode d'assainissement pratiquée sur tous les sites. L'un d'entre eux a recours partiellement aux services d'une usine de méthanisation.

Tableau 1. Principales caractéristiques des cinq élevages de gavage de canards visités (France 2017)

Elevage	Nb places	Délai confirmation foyer/prélèvement (j)	Délai abattage/prélèvement (j)	Type de fosse	Volume de la fosse (m <sup>3</sup> )	Modalités de traitement fosse	Devenir du lisier
1	714	7	6	Béton Ouvverte	Grande 400 + petite 75	Détergent + désinfectant	Assainissement naturel + méthanisation
2	900	1	0	Géotextile Fermée	300	Rien au moment du prélèvement	Traitement contre odeur - assainissement naturel - épandage + enfouissement sur l'exploitation
3	1 000	31	24	Géotextile fermée	800	Détergent + désinfectant (traitement	Traitement contre odeur - Lisier stocké

							réalisé par une entreprise)	depuis le 9/09/2016 - assainissement naturel-épandage sur champs à proximité du site
4	864	21	15	Géotextile Fermée (mais une partie découverte)	400		Détergent + désinfectant (double N et D réalisé par une entreprise)	Lisier stocké depuis 11/2016 - assainissement naturel - épandage sur champs à proximité du site (enfouisseur à disque)
5	1 904	16	13	Géotextile Ouverte	300		Détergent mais pas de désinfectant	Lisier stocké depuis 10/2016 - jamais de vidange complète de la fosse - épandage avec tonne à lisier sur des parcelles en jachère/ pas d'enfouissement

L'analyse des lisiers contaminés naturellement montre une grande diversité de virus viables rencontrés (Tableau 2). Des virus H5HP ont été retrouvés dans deux lisiers. Un virus H4 a aussi été mis en évidence ainsi que plusieurs paramyxovirus (PMV1 et PMV6) dans deux élevages.

Tableau 2. Résultats par ovoculture des suivis de cinq lisiers contaminés dans le temps (France 2017)

N° lisier	Semaines après abattage							
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
1	---	Pos <sup>A</sup> H5HP	Nég <sup>A</sup>	Nég	Nég	---	---	---
2	Pos H4 <sup>B</sup>	Pos	Pos	Pos H4	Pos	Pos	Pos	---
3	---	---	---	Pos PMV1 <sup>C</sup>	Pos	Pos	Pos	Pos

4	---	---	Pos H5HP	Pos PMV6	Pos PMV6	Pos PMV6	Pos	Pos
5	---	---	Pos PMV1	Pos	Pos	---	---	---

<sup>A</sup> Pos : positif ; Nég : négatif

<sup>B</sup> H4 : virus IA de sous-type H4

<sup>C</sup> PMV : Paromyxovirus

Les analyses sont encore en cours afin de déterminer la viabilité des virus identifiés et l'évolution de leur infectiosité dans le temps. Néanmoins à ce stade, les résultats mettent en évidence la présence prolongée de virus viables, dont des virus IAHP non H5 et des paromyxovirus PMV, plus de deux mois après l'abattage des animaux. La survie de virus H5N8 HP dans ces lisiers est observée jusqu'à trois semaines après l'abattage des animaux, soit trois semaines après la dernière émission de virus dans la fosse. Le virus H5N8 HP n'a pas été retrouvé dans la fosse de trois élevages, dont celle de l'élevage 2 détenant encore des animaux et n'ayant reçu aucun traitement susceptible d'avoir un effet assainissant (nettoyage et désinfection pas démarrés). Bien que les prélèvements aient été réalisés en période hivernale, période la plus favorable au maintien du virus, l'ensemble des conditions optimales à la survie du virus n'ont pas forcément été réunies, contrairement au protocole sur le lisier contaminé artificiellement, réalisé dans des conditions optimisées. Ceci souligne aussi la difficulté de l'échantillonnage dans les conditions de terrain. Malgré la précaution prise consistant à brasser la fosse préalablement à la prise des échantillons, l'homogénéité du lisier ne peut pas être garantie. Il est aussi possible qu'un phénomène de dilution dans la fosse ne permette pas systématiquement de retrouver le virus, bien qu'il soit présent. Le lisier, s'il peut représenter un facteur de diffusion qui n'est pas à négliger (isolement de virus jusqu'à trois semaines), n'est pas un indicateur suffisamment fiable de la contamination d'un élevage puisque dans plus de la moitié de nos lisiers issus d'animaux contaminés H5N8 HP, le virus infectieux n'a pu être retrouvé dès le premier passage.

En conclusion, si les résultats obtenus à partir de lisiers naturellement contaminés n'ont pas permis de mettre en évidence une durée de survie des virus H5N8 HP infectieux supérieure à trois semaines, la persistance dans un lisier d'un autre virus influenza de sous-type H4 est démontrée sur une durée de sept semaines minimum. Cette étude conforte donc les préconisations de gestion des effluents proposées par la réglementation, à savoir un stockage naturel de 60 jours. Aucun des foyers n'ayant utilisé le chaulage, l'efficacité de ce dispositif n'a pu être testée sur le terrain.

De plus, ces résultats corroborent ceux obtenus dans le premier volet de l'étude sur les lisiers, consistant à étudier la persistance d'un virus H5N9 HP représentatif de l'épisode français de l'hiver 2015-2016 dans des lisiers d'élevages de canards en conditions expérimentales (contamination expérimentale et vieillissement artificiel) : les résultats obtenus sont similaires pour deux types de production de canards reproducteurs barbarie et pékin, suggérant une durée de survie du virus infectieux inférieure à cinq semaines, en l'absence de tout traitement.

Le volet expérimental à partir de lisier contaminé artificiellement, dans lequel l'ensemble des paramètres sont contrôlés, semble mieux adapté pour définir un protocole opératoire de gestion des effluents d'élevage puisqu'on se place dans les conditions optimales de sa survie. Face à la grande diversité d'équipements et de pratiques rencontrées sur le terrain, il sera ensuite nécessaire de le tester en élevage afin de pouvoir délivrer des recommandations pratiques et claires en cas de foyers.

## Remerciements

Les auteurs remercient les éleveurs ayant accepté de participer à l'étude, le laboratoire des Pyrénées et des Landes ainsi que les DDecPP des départements concernés.

## Références bibliographiques

- Anses - Saisine 2016-SA-0027, 2016. Avis de l'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'évaluation des conditions d'assainissement des bâtiments d'élevage de volailles vis-à-vis du risque d'influenza aviaire.
- Davidson, I., Nagar, S., Haddas, R., Ben-Shabat, M., Golender, N., Lapin, E., Altory, A., Simanov, L., Ribshtein, I., Panshin, A., Perk, S., 2010. Avian influenza virus H9N2 survival at different temperatures and pHs. *Avian Dis* 54, 725-728.
- Duvauchelle, A., Huneau-Salaun, A., Balaine, L., Rose, N., Michel, V., 2013. Risk factors for the introduction of avian influenza virus in breeder duck flocks during the first 24 weeks of laying. *Avian Pathol* 42, 447-456.
- Elving, J., Emmoth, E., Albiñ, A., Vinneras, B., Ottoson, J., 2012. Composting for avian influenza virus elimination. *Appl Environ Microbiol* 78, 3280-3285.
- Horm, V.S., Gutierrez, R.A., Nicholls, J.M., Buchy, P., 2012. Highly pathogenic influenza A(H5N1) virus survival in complex artificial aquatic biotopes. *PloS one* 7, e34160.
- Lu, H., Castro, A.E., Pennick, K., Liu, J., Yang, Q., Dunn, P., Weinstock, D., Henzler, D., 2003. Survival of avian influenza virus H7N2 in SPF chickens and their environments. *Avian Dis* 47, 1015-1021.
- Nazir, J., Haumacher, R., Ike, A.C., Marschang, R.E., 2011. Persistence of avian influenza viruses in lake sediment, duck feces, and duck meat. *Appl Environ Microbiol* 77, 4981-4985.
- Schmitz, A., Rousset, N., Le Bouquin, S., Ogor, K., Le Bras, M.-O., Martenot, C., Pertusa, M., Daniel, P., Guillou-Cloarec, C., Le Prioux, A., Allée, C., Guillemoto, C., Niqueux, E., Briand, F.-X., Morin, H., Richard, A., Eterradossi, N. 2017. Gestion des lisiers de palmipèdes contaminés par les virus influenza aviaires H5HP : recensement des pratiques et évaluation expérimentale de la survie du virus. In: Douzièmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Tours, 5 et 6 avril 2017, 188-192.
- Spackman, E., Senne, D.A., Myers, T.J., Bulaga, L.L., Garber, L.P., Perdue, M.L., Lohman, K., Daum, L.T., Suarez, D.L., 2002. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 40, 3256-3260.